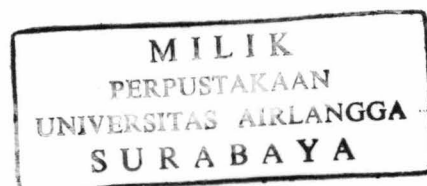


KK
KKA
TKD.30/11
Sub
P

TESIS

**PENGARUH EKSTRAK
BAYAM (*Amaranthus tricolor L.*) TERHADAP
KADAR MDA DAN AKTIFITAS GSH-Px
Rattus norvegicus STRAIN WISTAR YANG
TERPAPAR ASAP ROKOK**



F. ASISI SUBONO, S.Si.
NIM : 090610221/ M

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN DASAR
PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2007**

TESIS

**PENGARUH EKSTRAK
BAYAM (*Amaranthus tricolor L.*) TERHADAP
KADAR MDA DAN AKTIFITAS GSH-Px
Rattus norvegicus STRAIN WISTAR YANG
TERPAPAR ASAP ROKOK**

F. ASISI SUBONO, S.Si.
NIM : 090610221/ M

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN DASAR
PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2007**

Halaman Prasyarat Gelar Magister

**PENGARUH EKSTRAK
BAYAM (*Amaranthus tricolor L.*) TERHADAP
KADAR MDA DAN AKTIFITAS GSH-Px
Rattus norvegicus STRAIN WISTAR YANG
TERPAPAR ASAP ROKOK**

TESIS

**Untuk memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

**Oleh:
F. ASISI SUBONO, S.Si.
NIM : 090610221/ M**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN DASAR
PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2007**

Lembar Pengesahan

**TESIS INI TELAH DIUJI
PADA TANGGAL 12 AGUSTUS 2008**

Oleh

Pembimbing Ketua



Prof. Dr. Harianto Notopuro, dr.,MS.
NIP. 130532940

Pembimbing



Moh Hanafi, MBBS., dr.,MS.
NIP. 130532941



Ketua Program Studi IKD



Prof. Dr. Retno Handajani, MS., Ph.D.
NIP.130541984

Halaman Penetapan Panitia penguji Tesis

Telah diuji pada

Tanggal 12 Agustus 2008

PANITIA PENGUJI TESIS,

Ketua : Prof. Dr. Retno Handajani, MS., Ph.D.

Anggota :

1. Prof. Dr. Harianto Notopuro, dr.,MS.
2. Moh Hanafi, MBBS., dr.,MS.
3. Tri Martini Sumarno, dr., MS.
4. Junaidi Soetowo, dr., MS.
5. Dr. Arief Wibowo, dr., MS.

KATA PENGANTAR

Syukur kami panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Kasih karena berkat karunia-Nya kami dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini merupakan tugas akhir sebagai syarat menyelesaikan studi pada program magister(S2) Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya. Banyak hambatan dan kesulitan yang kami hadapi dalam menyelesaikan tugas akhir ini, namun berkat kuasa-Nya dan bimbingan berbagai pihak, akhirnya semuanya dapat terlewati dengan baik.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kami sampaikan kepada Prof. Dr. Harianto Notopuro, dr., MS. selaku pembimbing ketua dan Moh Hanafi MBBS ., dr. Ms. selaku pembimbing kedua atas perhatiannya dan kesabarannya dalam memberi semangat, bimbingan , saran dan masukan yang sangat berarti bagi terselesainya tesis ini.

Secara khusus saya mengucapkan terima kasih yang setinggi-tingginya kepada Romo Alexius Dwi Widiatna M.Ed. Kepala Sekolah SMAK St. Louis 1 Surabaya selaku atasan saya yang memberi kesempatan dan membiayai proses perkuliahan ini. Terima kasih juga saya sampaikan kepada Romo Eko Prasetyo CM selaku ketua Yayasan Lazaris yang mengizinkan dan juga membiayai perkuliahan ini, sehingga saya dapat menyelesaikan program studi ini.

Pada kesempatan ini saya juga menyampaikan terimakasih kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Fasichul Lisan, Apt. dan Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga sekaligus Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Prof Dr. Muhamad Amin Sp.P(K). yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas kepada penulis untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program Magister ini.

2. Ketua program Studi Ilmu Kedokteran Dasar, Prof. Dr. Retno Handajani dr., MS., PhD. dan Ketua Minat Studi Ilmu Biokimia, Prof. Dr. Indri Safitri, dr. MS., atas kesempatan dan bimbingan yang diberikan kepada penulis untuk menyelesaikan program pendidikan Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya.
3. Seluruh dosen penguji atas masukan dan sarannya untuk memperbaiki tesis ini.
4. Seluruh staf pengajar dan karyawan bagian Ilmu Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya yang telah membantu dan memberi banyak masukan saran dan ilmu selama belajar.
5. Kepala Laboratorium Bahan Alam, Fakultas Farmasi beserta seluruh stafnya yang memberikan izin kepada penulis untuk mempergunakan sarana dan fasilitas laboratoriumnya selama mengerjakan penelitian.
6. Dr. Sudjarwo, MS., Apt. yang banyak memberi masukan dan perbaikan dalam menyusun tesis ini.
7. Kedua orang tuaku, Isteriku Florentina S, dan anak-anak: AJi, Inggit dan Irine yang telah mengorbankann segalanya demi terselesainya penyusunan tesis ini.
8. Temanku seperjuangan Maruni Wiwindiarti, S.Si. yang membantu menyelesaikan tesis ini
9. Semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu, semoga bantuannya mendapat limpahan berkat-Nya.

Kami menyadari bahwa tesis ini masih ada kekurangannya, oleh karena itu saran dan kritik yang memangun dari semua pihak sangat diharapkan. Harapan kami dari tesis ada manfaatnya bagi perkembangan ilmu pengetahuan di Negara tercinta ini.

Surabaya, Agustus 2008

Penulis

RINGKASAN

PENGARUH EKSTRAK BAYAM(*Amaranthus tricolor L.*) TERHADAP KADAR *MDA* DAN AKTIFITAS *GSH-Px* *Rattus norvegicus* STRAIN WISTAR YANG TERPAPAR ASAP ROKOK

Stress oksidatif disebabkan karena meningkatnya jumlah *ROS*(*reactive oxygen species*) yang tidak bisa diimbangi oleh sistem antioksidan tubuh kita. Meningkatnya *ROS* ini dapat dipicu oleh banyak hal seperti olah raga terlalu berat, asap rokok, radiasi atau karena proses fisiologi tubuh. Keadaan ini mempengaruhi lemak, protein dan DNA dalam sel tubuh yang akan mengakibatkan munculnya berbagai penyakit. Meningkatnya radikal bebas menyebabkan terjadinya *peroksidasi lipid* dan akan menghasilkan *MDA*(*Malondialdehid*), sehingga meningkatnya kadar *MDA* merupakan indikator terjadinya *peroksidasi lipid*. Proses *peroksidasi lipid* ini dihambat oleh sistem antioksidan tubuh yang berupa antioksidan endogen seperti *SOD*, *GSH-Px* dan Katalase. Selain itu juga dihambat oleh antioksidan eksternal seperti β -karoten, tokoferol, dan askorbat. Bayam(*Amaranthus tricolor L.*) diduga berpotensi sebagai antioksidan karena banyak mengandung β -karoten dan asam askorbat

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak bayam terhadap kadar *MDA* plasma darah, dan aktifitas enzim *GSH-Px* eritrosit pada *Rattus norvegicus* yang terpapar asap rokok.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan *Extended Randomised Posttest Only Control Design*. Dalam penelitian ini sampel *Rattus norvegicus* dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan. Kelompok kontrol positif dipapar asap rokok tidak diberi ekstrak bayam, kelompok kontrol negatif tidak dipapar asap rokok tidak diberi ekstrak bayam, kelompok suplementasi I dipapar asap rokok diberi ekstrak bayam 1ml, kelompok suplementasi II dipapar asap rokok diberi ekstrak bayam 1.5ml dan kelompok suplementasi III dipapar asap rokok diberi ekstrak

bayam 2ml. Perlakuan ini selama 15 hari dan pada hari terakhir setelah 2 jam perlakuan dilakukan pemeriksaan kadar *MDA* dan aktifitas enzim *GSH-Px*.

Data penelitian dianalisa dengan *Manova (Multiple analysis of Variance)* dan dilanjutkan dengan *anova (analysis of Variance)* bila ada beda nyata antar perlakuan maka dilanjutkan dengan uji *LSD (least significance difference)*. Dari hasil penelitian ini diperoleh data bahwa penurunan kadar *MDA* yang paling bermakna ada pada kelompok suplementasi ekstrak bayam 1.5ml yaitu (0.5828 ± 0.1993) nmol/ml dibanding kelompok kontrol positif yaitu (1.5526 ± 0.3570) nmol/ml, sedangkan suplementasi ekstrak bayam 1ml tidak menyebabkan efek nyata pada penurunan kadar *MDA*. Hasil pengamatan ini menunjukkan suplementasi ekstrak bayam 1.5ml mempunyai efek menurunkan kadar *MDA* yang paling baik. Aktifitas enzim *GSH-Px* yang paling rendah dijumpai pada kelompok kontrol positif yaitu (525.1 ± 14.5) U/gHb dan yang paling tinggi dijumpai pada kelompok kontrol negatif yaitu (616.1 ± 34.6) U/gHb. Aktifitas enzim *GSH-Px* pada kelompok suplementasi ekstrak bayam 1ml adalah (593.2 ± 40.9) U/gHb, pada 1.5ml adalah (575.6 ± 47.7) U/gHb dan pada 2ml adalah (605.5 ± 53.6) U/gHb. Hal ini menunjukkan pemberian ekstrak bayam dapat mencegah menurunnya aktifitas enzim *GSH-Px*. Kadar hemoglobin pada semua kelompok perlakuan tidak berbeda nyata.

Berdasarkan hasil pengamatan tersebut dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak bayam 1.5ml dan 2ml dapat menurunkan kadar *MDA* plasma darah secara bermakna, dan dapat mencegah penurunan aktifitas enzim *GSH-Px* pada semua konsentrasi. Oleh karena itu masih diperlukan penelitian lanjutan untuk melihat lebih jauh pada dosis berapa ekstrak bayam dapat mencegah penurunan aktifitas enzim *GSH-Px* pada eritrosit.

SUMMARY

THE EFFECT OF SPINACH (*Amaranthus tricolor L.*) EXTRACT TO MDA CONCENTRATION AND GSH- Px ACTIVITY IN *Rattus norvegicus* STRAIN WISTAR INDUCED BY CIGARETTE SMOKE

Oxidative stress is induced by a wide range of environmental factors including uv irradiation, chemical substances, cigarette smoke, and pollutants, which are capable to promote many diseases in human being. The free radicals are agents of lipid peroxidation process. One of the end product of lipid peroxidation process is *MDA*(*Malondialdeid*). Plasma *MDA* concentration can be used as indicator of lipid peroxidation process. The body has an antioxidant system against free radicals, there are enzymatic antioxidants include *SOD*, *GSH-Px* and *Catalase*. In condition where free radicals very high, exogenous antioxidants are required, it include vitamin E, β -karoten, and vitamin C. The Spinach(*Amaranthus tricolor L.*) is predicted to have protection effect in oxidative stress because it contained a high β -karoten, and ascorbat acid

The aims of this research is to find out what the effect of spinach (*Amaranthus tricolor L.*) extract to concentration of plasma *MDA* and *GSH- Px* activity in *Rattus norvegicus* strain Wistar induced by cigarette smoke.

This research is a experimental study, using *Extended Randomised Post test Only Control Design*. There were five groups in this study. Group 1 as positive control was exposed to cigarette smoke but not given spinach extract. Group 2 as negative control wasn't exposed to cigarette smoke and spinach extract either. Group 3, 4 and 5 were exposed to cigarette smoke and given spinach extract 1ml, 1.5ml and 2ml. The data of this research was analyzed used *Manova*, *anova* and *LSD test*.

The results of this study reveal that plasma *MDA* level in supplementation 1,5ml of spinach extract (group4) showed significant reduction(0.5828 ± 0.1993)nmol/ml compare to positive control group (1.5526 ± 0.3570)nmol/ml. Supplementation of 1ml compare with spinach extract have not significant effect to plasma *MDA* level. The lowest activity of *GSH-Px* enzyme was showed by the positive control group (553.1 ± 27.3)U/gHb, and the highest at negative control group (601.4 ± 32.3)U/gHb. The Spinach extract supplementation groups 1ml, 1.5ml and 2ml have higher of *GSH-Px* activity compare to positive controle group. Therefor spinach extract supplementation take part in reducing the cigarette smoke effect on *GSH-Px* activity.

The conclusions, suplementations of spinach extract have an effect on plasma *MDA* level and the significant reductions of plasma *MDA* level is shown by suplementations 1.5ml spinach extract. The reduction of *GSH-Px* activity by suplementations of spinach extract was occurred at all of spinach extract concentrations.

ABSTRACT

**THE EFFECT OF SPINACH (*Amaranthus tricolor L.*) EXTRACT
TO MDA CONCENTRATION AND GSH- Px ACTIVITY IN *Rattus norvegicus*
STRAIN WISTAR INDUCED BY CIGARETTE SMOKE**

F. Asisi Subono

The objective of this study was to determine the effect of spinach(*Amaranthus tricolor l.*) extract on concentration of *MDA* plasma and *GSH-Px* activity in *Rattus norvegicus* strain wistar induced by cigarette smoke. Background of this study are oxidative stress promote many diseases, cigarette smoke caused oxidative stress and these process were inhibited by antioxidant system. Spinach(*Amaranthus tricolor l.*) contained many antioxidant like β -karoten, and ascorbat acid

This research is an experimental study, using *Extended Randomised Postest Only Control Design*. There were five groups in this study. Group 1 was positive control that was exposed by cigarette smoke and receiving spinach extract. Group 2 was negative control that wasn't exposed cigarette smoke and receiving spinach extract either. Group 3, 4 and 5 were exposed cigarette smoke and received spinach extract 1ml, 1.5ml and 2ml. Blood sampel were collected over 15 day, measurement of plasma *MDA* level with thiobarbituric acid(TBA) method from Uchiyama dan Mihara. Measurement of *GSH-Px* enzyme activity with Paglia dan Valentine, 1967 method. The data of this research was analyzed by *Manova*, *anova* and *LSD test*.

Result of this research are supplementation 1,5ml of spinach extract (group4) showed significant reduction of plasma *MDA* level. The Spinach extract supplementation groups 1ml, 1.5ml and 2ml have higher of *GSH-Px* activity compare to positive controle group. Therefore spinach extract supplementation take part in reducing the lowering ability of *GSH-Px* activity by cigarette smoke.

Conclusions : supplementations of spinach extract have a lowering effect of plasma *MDA* level and supplementation 1.5ml spinach extract has the most significant effect. The prevention of *GSH-Px* activity reduction by supplementations of spinach extract was occurred at all of spinach extract concentrations.

Key word : Spinach, oxidative stress, *MDA*, *GSH-Px*, cigarette smoke, antioxidant

DAFTAR ISI

| | |
|-------------------------------------------------------------|----------|
| Halaman Sampul | i |
| Prasyarat Gelar | iii |
| Lembar Pengesahan | iv |
| Lembar Penetapan Panitia Penguji | v |
| Kata Pengantar | vi |
| RINGKASAN | viii |
| SUMMARY | x |
| ABSTRAK | xii |
| DAFTAR ISI | xiii |
| DAFTAR TABEL | xv |
| DAFTAR GAMBAR | xvi |
| DAFTAR LAMPIRAN | xvii |
| DAFTAR SINGKATAN | xviii |
| BAB I. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1. Latar Belakang | 1 |
| 1.2. Rumusan Masalah | 4 |
| 1.3. Tujuan Penelitian | 4 |
| 1.3.1. Tujuan umum | 4 |
| 1.3.2. Tujuan khusus | 4 |
| 1.4. Manfaat Penelitian | 5 |
| BAB II. TINJAUAN PUSTAKA | 6 |
| 2.1. Reactive Oxygen Species (ROS) | 7 |
| 2.1.1. Macam Radikal Bebas | 7 |
| 2.1.2. Sumber Radikal Bebas..... | 10 |
| 2.1.3. Pengaruh Radikal Bebas..... | 12 |
| 2.2. Antioksidan | 15 |
| 2.2.1. Macam antioksidan..... | 16 |
| 2.2.2. Kerja Antioksidan | 18 |
| 2.3. Rokok..... | 23 |
| 2.3.1. Komposisi asap rokok..... | 23 |
| 2.3.2. Rokok kretek | 24 |
| 2.3.3. Radikal bebas dalam rokok | 24 |
| 2.4. Bayam | 26 |
| 2.4.1. Taksonomi dan morfologi | 27 |
| 2.4.2. Manfaat dan nutrisi bayam | 29 |
| BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESA PENELITIAN | |
| 3.1. Kerangka Konseptual | 32 |
| 3.2. Alur Konseptual Penelitian | 33 |
| 3.3. Hipotesa Penelitian | 34 |

| | |
|------------------------------------------------------------------|----|
| BAB IV. METODOLOGI PENELITIAN..... | 35 |
| 4.1. Rancangan Penelitian | 35 |
| 4.2. Sampling..... | 36 |
| 4.2.1. Sampel dan besar sampel | 36 |
| 4.2.2. Pengelompokan Sampel | 37 |
| 4.3. Variabel Penelitian | 37 |
| 4.3.1. Klasifikasi variabel | 37 |
| 4.3.2. Definisi operasional variabel..... | 38 |
| 4.4. Bahan Penelitian | 38 |
| 4.4.1. Hewan coba | 38 |
| 4.4.2. Makanan dan minuman hewan coba..... | 39 |
| 4.4.3. Bahan untuk perlakuan | 39 |
| 4.4.4. Unit analisis..... | 39 |
| 4.4.5. Bahan untuk pemeriksaan | 39 |
| 4.5. Instrumen Penelitian | 40 |
| 4.6. Lokasi dan Waktu Penelitian | 41 |
| 4.7. Prosedur Penelitian | 43 |
| 4.8. Analisis Data..... | 44 |
| | |
| BAB V. HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA | 45 |
| 5.1. Hasil Uji Deskriptif Data Penelitian | 45 |
| 5.2. Hasil Uji Normalitas | 47 |
| 5.3. Hasil uji Homogenitas | 47 |
| 5.4. Hasil Uji Box Matrik Kovarians | 48 |
| 5.5. Hasil Uji Multivariat | 49 |
| 5.6. Hasil Uji Anova (<i>Analisis of Variance</i>) | 49 |
| 5.7. Hasil Uji LSD (<i>Least Significant Difference</i>) | 50 |
| | |
| BAB VI. PEMBAHASAN | 53 |
| 6.1. Kadar MDA Plasma Darah | 53 |
| 6.2. Aktifitas Enzim GSH-Px | 55 |
| 6.3. Kadar Hb | 57 |
| | |
| BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN | 58 |
| 7.1. Kesimpulan | 58 |
| 7.2. Saran | 58 |
| | |
| DAFTAR PUSTAKA..... | 59 |
| LAMPIRAN | 63 |

DAFTAR TABEL

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| TABEL 2.1. Kandungan Asap Rokok | 24 |
| TABEL 2.2. Kandungan Zat Gizi pada Bayam setiap 100 gram Bahan Segar... | 31 |
| TABEL 4.1. Jadwal Penelitian | 41 |
| TABEL 5.1. Hasil Uji Statistik Deskriptif..... | 45 |
| TABEL 5.2. Hasil Uji Normalitas | 47 |
| TABEL 5.3. Hasil Uji Lavene untuk Homogenitas varian Variabel | 48 |
| TABEL 5.4. Hasil Uji Box Matrik Kovarian | 48 |
| TABEL 5.5. Hasil Uji Multivariat | 49 |
| TABEL 5.6. Hasil Uji Between-Subjec Effect(Anova) | 49 |
| TABEL 5.7. Hasil Uji LSD | 50 |

DAFTAR GAMBAR

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Gambar 2.1. <i>Peroksidasi</i> Lipid yang menghasilkan MDA | 13 |
| Gambar 2.2. Skema Sistem Antioksidan Endogen dan <i>Peroksidasi</i> lipid | 17 |
| Gambar 2.3. Skema jalur radikal bebas dalam mempengaruhi munculnya kanker dan peranan antioksidan | 18 |
| Gambar 2.4. Fungsi β -karoten sebagai antioksidan | 21 |
| Gambar 2.5. Interaksi dan Sinergisme diantara Sistem Antioksidan yang bekerja pada fase Lipid (membran sel) dan fae air (sitosol) | 22 |
| Gambar 2.6. Morfologi <i>Amaranthus tricolor L.</i> | 27 |
| Gambar 3.1. Kerangka Konseptual Penelitian | 33 |
| Gambar 4.1. Skema Rancangan Penelitian | 35 |
| Gambar 4.2. Kerangka Operasional Penelitian | 43 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|--------------------------------------------------------------|----|
| LAMPIRAN 1 . Perhitungan besar sampel | 63 |
| LAMPIRAN 2. Tabel konversi | 64 |
| LAMPIRAN 3. Komposisi pakan tikus | 65 |
| LAMPIRAN 4. Proses ekstraksi bayam | 66 |
| LAMPIRAN 5. Penghitungan pemberian kadar ekstrak bayam | 68 |
| LAMPIRAN 6. Hasil Pengukuran Data | 70 |
| LAMPIRAN 7. Grafik hasil pengukuran Data | 71 |
| LAMPIRAN 8. Gambar sketsa <i>smoking pump</i> | 73 |
| LAMPIRAN 9. Pemeriksaan MDA | 74 |
| LAMPIRAN 10. Pemeriksaan GSH-Px..... | 77 |
| LAMPIRAN 11. Analisis statistic data penelitian | 78 |

DAFTAR SINGKATAN

| | |
|----------------------------|--------------------------------------------------------|
| ·OH | : Radical hidroksil |
| $\dot{\text{N}}\text{O}$ | : Radikal Nitrit oksida |
| $\dot{\text{N}}\text{O}_2$ | : Radikal Nitrogen dioksid |
| $\dot{\text{Q}}\text{H}$ | : Radikal Semiquinon |
| $\cdot^1\text{O}_2$ | : Singlet Oksigen |
| B.d.d. | : Bagian yang dapat dimakan |
| BPS | : <i>Buffer Phosfat Saline</i> |
| CAT | : <i>Catalase</i> |
| FRAP | : <i>Ferric Reducing Antioxidants Power</i> |
| GSH | : Glutation tereduksi |
| <i>GSH-Px</i> | : <i>Glutathione peroxidase</i> |
| GSH-Red | : <i>Glutathione reductase</i> |
| GSSG | : Glutation teroksidasi |
| H_2O_2 | : Hidrogen peroksida |
| HOCl | : Hidroklorid |
| LPS | : <i>Lipopolisacaride</i> |
| LSD | : <i>Least Significant Difference</i> |
| <i>MDA</i> | : <i>Malondialdehid</i> |
| NBT | : <i>Nitroblue Tetrazolium</i> |
| $\text{O}_2^{\cdot-}$ | : Radikal Anion Superoksida |
| ONOO^- | : Ion Peroksi nitrit |
| OOH^{\cdot} | : Radikal Peroksil |
| ORAC | : <i>Oxygen Radicals Absorbans Capacity</i> |
| PUFA | : <i>Poliunsaturated Fatty acid</i> |
| PUFA-OH | : Asam lemak tak jenuh ganda hidroksi |
| PUFA-OO \cdot | : Radikal bebas peroxy dari asam lemak tak jenuh ganda |
| PUFA-OOH | : Asam lemak tak jenuh ganda hidroperoksi |
| Q | : Quinon |
| QH_2 | : Hidroquinon |
| R \cdot | : Radikal bebas |

| | |
|-------------------|--------------------------------------------------------|
| RE | : Retikulum Endoplasma |
| ROO [•] | : Radikal peroksil lipid |
| ROOH | : Peroksil lipid |
| ROS | : <i>Reactive Oxygen Species</i> |
| Se | : Selenium |
| SOD | : Superoksida dismutase |
| TAC | : <i>Total Antioxidant Capacity</i> |
| TBA | : <i>Thiobarbiturat Acid</i> |
| TBARS | : <i>Thiobarbituric acid-reactive substance</i> |
| TCA | : <i>Trichloroacetic Acid</i> |
| TEAC | : <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i> |
| TocO [•] | : Radikal bebas α -tocopherol |
| TocOH | : Vitamin E (<i>α-tocopherol</i>) |
| TRAP | : <i>Total Radikal Trapping Antioxidants Parameter</i> |
| XD | : Xantin dehidrogenase |
| XO | : Xantin Oksidase |

BAB I

PENDAHULUAN



1.1. Latar Belakang

Pada 50 tahun yang lalu keberadaan radikal bebas dalam sistem biologi kurang mendapat perhatian. Radikal bebas mendapat perhatian para ahli setelah Harman(1956) menyatakan bahwa radikal oksigen dari reaksi enzimatik di dalam tubuh merupakan penyebab kerusakan sel yang meliputi mutagenesis, kanker, dan proses penuaan. Pemahaman ilmiah radikal bebas memasuki era ke-2 setelah setelah McCord dan Fridovich menemukan enzim *Superoxide Dismutase (SOD)* dan akhirnya disimpulkan bahwa radikal bebas penting dalam sistem biologi(Dröge, 2002).

Radikal bebas dapat berasal dari dalam tubuh sendiri dan berasal dari luar tubuh. Paparan radikal bebas dari luar semakin tinggi frekuensinya dan dapat berasal dari berbagai macam sumber seperti: asap rokok , obat-obatan , radiasi, partikel anorganik dan gas tertentu seperti Ozon(Strauss, 2001). Radikal bebas dapat merusak 3 senyawa penting di dalam sel yaitu lipid, protein, dan DNA. Produk akhir peroksidasi lipid, dekomposisi asam amino, karbohidrat kompleks, pentosa, heksosa adalah *Malondialdehid* (Conti *et al.*,1991). Menurut Halliwell dan Gutteridge(1990) *MDA(Malondialdehid)* merupakan produk oksidasi lemak tidak jenuh yang merupakan metabolit sel yang dihasilkan oleh radikal bebas. Konsentrasi *MDA* yang tinggi menunjukkan adanya proses oksidasi di dalam membran sel. Status antioksidan yang tinggi biasanya diikuti oleh penurunan kadar *MDA*. Ada hubungan yang erat antara diet dengan aterosklerosis, kerusakan arteri yang menjurus pada penyempitan

disebabkan oleh radikal bebas. Kadar MDA dapat diukur pada plasma darah mamalia(Winarsi, 2007).

Dalam keadaan normal reaktivitas radikal bebas dapat dihambat oleh sistem antioksidan yang melengkapi sistem kekebalan tubuh. Menurut Mc Cord(2000) cara yang paling efisien dalam menghilangkan efek yang tidak menguntungkan dari radikal bebas ini, dengan cara enzimatik. Kelompok enzim antioksidan yang terlibat dalam proses enzimatik ini diantaranya adalah *Superoxide Dismutase(SOD)*, katalase dan *gluthathion peroxidase(GSH-Px)*. Namun dengan semakin tingginya paparan radikal bebas yang berasal dari luar tubuh maka tubuh tidak mampu meredam semua efek radikal bebas sehingga perlu adanya asupan antioksidan dari luar tubuh, yaitu antioksidan yang ada di alam. Makanan sebagai sumber antioksidan dari luar tubuh sebaiknya yang mudah didapat, mudah cara menanganinya dan murah. Antioksidan yang ada di alam tersebut diantaranya adalah β -karoten, vitamin C, vitamin E, cistein, dan penicillamin. Vitamin E dan vitamin C bekerja sama dalam memerangi radikal bebas di dalam tubuh. Vitamin C berperan dengan membentuk ikatan dengan vitamin E radikal yang terjadi dalam proses penangkapan radikal bebas di dalam tubuh. Beberapa makanan alami kelihatannya sangat sederhana tetapi sebenarnya merupakan makanan yang kaya akan zat yang sangat diperlukan tubuh untuk mempertahankan kesehatan(Hernani dan Rahardjo, 2006).

Pada penelitian ini menggunakan *Rattus norvegicus* strain Wistar karena tikus tersebut memiliki sistem metabolisme yang mirip dengan manusia, mudah diperoleh, serta mudah beradaptasi dengan lingkungan(Kusumawati, 2004). Stressor yang memicu munculnya radikal bebas dalam penelitian ini digunakan paparan asap rokok kretek karena paparan asap rokok kretek mengandung radikal bebas yang tinggi sehingga cepat

menimbulkan peroksidasi lipid. Penelitian ini menggunakan eritrosit karena eritrosit memiliki makna fisiologis yang penting, yaitu menyampaikan oksigen ke jaringan yang membutuhkan dan mengeluarkan karbondioksida yang terbentuk di dalam jaringan. Eritrosit dewasa tidak memiliki inti sel dan organel intra sel sehingga bila enzim *GSH-Px* menurun karena paparan radikal bebas tidak terjadi pembentukan baru lagi, oleh karena itu pengukuran *GSH-Px* tepat dilakukan pada sel eritrosit. Antioksidan enzimatis *SOD*, *GSH-Px* dan *katalase* melindungi eritrosit dari kerusakan serta stress oksidatif (Murray *et al.*, 2003). Dalam penelitian ini parameter antioksidan yang diukur adalah aktifitas *GSH-Px* karena enzim ini memiliki afinitas dan aktifitas yang lebih tinggi dibanding *katalase* dalam mengubah peroksida yang dihasilkan pada peroksidasi lipid menjadi air dan oksigen. Selain itu *GSH-Px* mampu menangkap peroksilipid dalam proses peroksidasi lipid (Murray *et al.*, 2003).

Bayam merupakan bahan makanan yang memiliki kapasitas antioksidan total yang tinggi dibanding sayuran lainnya. Kapasitas antioksidan ini menunjukkan kemampuan kumulatif untuk menangkap radikal bebas (Pellegrini *et al.*, 2003). Bayam merupakan sayuran yang mengandung kadar β -karoten, vitamin C yang tinggi (Morelock *et al.*, 2004). Karotinoid dalam tanaman bayam mempunyai fungsi penting sebagai antioksidan untuk menanggulangi radikal bebas. Saat masuk dalam tubuh manusia senyawa ini akan membangun aktifitas antioksidannya dan dapat melindungi kita terhadap berbagai penyakit degeneratif, seperti pencegahan terhadap kanker (Kirkpatrick *et al.*, 1999)

Sejauh yang kami ketahui penelitian tentang pengaruh ekstrak bayam pada kadar *MDA* dan aktifitas *GSH-Px* pada *Rattus norvegicus* strain Wistar yang terpapar asap

rokok secara *invivo* belum pernah dilakukan, sehingga perlu dilakukan untuk melihat apakah antioksidan yang ada pada ekstrak bayam dapat dipakai sebagai anti radikal bebas, sehingga dapat diterapkan dalam kehidupan sehari-hari.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang penelitian tersebut maka permasalahan sebagai berikut :

- 1.2.1. Apakah pemberian ekstrak bayam per oral dapat menurunkan kadar *MDA* plasma *Rattus norvegicus* galur Wistar yang terpapar asap rokok?
- 1.2.2. Apakah pemberian ekstrak bayam per oral dapat mencegah penurunan aktifitas *GSH-Px* eritrosit *Rattus norvegicus* galur Wistar yang terpapar asap rokok?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah mempelajari pengaruh ekstrak bayam terhadap radikal bebas dan aktifitas antioksidan pada eritrosit *Rattus norvegicus* galur Wistar yang terpapar asap rokok .

1.3.2. Tujuan khusus

- 1.3.2.1. Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak bayam per oral pada kadar *MDA* plasma *Rattus norvegicus* galur Wistar yang terpapar asap rokok.
- 1.3.2.2. Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak bayam per oral pada aktifitas *GSH-Px* setelah *Rattus norvegicus* galur Wistar terpapar asap rokok.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat akademis

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat diperoleh informasi dan data ilmiah tentang pengaruh ekstrak bayam terhadap perubahan kadar *MDA* dan aktifitas *GSH-Px* eritrosit *Rattus norvegicus* galur Wistar yang terpapar asap rokok .

1.4.2. Manfaat praktis

- 1.4.2.1. Mengetahui cara mudah dan murah dalam menghambat serangan radikal bebas dalam tubuh yang dapat menyebabkan beberapa gangguan kesehatan seperti kanker, diabetes melitus, penuaan dini dan penyakit kardiovaskuler
- 1.4.2.2. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan pengembangan *diversifikasi* makanan yang sehat.
- 1.4.2.3. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan meneliti manfaat bayam yang lain atau produk yang berasal dari bayam.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Radikal bebas, *stress oksidatif* dan antioksidan menjadi tema yang banyak dibicarakan dalam diskusi mekanisme penyakit modern. Hal ini disebabkan metabolisme radikal bebas menempati posisi sentral dari berbagai penyakit pada manusia yang nampaknya tidak berhubungan. Radikal bebas ini banyak dihasilkan oleh adanya reaksi oksidasi yang berlebihan yang terjadi dalam tubuh. Tampaknya oksigen merupakan sesuatu yang paradoksal dalam tubuh. Molekul ini sangat diperlukan atau mutlak diperlukan bagi organisme aerob, karena memberikan energi pada tubuh. Namun dalam kondisi tertentu keberadaannya justru berimplikasi pada banyak penyakit dalam tubuh kita, kondisi degeneratif, aging, arthritis, kanker dan lain-lain(Cord, 2000 dan Winarsi, 2007).

Radikal bebas merupakan salah satu bentuk senyawa oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species*) yang sedikitnya memiliki satu elektron tidak berpasangan. Senyawa ini berbeda dengan oksidan, dimana oksidan merupakan senyawa yang mendonorkan elektron(Chord, 2000). Radikal bebas merupakan molekul tidak stabil dan mampu menyerang sel tubuh yang sehat. Radikal bebas, sangat reaktif terhadap molekul lain yang berada di dekatnya, berusaha merampas elektron milik molekul lain guna mendapatkan kondisi stabil kembali. Radikal bebas pada umumnya merupakan oksidator kuat yang dapat membahayakan komponen sel. Dalam keadaan normal radikal bebas dihasilkan dalam proses fisiologi sel, tetapi dapat diatasi dengan sangat baik oleh sistem antioksidan dalam sel itu, yang meliputi beberapa enzim seperti *superoksida dismutase*, katalase, dan *glutation peroksidase*. Selain enzim juga

makromolekul seperti *albumin*, *seruloplasmin* dan *ferritin*. Susunan beberapa molekul dengan berat massa rendah juga terlibat diantaranya asam askorbat, α -tokoferol(vitamin E), β -karoten, *glutation tereduksi*(GSH), dan *billirubin* juga memiliki efek sebagai antioksidan(Cao *et al.*, 2007)

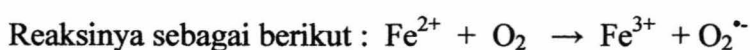
2.1. Reactive Oxygen Species (ROS)

2.1.1. Macam Reactive Oxygen Species

2.1.1.1.Radikal anion superoksida($O_2^{\cdot-}$)

Radikal ini juga disebut anion superoksida, dan dibentuk oleh beberapa sel yang memiliki rantai transport elektron seperti mitokondria, mikrosom, glioksisom, sitosol sehingga pada organella tersebut ditemukan enzim *Superoksida Dismutase*. Pembentukan radikal bebas ini melalui beberapa mekanisme sebagai berikut(Young Son, 2005 dan Winarsi, 2007):

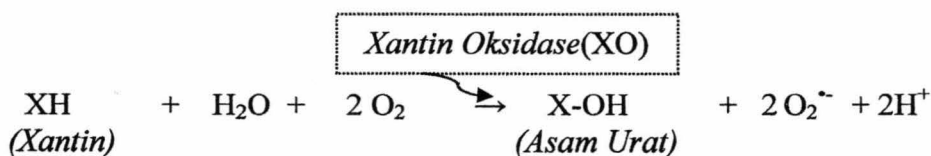
- a. Reaksi samping yang melibatkan Fe^{2+} , misalnya dalam proses *fosforilasi oksidatif* dan *oksigenasi hemoglobin*, *hidroksilasi* oleh enzim *monooksigenase*(dalam sitokrom P450 dan sitokrom b_4)



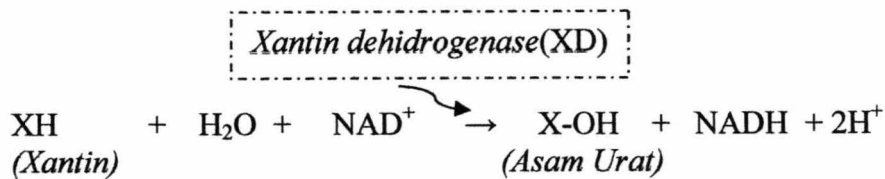
- b. Reaksi dalam mitokondria dan granulosit yang dikatalis oleh NADH/ NADPH oksidase :



- c. Reaksi yang dikatalis oleh enzim *Xantin Oksidase*(XO)



Menurut Suryohudoyo(1993), dalam keadaan normal sel mamalia tidak mengandung enzim XO, tetapi yang ada adalah enzim *Xantin dehidrogenase* (XD) yang mengkatalis reaksi :



Pada saat terjadi iskemia atau hipoksi, enzim ini mengalami proteolisis dan berubah menjadi Xantin Oksidase(XO) yang bersifat irreversible.

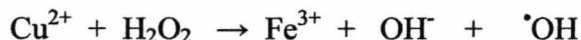
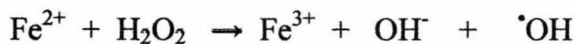


2.1.1.2.Hidrogen peroksida(H₂O₂)

Senyawa oksidan ini terbentuk karena aktivasi enzim oksidase yang mengkatalisis reaksi dalam RE(Retikulum Endoplasma) dan peroksisom:



Hidrogen peroksida dapat juga membentuk radikal hidroksil bila bereaksi dengan logam transisi dalam reaksi *Fenton* :



Radikal hidroksil ini dapat menghambat pertumbuhan seseorang dan menghambat *apoptosis* sejumlah sel(Young Son, 2005 dan Winarsi , 2007).

2..1.1.3. Radikal peroksil(OOH[•])

Radikal anion superoksida tidak terlalu reaktif dibanding perubahannya yaitu radikal peroksil, dimana anion superoksida menerima satu proton sehingga berubah menjadi radikal peroksil : $2 \text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{OOH}^{\cdot}$

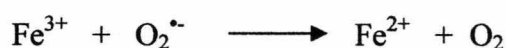
Radikal peroksil ini sangat reaktif dan akan membentuk radikal bebas baru melalui reaksi sebagai berikut:



Dari reaksi ini radikal peroksil lebih berbahaya dari pada H_2O_2 (Young Son, 2005 dan Winarsi, 2007).

2.1.1.4. Radikal hidroksil(OH^{\bullet})

Radikal ini yang paling berbahaya bagi sistem biologi karena sangat reaktif dan segera akan bereaksi dengan biomolekul di sekitarnya. Radikal ini bukan radikal primer tetapi terbentuk dari peroksida dan anion superoksida ($\text{O}_2^{\bullet-}$) dengan reaksi *Haber-Weis* dan *Fenton*. Reaksinya sebagai berikut ;



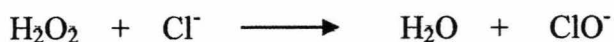
2.1.1.5. Singlet oksigen($^1\text{O}_2$)

Radikal ini memiliki reaktifitas yang jauh lebih tinggi dibanding dengan oksigen dalam keadaan *ground state*. Reaktifitas senyawa ini disebabkan karena 2 elektron tunggalnya disatukan dalam satu orbital dengan putaran yang berlawanan, sehingga terdapat satu orbital kosong akibatnya mudah ditempati oleh sepasang elektron dengan putaran yang berlawanan. Senyawa ini terbentuk dari beberapa reaksi enzimatik dalam tubuh, diantaranya :

- a. Enzim *monooksidase* yang menggunakan sitokrom 450 dengan substrat peroksida:



- b. Enzim *prostaglandin endoperoksida sintetase*, suatu enzim yang berperan dalam pembentukan prostaglandin dari asam arakidonat.
- c. Reaksi yang dikatalis oleh *mieloperoksidase*, reaksinya sebagai berikut :



Radikal singlet oksigen ini dapat mengoksidasi berbagai senyawa dalam sel (Suryohudoyo, 1993).

2.1.1.6. Nitritoksida (NO•)

Radikal nitritoksida ada dalam fase gas dan berperan dalam proses fisiologi vaskuler. *Endotelium vaskuler* menghasilkan nitritoksida seperti juga neutrofil dan makrofage yang menghasilkan nitritoksida dengan menggunakan enzim *nitritoksida sintetase* (Young Son, 2005 dan Winarsi, 2007). Menurut Baynes and Dominiczak (2005) Nitritoksida merupakan molekul signal penting dalam aktifitas *neurotransmitter* dan sebagai regulator sistem transport elektron. Radikal ini berkompetisi dengan Oksigen untuk oksidasi sitokrom (*komplek IV*) dan dapat menghambat pembentukan ATP. Radikal ini bereaksi dengan $\text{O}_2^{\bullet-}$ membentuk *peroksil nitrit* (ONOO⁻) yang memiliki reaktifitas tinggi.

2.1.2. Sumber Radikal Bebas

Sumber radikal bebas ada 2 macam, yaitu yang berasal dari tubuh sendiri dinamakan radikal bebas *endogen* dan yang berasal dari luar tubuh dinamakan radikal bebas *eksogen*. Radikal bebas yang bersumber dari dalam tubuh kita sendiri dapat berasal dari proses *autooksidasi* seperti *katekolamin*, hemoglobin, mioglobin,

sitokrom C tereduksi atau *thiol*. Dari proses *autooksidasi* tersebut menghasilkan radikal anion superoksida yang merupakan radikal bebas primer.

Oksidasi enzimatik dapat juga menghasilkan radikal bebas seperti oksidasi oleh *xantin oksidase*, *prostaglandin sintase*, *lipogenase*, *aldehid oksidase* dan *amino acid oksidase*. Enzim *mieloperoksidase* dalam neutrofil menggunakan hidrogen peroksida untuk mengoksidasi ion klorid menghasilkan oksidan asam hidroklorid yang reaktif. Ledakan respirasi (*respiratory burst*) pada sel fagositik yang banyak mengkonsumsi oksigen selama proses fagositosis dapat menghasilkan anion superoksida, selanjutnya radikal bebas ini diubah menjadi H_2O_2 dengan proses *dismutasi* dan akibatnya dihasilkan $\cdot OH$ dan $HOCl$. Organela sub selular seperti mitokondria, mikrosom, kloroplast, peroksisom dan nukleus juga menghasilkan radikal bebas $O_2^{\cdot -}$. Mitokondria merupakan organela selular utama sebagai tempat reaksi oksidasi dan merupakan sumber utama oksigen tereduksi. Ion logam transisi seperti Fe dan Cu memiliki peran utama dalam produksi radikal bebas dan penyebab peroksidasi lipid. Ion logam transisi ini berperan dalam reaksi *Haber- Weiss* yang menghasilkan radikal hidroksil dari $O_2^{\cdot -}$ dan H_2O_2 (Young Son, 2005 dan Winarsi, 2007). Kurang lebih 1% - 3% Oksigen yang kita hirup dari udara digunakan untuk membentuk radikal bebas $O_2^{\cdot -}$. Selama mengkonsumsi oksigen kita dapat menghasilkan lebih dari 2 kg anion superoksida ($O_2^{\cdot -}$) dalam tubuh per tahun, pada orang yang menderita infeksi kronis tentu lebih banyak lagi (Wijaya, 1996).

Radikal bebas dari luar dapat berasal dari berbagai macam sumber seperti: asap rokok, obat-obatan, radiasi, partikel anorganik dan gas tertentu seperti *Ozone* (Strauss, 2001). Radikal bebas terbentuk akibat respon terhadap radiasi sinar ultraviolet, polusi lingkungan, merokok, hiperoksia atau karena olah raga yang berlebihan dan iskemia. Radiasi gelombang elektromagnetik dengan panjang

gelombang pendek seperti sinar gamma dapat memecah air dalam tubuh dan menghasilkan radikal hidroksil yang akan menyerang molekul sekitarnya untuk memulai reaksi berantai (Wijaya, 1996).

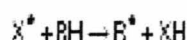
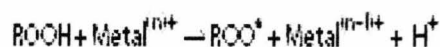
2.1.3. Pengaruh Radikal Bebas

Akibat negatif radikal bebas disebabkan karena reaktifitasnya yang tinggi, akibatnya dapat merusak komponen penting sel sehingga mempengaruhi integritas dan kehidupan sel itu. Di dalam sel hidup radikal bebas terbentuk di dalam membran sel, mitokondria, peroksisom, retikulum endoplasmik dan sitosol melalui reaksi enzimatik yang berlangsung (Murray *et al.*, 2003).

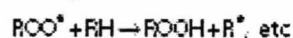
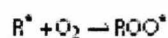
2.1.3.1. Membran sel

Membran sel tersusun oleh fosfolipid yang kaya akan asam lemak tidak jenuh ganda atau PUFA (*Poliunsaturated Fatty Acid*) yang sangat rentan terhadap agen oksidator. Proses teroksidasi lemak ini dinamakan peroksidasi lipid. Hal ini akan membahayakan stabilitas sel (Winarsi, 2007). Peroksidasi lipid tidak hanya bertanggung jawab terhadap perusakan makanan tetapi juga kerusakan jaringan tubuh dan secara *invitro* dapat menimbulkan peradangan, aterosklerosis, kanker, proses penuaan dan lain-lain. Peroksidasi lipid terjadi melalui 3 tahapan, yaitu *inisiasi*, *propagasi* dan *terminasi* (Murray *et al.*, 2003). Reaksinya sebagai berikut:

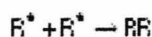
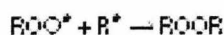
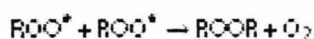
1). Reaksi *inisiasi* :



2). Reaksi *propagasi* :

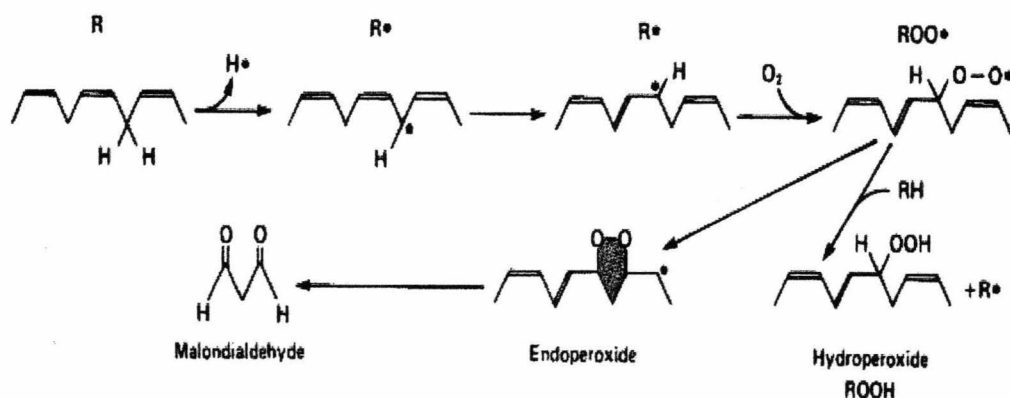


3). Reaksi terminasi



Peroksidasi lipid pada membran sel menyebabkan hilangnya *fluiditas* membran sel sehingga meningkatkan permeabilitasnya, akibatnya kehilangan protein sitoplasmik, selain itu yang lebih berbahaya adalah terbentuknya radikal peroksil yang akan mengawali reaksi berantai. Radikal peroksil ini dapat terbawa aliran darah sehingga akan mengawali reaksi peroksidasi lipid di tempat lain yang jauh dari lokasi awalnya (Sjodin *et al.*, 1990). Senyawa *MDA* (*Malondialdehyde*) merupakan dialdehid ($C_3H_4O_2$) hasil akhir dari peroksidasi lipid membran (Pryor *et al.*, 1976). Senyawa *MDA* merupakan produk oksidasi asam lemak tidak jenuh oleh radikal bebas, juga merupakan metabolit komponen sel yang dihasilkan oleh radikal bebas. Senyawa ini dihasilkan dalam peroksidasi lipid (Conti *et al.*, 1991, Halliwell dan Gutteridge, 1991)

Reaksinya adalah sebagai berikut :



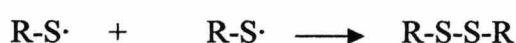
Gambar 2.1. Peroksidasi lipid yang menghasilkan *MDA*

Akibat akhir dari reaksi berantai ini adalah terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa yang bersifat toksik terhadap sel antara lain aldehida-

aldehida seperti *MDA*, *9-hidroksi-nonenal*, serta berbagai hidrokarbon seperti etana dan pentane. *MDA* ini sering digunakan sebagai indikator proses peroksidasi lipid dalam jaringan biologi. Ada beberapa metoda lain untuk menentukan peroksidasi lipid hanya tingkat kesalahan cukup tinggi (Suryohudoyo, 1993 dan Sjodin *et al.*, 1990). Konsentrasi *MDA* yang tinggi menunjukkan adanya proses oksidasi di dalam membran sel. Status antioksidan yang tinggi biasanya diikuti oleh penurunan kadar *MDA* (Winarsi, 2007). Eksperimen secara invitro membuktikan bahwa fase gas dari asap rokok menyebabkan peroksidasi lipid dalam plasma eritrosit manusia (Hecht, 1999).

2.1.3.2. Protein

Protein tersusun dari rangkaian asam amino dengan ikatan peptida. Fungsi biologi dari protein tergantung oleh interaksi antar gugus pada molekul tersebut. Rantai samping protein sangat rentan terhadap serangan radikal bebas (Sadikin, 2000). Reaktifitas radikal oksigen terhadap asam amino pada protein berbeda-beda. Asam amino yang mengandung sulfur dan gugus thiol sangat sensitif terhadap radikal oksigen. Dalam hal ini akan membentuk radikal *tiil* yang kemudian *cross linking* membentuk ikatan *disulfida* (Farr dan Kogama, 1991). Diantara asam amino yang paling rawan adalah sistein. Asam amino sistein mengandung gugus sulfhidril yang rentan terhadap radikal bebas, reaksinya sebagai berikut:



Pembentukan ikatan disulfida ini menyebabkan ikatan antar dan inter molekul protein, sehingga protein tersebut kehilangan fungsi biologinya. Reaksi oksidasi pada protein dapat menghasilkan beberapa bentuk seperti asam amino termodifikasi, rantai peptida

terfragmentasi, produk *cross linking*, perubahan muatan listrik, dan produk yang mudah mengalami proteolisis(Suryohudoyo, 1993 dan Wijaya, 1996).

2.1.3.3.Molekul DNA

Oksigen yang teraktifasi dapat menginduksi *lesi* pada DNA yang dapat menyebabkan cacat, mutasi bahkan kematian. Kerusakan DNA ditunjukkan oleh bagian ribosa yang mudah mengalami oksidasi sehingga dapat mengalami degradasi dan rusaknya struktur *single strand* serta protein *cross linking* (Imlay dan Linn, 1986). Radikal bebas juga dapat menyebabkan perubahan pada DNA seperti *hidroksilasi* basa timin dan sitosin, pembukaan inti purin dan pirimidin, serta terputusnya rantai *fosfodiester*. Kerusakan kecil dapat diperbaiki oleh sistem *DNA-repair*, namun kerusakan besar misalnya putus pada berbagai tempat tidak dapat diperbaiki, akibatnya replikasi sel terganggu. Produk oksidasi DNA yang dapat diukur adalah *8-hidrodeoksiguanosin*, *5-hidroksimetilurasil* dalam urin, konjugasi *MDA-guanin* dalam urin dan *autoantibodi* yang menyerang DNA teroksidasi(Favier, 1982 dan Wijaya, 1996).

2. 2. Antioksidan

Pengendalian kadar *ROS* untuk melindungi sel pada kondisi stress terdiri dari enzim penangkap *ROS* seperti *superoksida dismutase(SOD)*, *Katalase*, *peroksidase* dan *glutation peROSksidase* (GSH-Px) atau dilakukan dengan detoksifikasi produk lipid peroksidasi(*glutation S-transferase*, *fosfolipid hidroperoksid glutathione peroksidase* dan *ascorbat peroksidase*) dan bisa juga dilakukan oleh jaringan kerja dari antioksidan berberat molekul rendah seperti askorbat, glutation, senyawa

phenolik, dan tokoferol. Semua ini diperlukan untuk meregenerasi bentuk aktif antioksidan (Blokhina *et al.*, 2003).

Antioksidan adalah suatu senyawa yang ada pada konsentrasi rendah dapat menurunkan oksidasi substrat. Secara kimiawi antioksidan merupakan senyawa yang dapat mendonorkan elektron atau secara biologis antioksidan merupakan senyawa yang dapat menangkal dampak dari oksidan dalam tubuh. Keseimbangan oksidan dan antioksidan dalam tubuh sangat penting karena berhubungan dengan sistem pertahanan tubuh (Winarsi, 2007). Perlakuan dengan menggunakan konsentrat makanan dari tumbuhan yang mengandung β -karoten dapat meningkatkan potensi antioksidan dan status lipid dalam tubuh (Ziccarelli and Basu, 2003)

2.2.1. Macam antioksidan

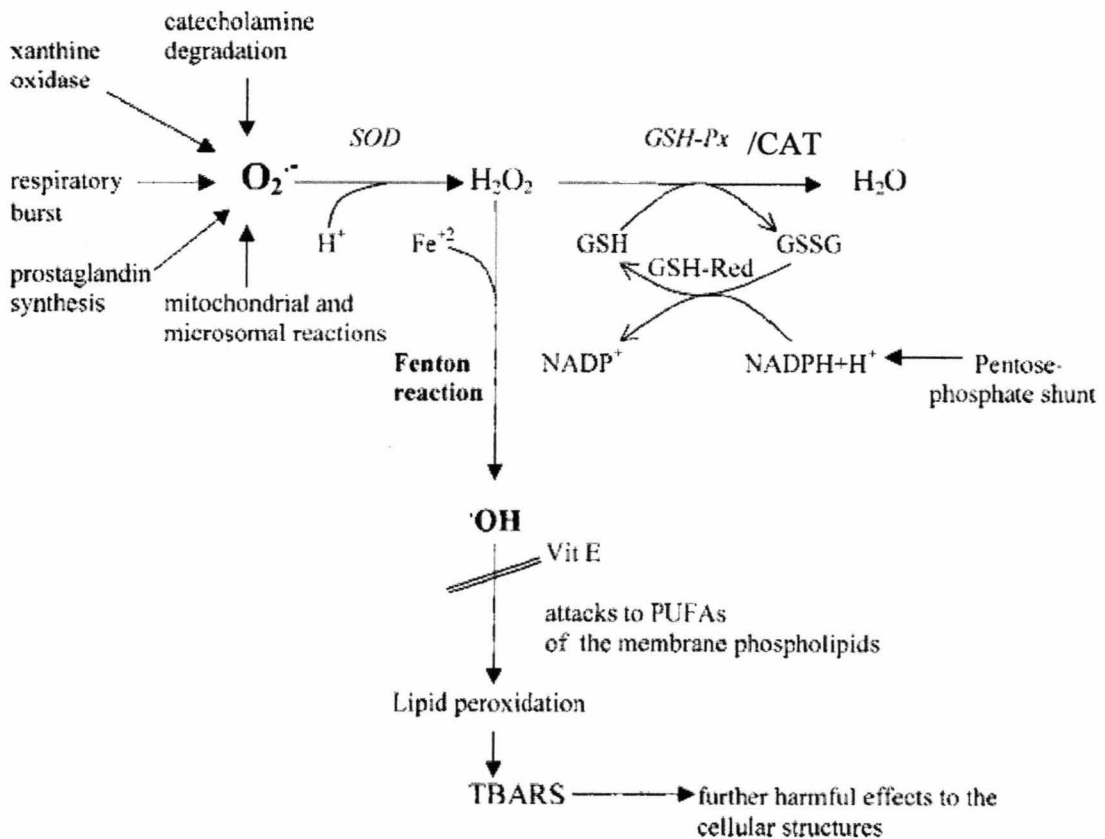
Berdasarkan sumbernya ada beberapa antioksidan diantaranya adalah antioksidan *endogen* atau *primer* yang berasal dari dalam tubuh kita sendiri dan antioksidan *eksogen* yang berasal dari luar tubuh atau *sekunder* (Winarsi, 2007 dan Youngson, 2005).

2.2.1.1. Antioksidan endogen

Menurut Cord (1979) yang termasuk antioksidan primer meliputi *superoksida dismutase (SOD)*, *katalase*, *glutation peroksidase (GSH-Px)*. Antioksidan primer disebut antioksidan enzimatis. Antioksidan ini bekerja dengan cara mencegah pembentukan radikal bebas baru atau mengubah radikal bebas yang telah terbentuk menjadi senyawa yang lebih stabil (Winarsi, 2007). *SOD* merupakan enzim yang mengandung logam Zn, Cu atau Mn. Enzim Mn-SOD terletak di dalam mitokondria, Zn-SOD dan Cu-SOD ada di dalam sitosol. Sekitar 80% radikal anion superoksida

direduksi di mitokondria oleh Mn-SOD selebihnya keluar ke sitosol. Katalase banyak dijumpai di dalam peroksisom, GSH-Px dan GSH banyak dijumpai di dalam mitokondria dan sitosol. GSH-Px memiliki afinitas yang lebih tinggi dibanding dengan katalase(Sjodin, 1990).

Kerja antioksidan endogen saling terkait satu dengan yang lain dalam memerangi radikal bebas yang dihasilkan dalam peroksidasi lipid(Marks *et al.*, 2000 dan Herken H. *et al.*, 2001). Secara skematis dapat dilihat pada gambar sebagai berikut:



Keterangan : $O_2^{\cdot-}$: superoxide; SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; H_2O_2 : hydrogen peroxide; GSH-Px : glutathione peroxidase; GSH : glutathione tereduksi; GSSG: glutathione teroksidasi; GSH-Red: glutathione reductase; $\cdot OH$:radical hydroxyl; PUFA: polyunsaturated fatty acid; TBARS: thiobarbituric acid-reactive substances.

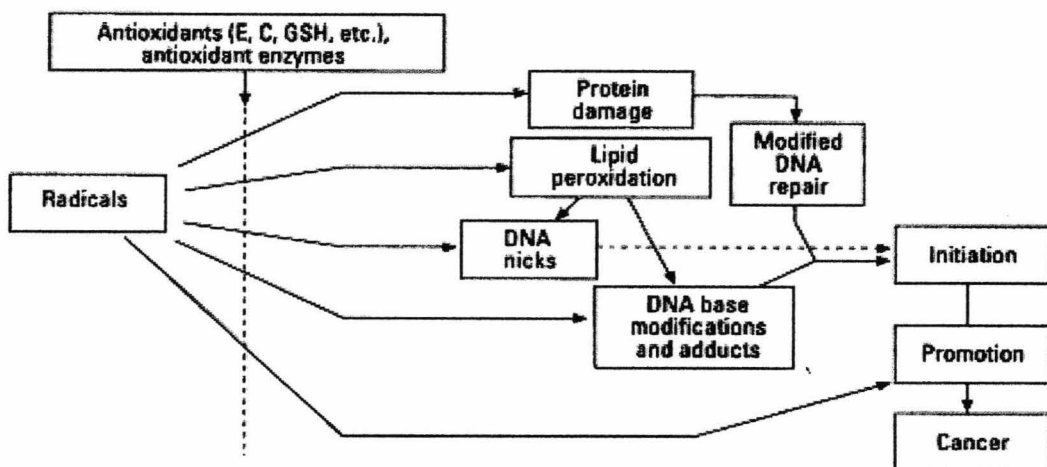
Gambar 2.2. Skema sistem antioksidan endogen dan peroksidasi lipid.

2.2.1.2. Antioksidan eksogen

Antioksidan ini sering dinamakan antioksidan non enzimatis dan dimasukkan dalam kelompok antioksidan preventif. Senyawa golongan ini mencegah terbentuknya oksigen reaktif dengan cara *pengkelatan* metal atau dirusak pembentukannya. Pengkelatan logam terjadi dalam cairan ekstraselular. Cara kerja antioksidan ini dengan memotong reaksi berantai dari radikal bebas atau dengan menangkapnya, akibatnya radikal bebas tidak bereaksi dengan komponen selular. Yang termasuk dalam kelompok ini adalah vitamin E, vitamin C, karoten, flavonoid, bilirubin dan albumin. Penelitian secara *invitro* menunjukkan bahwa peroksidasi lipid yang disebabkan oleh asap rokok dapat dicegah dengan penambahan asam askorbat (Hecht, 1999 dan Winarsi, 2007).

2.2.2. Kerja antioksidan

Menurut Pryor(1997), efek radikal bebas dan cara kerja antioksidan dalam menanggulangi efek yang ditimbulkan radikal bebas dapat digambarkan seperti skema berikut ini :



Gambar 2.3. Skema jalur radikal bebas dalam mempengaruhi munculnya kanker dan peranan antioksidan.

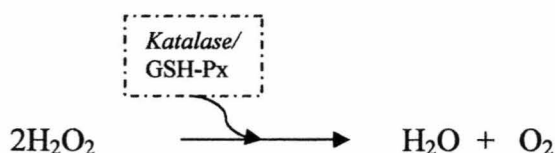
Berdasarkan cara kerjanya atau mekanisme kerjanya antioksidan dapat dibedakan menjadi 2 golongan yaitu antioksidan pencegah dan antioksidan pemutus rantai (Suryohudoyo, 2000 dan Young *et al.*, 2000).

2.2.2.1. Antioksidan pencegah reaksi berantai

Antioksidan ini terdiri dari antioksidan enzimatik seperti *SOD*, *katalase*, *GSH-Px*. Selain juga terdiri dari logam transisi yang terikat pada protein seperti feritin, transferin, laktoferin dan seruloplasmin (Suryohudoyo, 2000 dan Young *et al.*, 2000). Fungsi *SOD* dapat melindungi organisme aerob dari kemungkinan efek anion superoksida yang merusak. Reaksinya sebagai berikut :



Enzim *GSH-Px* dan *katalase* menunjukkan potensinya dengan mengubah H_2O_2 hasil dismutasi yang dilakukan oleh *SOD* menjadi H_2O (Winarsi, 2007). Reaksinya sebagai berikut :



2.2.2.2. Antioksidan pemutus rantai

Yang termasuk dalam kelompok ini adalah antioksidan yang molekulnya dapat memberikan elektronnya pada radikal bebas, sehingga menghasilkan produk yang stabil. Disamping bersifat sebagai peredam radikal bebas, antioksidan ini dapat berperan sebagai *prooksidan*. Dalam keadaan tertentu keberadaan antioksidan dapat

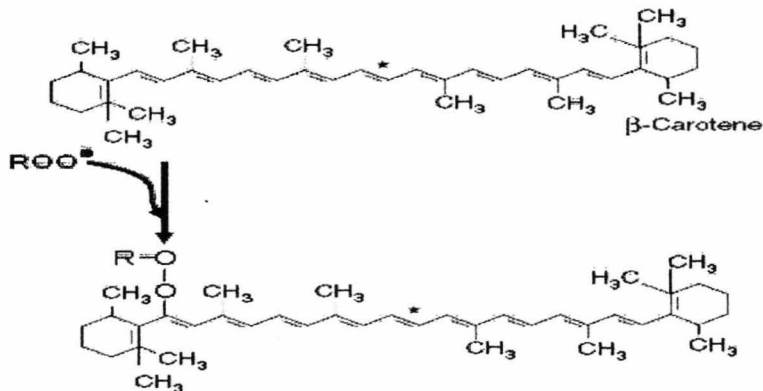
betindak berlawanan dengan meningkatnya kerusakan oksidatif. Antioksidan ini misalnya vitamin E(*tokoferol*), vitamin C(asam ascorbat), β -karoten, glutation dan sistein(Suryohudoyo, 1993 dan Young *et al.*, 2000).

Antioksidan pemutus rantai sering berupa senyawa *fenol* atau senyawa *aromatic*. Yang termasuk kelompok ini adalah vitamin E yang bekerja pada fase lemak pada membran sel, untuk menangkap radikal *peroksil* yaitu *peroksi lipid* (ROO^{\bullet}). Struktur hidrofobik yang melekat pada tokoferol yaitu $-OH$ mudah dipindahkan, oleh karena itu *peroksil* dan *alkoksil radikal* yang terbentuk selama peroksidasi lipid mudah berikatan dengan antioksidan ini(Halliwell, 1991 dan Murray *et al.*, 2003).

Reaksinya sebagai berikut :



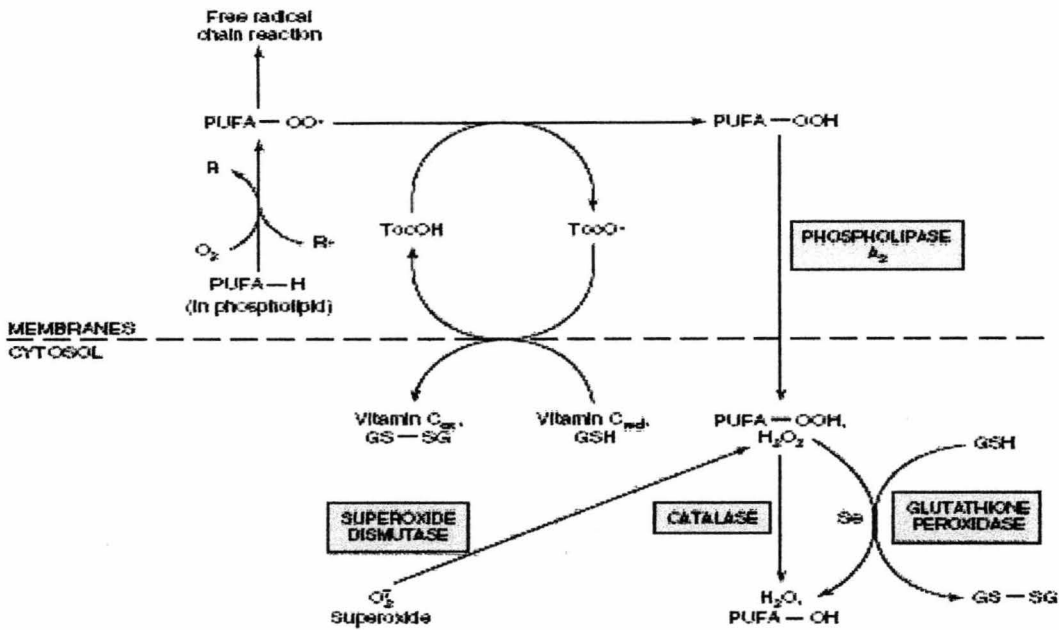
β -karoten sebagai antioksidan bekerja melindungi tubuh dengan cara reaksi penangkapan singlet oksigen atau dengan melalui reaksinya dengan produk reaksi peroksidasi lipid pada gugus terminal. Potensi β -karoten untuk menangkap singlet oksigen diduga melalui ikatan rangkapnya pada rantai karbonnya(Winarsi, 2007). β -karoten merupakan antioksidan yang mempunyai peran dalam menangkap radikal peroksil dalam jaringan pada tekanan parsial oksigen rendah. Kemampuan ini melengkapi kemampuan vitamin E yang efektif pada konsentrasi oksigen yang lebih tinggi(Murray *et al.*,2000). Penangkapan radikal peroksil dapat dilihat pada gambar sebagai berikut :



Gambar 2.4. Fungsi β -karoten sebagai antioksidan

Dari gambar di atas terlihat radikal peroksil yang terbentuk pada peroksidasi lipid tidak melanjutkan reaksi berantainya tetapi ditangkap oleh β -karoten sehingga reaksi peroksidasi lipid terhenti. Oleh karena itu β -karoten dikelompokkan sebagai antioksidan pemutus rantai. β -karoten suatu prekursor vitamin A pada tumbuhan dapat menangkap radikal hidroksil, sedangkan senyawa *sulfhidril* seperti GSH, methionin, dan askorbat dapat mereduksi metabolit oksigen reaktif dan menurunkan potensi oksidasinya.

Asam askorbat bersifat hidrofilik yang berfungsi paling baik dalam lingkungan air, senyawa ini dapat bereaksi langsung dengan superoksida dan hidroksil dan berbagai hidroperoksil lemak. Askorbat juga dapat mereduksi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} dimana keberadaan ion logam transisi ini memacu terbentuknya radikal hidroksil. Namun fungsi askorbat sebagai antioksidan pemutus rantai adalah perannya untuk melakukan regenerasi bentuk vitamin E tereduksi (Marks *et al.*, 2000). Dalam sistem antioksidan ada interaksi antara antioksidan satu dengan yang lainnya. Interaksi antara sistem antioksidan di dalam fase lipid pada membran sel dan fase air yaitu pada sitoplasma dapat dilihat pada skema berikut ini (Murray *et al.*, 2003):



Gambar 2.5. Interaksi dan sinergisme di antara sistem antioksidan yang bekerja pada fase lipid (membran sel) dengan fase air (sitosol).

Reaksi oksidasi terjadi setiap saat dan tubuh mutlak memerlukan reaksi tersebut. Pada sistem pernafasan kita sangat membutuhkan oksigen yang digunakan untuk mengoksidasi zat makanan yang kita makan supaya menghasilkan energi. Namun dalam reaksi tersebut dapat mencetuskan munculnya radikal bebas yang sangat reaktif dan dapat merusak struktural maupun fungsional sel. Walaupun demikian tubuh dilengkapi dengan sistem antioksidan yang menghambat atau menetralkan terbentuknya radikal bebas. Namun dalam keadaan tertentu sistem tubuh tidak mampu meredam adanya radikal bebas dalam tubuh sehingga menghasilkan beberapa gangguan yang dapat terakumulasi menjadi beberapa gangguan kesehatan atau bahkan penyakit atau lebih gawat lagi adalah kematian individu (Winarsi, 2007).

2.3. Rokok

2.3.1. Komposisi asap rokok

Pada tahun 1994 kurang lebih 15 juta anak terpapar asap rokok dari orang lain, 43% anak hidup atau tinggal dalam keluarga dengan paling sedikit satu orang perokok (Strauss, 2001). Asap rokok terbagi menjadi 2 fase yaitu fase gas dan padat atau *tar*. Asap rokok mengandung banyak radikal bebas. Fase gas asap rokok mengandung lebih dari 600 μg nitrid oxid, dan pada *tar* rokok mengandung radikal bebas yang stabil yaitu *quinine-hidroquinone kompleks*. Penelitian selanjutnya menunjukkan bahwa radikal bebas dalam *tar* rokok atau disebut sistem radikal *tar* (*semiquinone, hydroquinone dan quinine*) menyebabkan siklus redoks yang menghasilkan *anion superoksida* dan mengarah pada pembentukan hydrogen peroksida dan radikal hidroksil (Strauss, 2001).

Radikal bebas Nitrogen dioksida dalam asap rokok dapat mengawali autooksidasi PUFA membran sel yang memicu terbentuknya *peroksil lipid*. Rokok juga dapat menyebabkan menurunnya aktifitas enzim yang bergantung pada gugus thiol seperti GSH-Px dan SOD yang merupakan komponen sistem pertahanan sel untuk melawan serangan radikal bebas (Leonard *et al.*, 1995). Asap rokok juga mengandung bahan-bahan kimia yang merupakan campuran antara gas, partikel dan cairan serta oksidan. Bahan kimia rokok ada yang bersifat iritatif terhadap membran di mulut, faring dan trachea. Beberapa efek campuran bahan kimia dalam rokok terhadap jaringan tubuh dapat dirangkum dalam tabel di bawah ini (Revianti, 2005).

Tabel 2.1. Kandungan asap rokok

| Bahan | Efek |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Komponen Gas : <ul style="list-style-type: none"> ➤ Karbon monoksida ➤ Asam hidrosianik ➤ ^oNO, ^oNO₂ ➤ Volatile Aldehyde (asetaldehid, formaldehid, acrolein) ➤ Amonia ➤ Benzen ➤ Aseton ➤ Vinil klorida ➤ Unsaturated hydrocarbon ➤ Karbon dioksida | Gangguan transport dan pengguaan O ₂ Siliotoksin dan iritasi Karsinogen Siliotoksin dan iritasi Siliotoksin dan iritasi Siliotoksin dan iritasi Siliotoksin dan iritasi Karsinogen Karsinogen |
| Komponen Partikel : <ul style="list-style-type: none"> ➤ Tar ➤ Nikotin ➤ Logam (cadmium, timbal, nikel, krom, arsenic) ➤ Phenol (<i>semiquinon, quinon</i>) ➤ Carcinogenik Hidrokarbon (<i>Benzopyrene, benzatracene, chrycene</i>) | Karsinogen Stimulator, depressor, ganglionik Karsinogen dan iritan Karsinogen dan iritan Karsinogen |

Sumber : (Amstrong dalam Revianti, 2005)

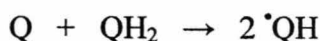
2.3.2. Rokok kretek

Rokok kretek merupakan salah satu rokok khas Indonesia dimana bahan utamanya selain tembakau juga cengkeh dan bahan lain yang ditambahkan pada proses pembuatannya. Tembakau sebagai bahan utama rokok kretek mempunyai kadar nikotin dan *tar* yang tinggi. Rokok kretek mempunyai kadar nikotin lebih dari 1,5mg dan kadar *tar* lebih dari 20mg dibanding rokok biasa yang kandungan nikotinnya dan *tar*nya tidak melebihi 1,5mg dan 20mg. Pada penelitian ini menggunakan rokok kretek karena mempunyai komponen yang lebih kompleks dari pada rokok biasa, sehingga memiliki kemampuan memicu radikal bebas yang lebih tinggi (Djamhuri, 1991)

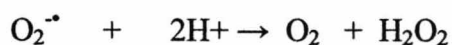
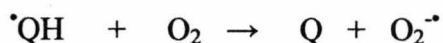
2.3.3. Radikal bebas dalam rokok

Asap rokok juga mengandung radikal bebas yang diperkirakan $10^{15} - 10^{18}$ molekul setiap hisapan rokok. Selain radikal bebas asap rokok juga mengandung substansi yang dapat memicu terbentuknya radikal bebas dalam tubuh. Substansi tersebut antara lain : *naftilamin, pyrene, benzo(a)pyrene, urethane, dibenzacridine, cadmium, dan dimethylnitrosamine* (Halliwell dan Gutteridge, 1999).

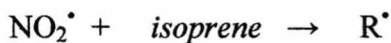
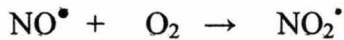
Komponen *Tar* mengandung radikal radikal bebas dengan konsentrasi yang tinggi (10^{18} molekul) tiap gramnya dan cukup stabil untuk waktu yang lama. Ada 3 macam radikal bebas dalam *tar* yaitu *semiquinon ($\dot{Q}H$)*, *anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$)* dan *hydrogen peroksida (H_2O_2)*. Semiquinon merupakan hasil reaksi antara quinon(Q) dengan hidroquinon(QH₂). Reaksinya sebagai berikut :



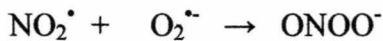
Semiquinon yang terbentuk dapat bereaksi dengan oksigen(O₂) sehingga terbentuk quinon(Q) kembali dan $O_2^{\cdot-}$, kemudian radikal bebas $O_2^{\cdot-}$ dapat mengalami reaksi dismutasi membentuk H₂O₂ (Pryor, 1997).



Kandungan radikal bebas pada komponen gas diantaranya adalah *nitrit-oksida (\dot{NO})*, *nitrogen-dioksida (\dot{NO}_2)* dan *peroksi-nitrit (ONOO \cdot)*. Pada umumnya konsentrasi radikal pada komponen gas selalu tinggi karena radikal bebas terbentuk setiap 10 menit, sehingga pada kenyataannya radikal bebas yang ditimbulkan oleh asap rokok terus meningkat seiring dengan bertambahnya waktu. Radikal \dot{NO} mengalami oksidasi membentuk radikal \dot{NO}_2 yang kemudian \dot{NO}_2 bereaksi dengan komponen rokok lain seperti *isoprene* membentuk radikal baru, reaksinya sebagai berikut :



Keberadaan radikal nitrit dioksida bila bereaksi dengan O_2^\bullet membentuk ion ONOO^- , reaksinya sebagai berikut :



Adanya oksida nitrogen dapat merangsang peroksidasi lipid dan mengoksidasi basa Nitrogen dalam molekul DNA. Asap rokok memacu munculnya peroksidasi lipid pada *eksplant* sel trachea tikus (Pryor, 1997). Asap rokok juga sering dihubungkan dengan penyakit *emfisema pulmoner*. Hal ini disebabkan karena asap rokok dapat menyebabkan berubahnya keseimbangan aktifitas enzim *protease* dan *antiprotease* pada paru-paru. Asap rokok banyak mengandung radikal bebas yang mencegah aktifitas inhibitor α -*protease* dan asap rokok menyebabkan meningkatnya akumulasi neutrofil di dalam paru-paru (Southorn, 1988).

2.4. Bayam

Bayam dikenal dengan nama ilmiah *Amaranthus spp.* dan dipromosikan sebagai sayuran daun yang bergizi bagi masyarakat di Negara berkembang. Di Indonesia Presiden Soeharto menaruh perhatian yang sangat besar terhadap bayam sebagai sumber gizi masyarakat di Nusantara ini. Sebagai wujud perhatiannya beliau menyerahkan 1400 kg bibit bayam kepada Ny. Supardjo Roestam sebagai ketua penggerak PKK di seluruh Indonesia, untuk disebar luarkan ke pos PKK diseluruh Indonesia. Bayam pertama kali dibudidayakan di Cina, Pada abad XI para pedagang Spanyol membawanya dari Cina ke Spanyol. Dari sana menyebar ke dunia Eropa di abad XIV. Sampai sekarang, tumbuhan ini sudah tersebar di daerah tropis dan subtropis seluruh dunia. Beberapa pusat penyebaran bayam antara lain Papuanugini,

Taiwan, Hongkong, India, Nigeria, Amerika Serikat dan Indonesia. Saat ini bayam sudah tersebar luas di seluruh daerah tropis dan daerah beriklim sedang (Rukmana, 2007).

2.4.1. Taksonomi dan morfologi

Bayam merupakan tumbuhan liar di pinggir jalan, kebun kosong, pagar atau ditanam sebagai tanaman hias pekarangan. Tanaman ini tumbuh di dataran rendah sampai pegunungan pada ketinggian 100m sampai 2300m di atas permukaan laut, berbunga pada bulan Juli- September. Waktu panen yang tepat pada bulan Maret-April. Bayam termasuk dalam suku (*familia*) Amaranthaceae. Kedudukan bayam dalam taksonomi adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Ordo : Caryophyllales
Family : Amaranthaceae
Genus : *Amaranthus*
Species : *Amaranthus tricolor L.*

Gambaran morfologi bayam adalah sebagai berikut :



Gambar 2.6. Morfologi *Amaranthus tricolor L.*

Di Indonesia, bayam dapat tumbuh sepanjang tahun dan ditemukan pada ketinggian 5m - 2.000m dpl, tumbuh di daerah panas dan dingin, tetapi tumbuh lebih subur di dataran rendah pada lahan terbuka yang udaranya agak panas. Bayam merupakan herba setahun, tegak atau agak condong, tinggi 0,4m -1m, dan bercabang. Batang bayam lemah dan berair, daun bertangkai, berbentuk bulat telur, lemas, panjang 5cm-8cm, ujung tumpul, pangkal runcing, serta warnanya hijau, merah, atau hijau keputihan. Bunga dalam tukul yang rapat, bagian bawah duduk di ketiak, bagian atas berkumpul menjadi karangan bunga di ujung tangkai dan ketiak percabangan dan berbentuk bulir. Bayam yang dijual di pasaran dan biasa dikonsumsi sebagai sayuran dikenal dengan bayam cabutan atau bayam sekul. Bayam merupakan tanaman berbunga yang termasuk dalam famili Amaranthaceae(Hernani dan Rahardjo, 2006).

Nama daerah untuk tanaman bayam ada banyak sekali diantaranya adalah : Jakarta: bayam glatik, bayam putih, bayam merah. Jawa: bayem abrit, bayam lemah, bayam ringgit, bayam sekul, bayam siti. Maluku: jawa lufife, tona ma gaahu, hohoru itoka tokara, baya roriha, loda kohori. Nama asing: Chinese spinach. Bayam kaya karotinoid termasuk di dalamnya : β -karoten, lutein dan quercetin yang memiliki sifat antioksidan(Hernani dan Rahardjo, 2006).

Bayam merupakan sayuran berdaun hijau yang kaya akan nutrisi seperti β -karoten dan vitamin C. Selain itu bayam juga mengandung zat besi dan kalsium. Bayam juga kaya akan karotinoid terutama lutein, dan β -karoten. Bayam juga menunjukkan aktifitas *ORAC*(*Oxygen Radikals Absorbans Capacity*) yang tinggi(Morelock T. *et al.* 2004). Pada tikus yang diberi makan diet yang diperkaya dengan Spirulina atau apel atau makanan yang memiliki aktifitas *ORAC* yang tinggi terjadi penurunan yang signifikan ekspresi dari sitokin dan penurunan *MDA* hal ini

menunjukkan diet tersebut menurunkan penanda *stress oksidatif* dan *neuroinflamantasi*(Cartford *et al.*, 2002)

2.4.2. Manfaat dan nutrisi bayam

Bagian yang digunakan adalah daun, atau seluruh bagian tanaman dalam keadaan segar atau setelah dikeringkan. Bayam dapat digunakan sebagai peluruh air seni, anti-diare, anti nyeri dan lain-lain(Somantri *dkk.*, 2007).

Bayam merupakan sayuran yang mengandung tingkat vitamin A, dan vitamin C yang tinggi(Morelock *et al.*, 2004). β -karoten sangat penting untuk mempengaruhi pertumbuhan pada umumnya, perlindungan mata, regulasi diferensiasi jaringan epitel dan perkembangan embrio. Asupan makanan bayam dan wortel secara signifikan dapat memperbaiki jumlah β -karoten dan karotinoid dalam tubuh(Tang *et al.*, 2005). Karotinoid dalam tanaman menentukan fungsi utama sebagai antioksidan melawan radikal bebas. Saat masuk dalam tubuh manusia senyawa-senyawa ini akan membentuk aktifitas antioksidannya dan kita dapat manfaat kesehatan yaitu perlindungan terhadap berbagai penyakit degeneratif, seperti pencegahan terhadap kanker(Kirkpatrick *et al.*, 1999). Ekstrak daun bayam kering yang diberikan pada tikus dengan dosis 66mg yang setara dengan 10g–20g daun bayam segar memberikan efek pertumbuhan dan pencegahan xerophthalmia yang memuaskan. Efek tersebut juga dijumpai pada anak-anak(Willimott and Wokes, 1927).

Perlakuan dengan antioksidan alami bayam dan *apocianin* pada tikus *Rattus* yang dipapar LPS(*Lipopolisacaride*) selama 8 hari dapat menurunkan indikasi kematian jaringan dan inflamasi yang disebabkan oleh LPS dari bakteri. Mekanisme terjadinya nekROSis dan inflamasi disebabkan karena munculnya radikal bebas yang dipicu oleh paparan LPS(Lomnitski *et al.*, 2000).

Berdasarkan kajian epidemiologi ada hubungan terbalik antara konsumsi buah dan sayur-sayuran dengan morbiditas dan mortalitas dari penyakit degeneratif. Kandungan antioksidan dalam buah dan sayuran berperan dalam perlindungan terhadap penyakit ini. Hal ini disebabkan karena berbagai macam antioksidan. Kapasitas total antioksidan (*TAC*) menunjukkan kapasitas kumulatif dari komponen makanan untuk menangkap radikal bebas. Dari hasil analisa makanan yang biasa dikonsumsi orang Italia yang terdiri dari 34 sayuran, 30 buah-buahan 34 minuman dan 6 minyak nabati dengan 3 analisa yang berbeda *TEAC* (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), *TRAP* (*Total Radikal Trapping Antioxidants Parameter*) dan *FRAP* (*Ferric Reducing Antioxidants Power*) diperoleh hasil bahwa dari sayuran yang memiliki kapasitas antioksidan tertinggi adalah bayam (Pelegriani 2003). Mengonsumsi strawberi, bayam dan anggur merah yang kaya akan antioksidan phenolik dapat meningkatkan kapasitas antioksidan dalam tubuh manusia (Guohua Cao *et al.* (1998).

Karotinoid adalah pigmen yang disintesa oleh tanaman dan memberi warna cerah pada sayuran dan tanaman. Ada sekilas 600 macam karotinoid di alam dan 40 macam karotenoid ada dalam makanan kita dan memiliki aktifitas sebagai antioksidan. Sayur-sayuran hijau seperti buncis, brokoli, kubis, kecambah, bayam kiwi, lecut, kacang, merupakan sumber dari *lutein*, *zea Xantin* dan β -karoten. Karotinoid jenis β -karoten paling banyak dipelajari karena yang paling banyak dalam tanaman. Gabungan antara karotinoid dan antioksidan lain seperti vitamin E dapat meningkatkan aktifitasnya dalam melawan radikal bebas (Paiva dan Russell, 1999).

Tabel 2.1. Kandungan zat gizi pada bayam setiap 100 gram bahan segar

| Macam Kandungan | Bayam putih ¹⁾ |
|-----------------------|---------------------------|
| Kalori (kal) | 36 |
| Protein (g) | 3.5 |
| Lemak (g) | 0.5 |
| Karbohidrat (g) | 6.5 |
| Kalsium (g) | 267 |
| Fosfor (mg) | 67 |
| Besi (mg) | 3.9 |
| Nilai vitamin A(S.I.) | 6090 |
| Vitamin C (mg) | 80 |
| Vitamin B1(mg) | 0,1 |
| Vitamin B2(mg) | - |
| Vitamin B9(μ g) | - |
| Vitamin E(mg) | - |
| Niacin | - |
| Serat | - |
| Air (gr) | 86.9 |
| B.d.d. (%) | 71 |

Keterangan : B.d.d. = Bagian yang dapat dimakan

Sumber : 1)Direktorat Gizi DepKes RI (1992)

Kadar zat gizi dalam bayam tersebut adalah kadar bahan mentah setiap 100 gram dari bagian yang dapat dimakan (b.d.d.). Proses pengolahan akan menurunkan beberapa kadar zat dalam makanan tersebut.

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konseptual

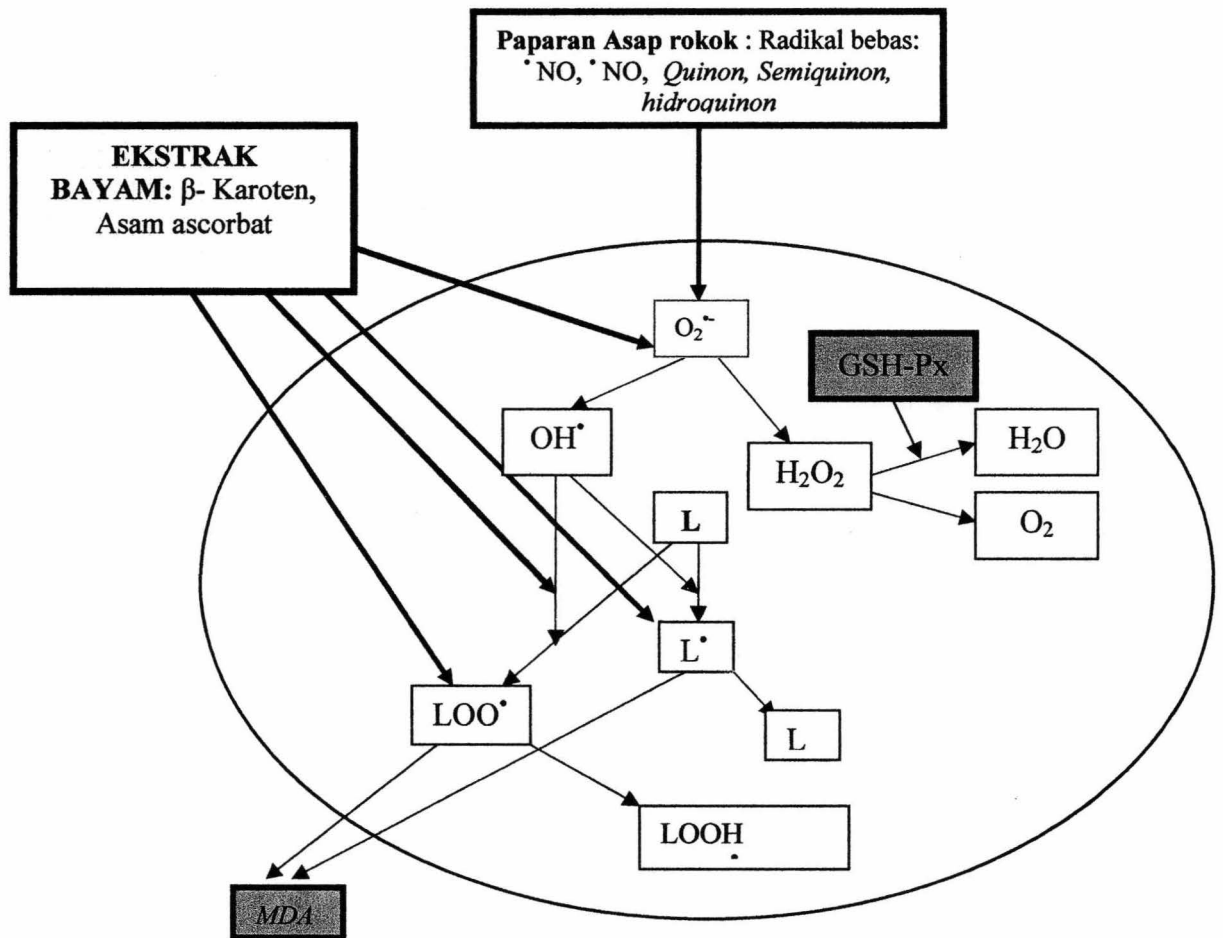
Banyak penyakit memiliki penyebab yang sama yaitu keadaan *stress oksidatif* oleh radikal bebas (Hernani dan Rahardjo, 2006 dan Winarsi, 2007). Radikal bebas merupakan oksidan yang berbahaya karena sangat reaktif untuk mengambil elektron dari molekul di sekitarnya sehingga molekul tersebut bersifat radikal. Radikal bebas menyebabkan terjadinya reaksi berantai (Suryohudoyo, 2000). Asap rokok mengandung radikal bebas dan peningkatan radikal bebas dalam tubuh dapat disebabkan oleh paparan asap rokok (Pryor, 1992).

Eritrosit memiliki fungsi fisiologis yang penting sebagai pengangkut oksigen dan karbondioksida (Murray *et al.*, 2003). Eritrosit memiliki membran yang tersusun oleh fosfolipid dan glikolipid yang mudah terserang oleh radikal bebas sehingga mengakibatkan terjadinya peroksidasi lipid yang akan menghasilkan MDA. Eritrosit dilengkapi dengan antioksidan SOD, GSH-Px dan katalase yang melindungi dari serangan radikal bebas. Eritrosit tidak memiliki inti sel dan organel intra sel sehingga bila aktifitas antioksidan enzimatis menurun akibat radikal bebas tidak dapat dibentuk lagi (Murray *et al.*, 2003).

Stress oksidatif akibat dari paparan radikal bebas saat ini semakin meningkat, oleh karena itu perlu adanya masukan antioksidan yang memadai. Makanan alami yang kelihatannya sangat sederhana tetapi sebenarnya merupakan makanan yang kaya zat yang sangat diperlukan tubuh untuk mempertahankan kesehatannya (Hernani dan Rahardjo, 2006). Salah satu makanan alami yang kaya akan zat yang diperlukan tubuh

adalah bayam(Rukmana, 2006). Bayam merupakan sayuran berdaun hijau yang kaya akan nutrisi seperti zat besi, kalsium, vitamin C, selain itu juga mengandung karotinoid terutama lutein, dan β -karoten. Bayam juga menunjukkan aktifitas *ORAC* yang tinggi(Morelock, 2004).

3.2. Kerangka Konseptual Penelitian



Keterangan :

- L : Lipid
- L \cdot : Radikal lipid
- LOO \cdot : Radikal peroksi lipid
- LOOH : Peroksi lipid
- $\text{O}_2^{\cdot-}$: Anion superoksida
- GSH-Px : Glutation peroksidase

- : Variabel yang diukur
- : Eritrosit

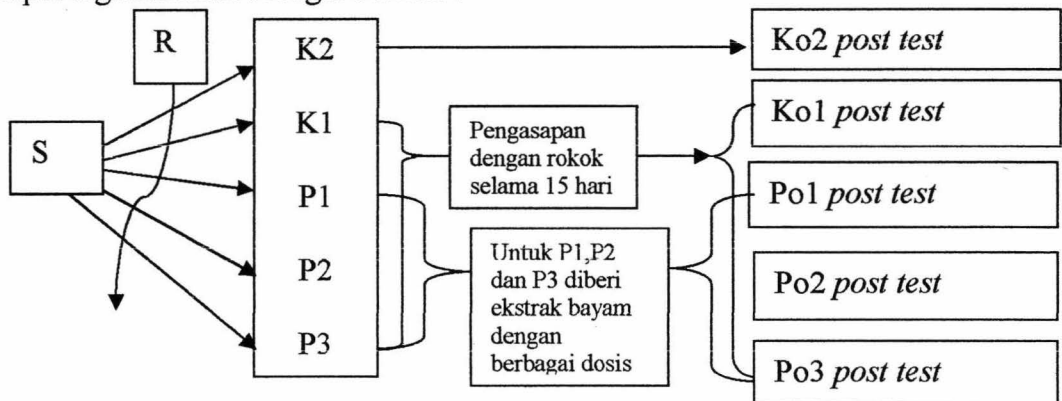
Gambar 3.1. Kerangka konseptual penelitian

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan *Extended Randomised Post test Only Control Design*. Secara skematis dapat digambarkan sebagai berikut :



Gambar 4.1. Skema rancangan penelitian

Keterangan :

- S : Sampel (terdiri dari 30 ekor *Rattus norvegicus*)
- R : Randomisasi, sampel dibagi dalam 5 kelompok, masing-masing terdiri dari 6 ekor *Rattus norvegicus*
- K1 : Kelompok kontrol positif (Tikus yang terpapar asap rokok tetapi tidak diberi ekstrak bayam)
- K2 : Kelompok kontrol negatif (Tikus yang tidak terpapar asap rokok dan tidak diberi ekstrak bayam)
- P1 : Kelompok suplementasi dengan ekstrak bayam 1ml
- P2 : Kelompok suplementasi dengan ekstrak bayam 1,5ml
- P3 : Kelompok suplementasi dengan ekstrak bayam 2ml

Ko1 : Pengumpulan data kelompok kontrol positif

Ko2 : Pengumpulan data kelompok kontrol negatif

Po1 : Pengumpulan data kelompok P1

Po2 : Pengumpulan data kelompok P2

Po3 : Pengumpulan data kelompok P2

Dipilihnya rancangan penelitian *extended Randomised Posttest Only Control Design* diasumsikan tiap sampel tikus adalah homogen, sehingga pengukuran awal tidak dilakukan karena diasumsikan sama untuk semua kelompok karena berasal dari satu populasi yang homogen. Disamping itu rancangan penelitian ini sederhana dan mudah dilakukan serta dapat dianalisa dengan statistik.

4.2 Sampling

4.2.1. Sampel dan besar sampel

Dalam penelitian ini menggunakan sampel tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar, jenis kelamin jantan, dewasa, umur 2,5 – 3 bulan berat 142g-192g dalam kondisi sehat. Besarnya sampel dihitung dengan persamaan rumus:

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

Keterangan :

t : banyaknya kelompok perlakuan

r : jumlah replikasi

Dalam penelitian ini ada 5 perlakuan, sehingga :

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

$$r \geq \frac{15}{4} + 1$$

$$r \geq 3,75 + 1$$

$$r \geq 4,75$$

Dalam penelitian ini menggunakan replikasi 6 setiap perlakuan. Sehingga besarnya sampel 30 individu

4.2.2. Pengelompokan Sampel

Teknik pengelompokan sampel di dalam penelitian ini dilakukan untuk memasukan hewan coba ke dalam kelompok perlakuan. Pengambilan anggota sampel untuk dimasukkan ke dalam kelompok dilakukan secara random.

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Klasifikasi variabel

4.3.1.1. Variabel bebas (*Independent variable*)

- a. Pemberian ekstrak bayam selama 15 hari
- b. Paparan asap rokok kretek selama 15 hari

4.3.1.2. Variabel tergantung (*Dependent variable*)

- a. Aktifitas GSH-Px eritrosit *Rattus norvegicus L.*
- b. Kadar MDA plasma *Rattus norvegicus L.*

4.3.1.3. Variabel Kendali

- a. Jenis hewan coba
- b. Umur hewan coba
- c. Jenis kelamin hewan coba
- d. Berat badan hewan coba
- e. Kesehatan fisik hewan coba
- f. Faktor lingkungan laboratorium tempat pemeriksaan
- g. Cara pemberian
- h. Waktu pemberian

4.3.2. Definisi operasional variabel

4.3.2.1. Ekstrak bayam yang diberikan pada kelompok tikus adalah ekstrak bayam yang diperoleh dari bayam jenis *Amaranthus tricolor L.* Ekstrak bayam yang diberikan dihitung berdasarkan kebutuhan normal vitamin A setiap harinya pada manusia yang dikonversikan pada tikus dengan beberapa modifikasi(lampiran 5)

4.3.2.2. Kadar *MDA* adalah kadar *MDA* yang diperoleh dari plasma Tikus *Ratus norvegicus L.* strain Wistar yang ditentukan dengan metoda *thiobarbituric acid reactive substance(TBARS)*, diamati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 529nm. Kadar *MDA* plasma dalam dihitung dalam satuan nmol/ml(lampiran 8).

4.3.2.3. Aktifitas *GSH-Px* adalah aktifitas *GSH-Px* yang diperoleh dari eritrosit dengan metoda dari Paglia dan Valentine, 1967. Aktifitas enzim *GSH-Px* dinyatakan dalam satuan U/gHb(lampiran 9)

4.3.2.4. Asap rokok yang dipaparkan berasal dari 3 batang rokok kretek per hari setiap 6 ekor tikus dengan merk tertentu selama 20 menit, yang dipaparkan dalam ruang pengasapan yang berukuran (40 X 50 X25)cm. Pemaparan dilakukan selama 15 hari dengan menggunakan *smoking pump*(Revianti, 2005)

4.3.2.5. Kadar hemoglobin hewan coba diukur dengan menggunakan teknik *colorimetric assay* dengan satuan g/dl

4.4. Bahan Penelitian

4.4.1. Hewan coba

4.4.1.1. Hewan coba menggunakan tikus jenis *Rattus norvegicus* strain Wistar, berjenis kelamin jantan, umur 2.5 – 3 bulan, berat 150g-200g dengan

kondisi sehat yang ditandai dengan bermata jernih, bulu mengkilap, gerakan aktif lincah feces baik tidak lembek (Sujari ,1996 dan Kusumawati, 2004), dan diperoleh dari laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran UNAIR, Surabaya. Penggunaan tikus sebagai hewan coba karena tikus memiliki sistem tubuh yang mirip dengan manusia, memiliki ukuran tubuh yang relatif besar, tidak pernah muntah serta mudah perawatannya. Disamping itu tikus juga merupakan hewan yang dipakai dalam penelitian yang berhubungan dengan vitamin A(Kusumawati, 2004), Dipilihnya tikus jantan karena alasan faktor hormonal yang dapat mempengaruhi hasil percobaan jika menggunakan tikus betina.

4.4.2. Makanan dan minuman hewan coba

- 4.4.2.1. Makanan yang diberikan pada hewan coba adalah pakan ternak standar (Lampiran 3).
- 4.4.2.2. Minuman hewan coba adalah air yang berasal PDAM dan diberikan secara *ad libitum*.

4.4.3. Bahan untuk perlakuan dan pemeriksaan

- 4.4.3.1. Ekstrak bayam jenis *Amaranthus tricolor L.*
- 4.4.3.2. Asap rokok diperoleh dari rokok kretek tanpa filter dengan merk tertentu
- 4.4.3.3. Bahan untuk preparasi sediaan eritrosit
Preparasi sediaan eritrosit memerlukan larutan *EDTA* 10%, NaCl 0,9%, dan *BPS(Buffer Phosfat Saline)* 0,01 dan pH 7,4
- 4.4.3.4. Bahan untuk penghitungan kadar *MDA* plasma :
Pemeriksaan kadar *MDA* plasma memerlukan larutan *triton-x*, *TCA(Trichloroacetic Acid)* 100% , HCl 1N, *Na- Thiobarbiturat(NaOH-Thiobarbituric acid)* 1% dan aquadest

4.4.3.5. Bahan untuk penghitungan aktifitas GSH-Px

Pemeriksaan aktifitas GSH-Px eritrosit menurut protokol yang dilakukan Paglia dan Valentine, 1967. Prinsip metoda ini adalah bila DTNB(5,5' Dithiobis (2-nitrobenzoid acid)) bereaksi dengan GSH maka akan membentuk 2,5DNTB (2-nitro 5-thiobenzoic acid) dan GSSG yang berwarna kuning, kemudian dilihat dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang tertentu.

4.4.4. Unit analisis

Unit analisis untuk pemeriksaan variabel adalah eritrosit(*whole blood*) yang diambil eritrosit *Rattus novergicus* untuk pemeriksaan aktifitas GSH-Px dan plasma darah untuk pemeriksaan kadar *MDA* plasma.

4.5. Instrumen Penelitian

4.5.1. Alat untuk pemaparan asap rokok

Alat yang dipakai untuk pemaparan asap rokok adalah ruang pengasapan yang dilengkapi dengan *smoking pump*. Alat ini berupa kotak glass berukuran (50 X 40 X 25)cm. Di dalam ruang terdapat pipa untuk mengalirkan asap rokok. Pipa ini menyatu keluar dengan pipa yang dipasang rokok. Bagian lainnya adalah pompa yang berfungsi menghisap asap rokok dan memompanya ke dalam ruangan pemaparan asap rokok(lampiran 7).

4.5.2. Alat untuk menimbang berat badan hewan coba adalah neraca *Sartorius*

4.5.3. Alat untuk pemberian ekstrak bayam menggunakan suatu spuit 6cc yang ujungnya dipasang suatu sonde yang dapat dimasukkan ke dalam mulut dan dapat mencapai lambung.

- 4.5.4. Alat yang dipakai untuk preparasi eritrosit adalah pisau bedah, gunting, pinset, spuit, kapas, botol, tabung reaksi, *sentrifuge*, lemari pendingin
- 4.5.5. Alat yang dipakai untuk penghitungan kadar *MDA* adalah tabung reaksi, *eppendorf tube*, *microcentrifuge*, *vortex*, *transpipet*, *tip*, kertas saring *Whatman 42*, *spektrofotometer*
- 4.5.6. Alat yang dipakai untuk penghitungan aktifitas *GSH-Px* adalah tabung reaksi, *eppendorf tube*, *microcentrifuge*, *vortex*, *transpipet*, *tip*, kertas saring *whatman 42*, *spektrofotometer*

4.6. Lokasi dan Waktu Penelitian

4.6.1. Lokasi penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan Laboratorium Bahan Alam, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

4.6.2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 6 bulan yaitu dari bulan januari sampai dengan bulan juni 2008. Jadwal penelitian dapat dilihat pada tabel berikut ini:

Tabel 4.1. Jadwal penelitian

| Kegiatan \ Bulan ke- | | | | | | | |
|------------------------|---|----|-----|----|---|----|-----|
| | I | II | III | IV | V | VI | VII |
| Studi Pustaka | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ |
| Penyusunan proposal | | √ | √ | √ | √ | | |
| Penelitian pendahuluan | | | | | √ | | |
| Perlakuan | | | | | √ | | |
| Pengumpulan data | | | | | √ | √ | |
| Analisis data | | | | | | √ | |
| Pembuatan laporan | | | | | | √ | √ |

4.7. Prosedur Penelitian

4.7.1. Aklimatisasi

Hewan coba (*Rattus norvegicus*) diaklimatisasi selama 7 hari terhadap makanan, air dan kondisi laboratorium.

4.7.2. Perlakuan terhadap hewan coba.

4.7.2.1. *Rattus norvegicus* dipilih secara random dan dibagi menjadi 5 kelompok tiap kelompok terdiri dari 6 ekor tikus.

4.7.2.2. Kelompok kontrol negatif tidak dipapar asap rokok kretek dan disonde aquadest 2ml dan 1% CMC sekali dalam sehari selama 15 hari

4.7.2.3. Kelompok kontrol positif dimasukkan ke dalam ruang pengasapan selanjutnya dipapar asap rokok kretek sebanyak 3 batang selama 20 menit dan disonde aquadest 2ml dan 1% CMC sekali dalam sehari selama 15 hari

4.7.2.4. Kelompok perlakuan I, II dan III dimasukkan ke dalam ruang pengasapan selanjutnya dipapar asap rokok kretek sebanyak 3 batang selama 20 menit dan disonde ekstrak bayam masing-masing sebanyak 1ml, 1,5ml dan 2ml sekali dalam sehari selama 15 hari

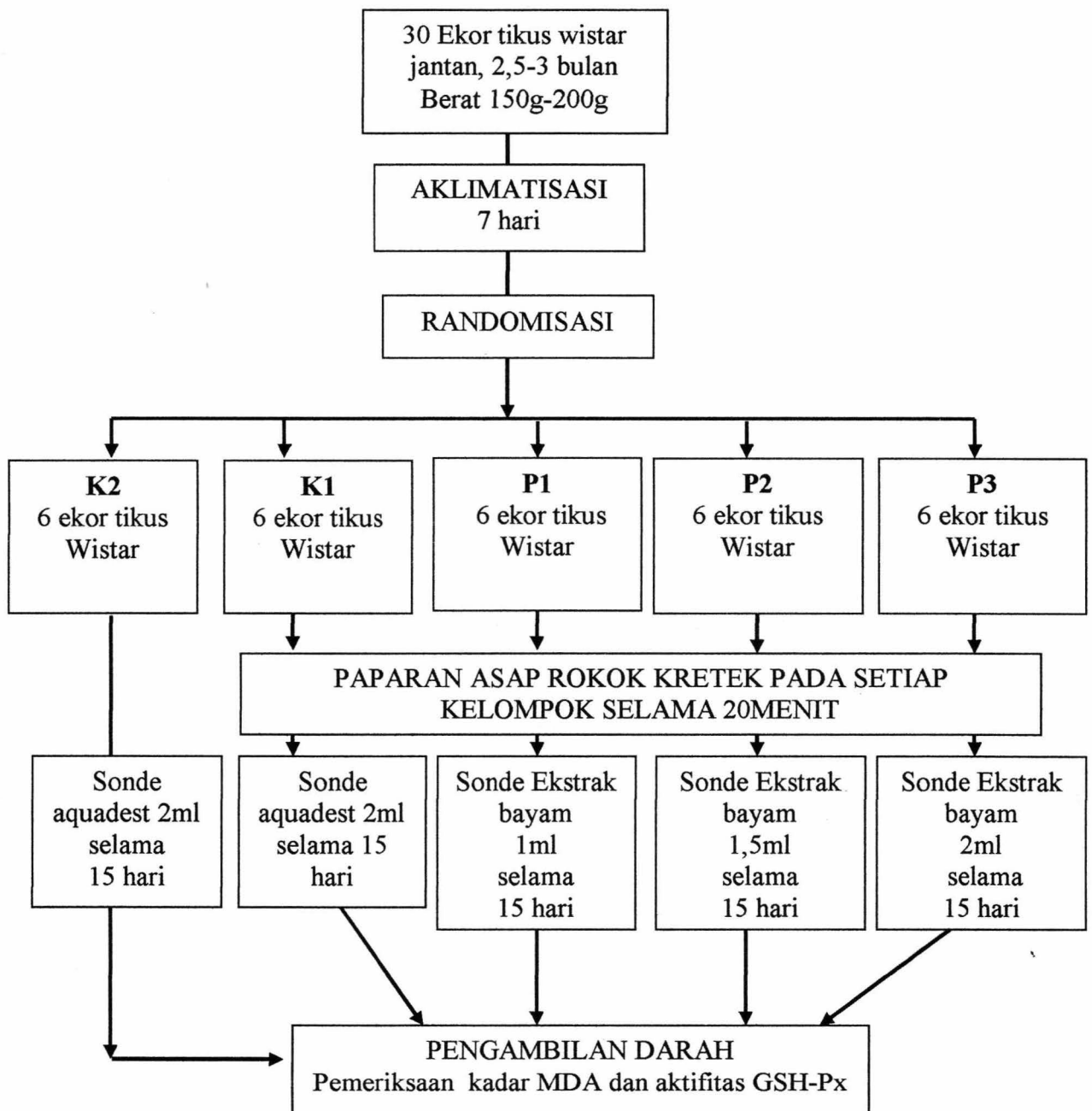
4.7.3. Pengambilan sampel untuk uji parameter

Pada hari terakhir pengamatan (hari ke-15), seluruh hewan coba dianestesi secara inhalasi, selanjutnya hewan coba dibedah untuk mengambil darahnya secara intracardial yaitu melalui ventrikel dengan menggunakan spuit 5ml dan dimasukkan ke dalam 2 botol fenojek yang sudah diberi larutan EDTA 10% sebagai antikoagulan, masing-masing 2ml dan 3ml serta dibolak-balik. Fenojek yang berisi 3ml sampel darah dikirim ke laboratorium swasta untuk pemeriksaan aktifitas GSH-Px dalam eritrosit.

Fenojek untuk pemeriksaan kadar MDA plasma yang berisi 2ml darah *disentrifugasi* pada kecepatan 3000rpm selama 15 menit dan berikutnya dilakukan pemeriksaan kadar MDA plasma.

4.7.4. Kerangka operasional penelitian

Alur operasional penelitian ini adalah sebagai berikut :



Gambar 4.2. Kerangka operasional penelitian

4.8. Analisis data

Dalam penelitian ada lebih dari satu *variable dependent* pada tiap perlakuan yang akan diperbandingkan, oleh karena itu data yang diperoleh dari semua hasil pengukuran dianalisis dengan menggunakan *Manova* (*Multiple analysis of Variance*) bila ada perbedaan yang bermakna dilanjutkan dengan *anova* (*analysis of Variance*) jika ada beda nyata antar perlakuan maka dilanjutkan dengan uji *LSD* (*Least Significant Difference*) dengan tingkat kebermaknaan 95% ($p=0,05$)

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Hasil penelitian ini berupa data kadar MDA dalam plasma darah, aktifitas enzim GSH-PX dalam eritrosit, kadar Hb dan berat badan hewan coba yang akan diolah dengan *Multiple analysis of Variance(Manova)* dengan taraf signifikansi 5% bila berbeda dilanjutkan dengan anova(*analysis of Variance*) bila ada perbedaan bermakna dilanjutkan dengan uji LSD(*Least Significant Difference*) dan diolah dengan menggunakan *soft ware* pengolah data statistik yaitu program SPSS 13.0.

5.1. Hasil Uji Statistik Deskriptif

Gambaran umum data dari penelitian ini dapat dilihat pada distribusi rerata dan simpangan baku kadar MDA plasma darah, aktifitas enzim GSH-Px pada eritrosit, kadar Hb dan berat badan pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.1. Uji statistik deskriptif hasil penelitian

| Variabel tergantung | PERLAKUAN | | | | |
|--------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| | Kontrol positif x ± SD | Kontrol negatif x ± SD | Ekstrak bayam 1ml x ± SD | ekstrak bayam 1.5ml x ± SD | Ekstrak bayam 2ml x ± SD |
| Kadar MDA plasma darah (nmol/ml) | 1.5526 ^{ab} ± 0.3570 | 1.0058± 0.4506 | 1.0350± 0.2383 | 0.5828 ^a ± 0.1993 | 0.8117 ^b ± 0.1012 |
| Aktifitas enzim GSH-Px eritrosit(U/gHb) | 525.1 ^{abcd} ± 14.5 | 616.1 ^a ± 34.6 | 593.2 ^b ± 40.9 | 575.6 ^c ± 47.7 | 605.5 ^d ± 53.6 |
| Kadar Hb(g/dl) | 15.0± 1.0 | 14.1± 0.5 | 14.9± 0.4 | 14.3± 1.1 | 14.9± 0.6 |
| Berat Badan Sebelum Perlakuan(g) | 169.2± 15.9 | 168.5± 11.0 | 158.0± 7.6 | 168.5± 14.8 | 157.7± 7.1 |
| Berat Badan Sesudah Perlakuan(g) | 168.8 ^a ± 18.7 | 143.7 ^{ab} ± 10.7 | 172.3 ^{bc} ± 14.2 | 150.8 ^c ± 10.2 | 160.0± 24.5 |

Keterangan :

X : Rerata

SD : Standar deviasi

Hb : Haemoglobin

a,b,c: Huruf kecil yang sama menunjukkan ada beda nyata antar perlakuan pada $p \leq 0,05$

Dari Tabel di atas, kadar MDA paling rendah pada perlakuan ke-2 pada pemberian ekstrak bayam 1,5ml yaitu kadarnya (0.5828 ± 0.1993) nmol/ml. Pada suplementasi 2ml ekstrak bayam (0.8117 ± 0.1012) nmol/ml, pada kontrol negatif (1.0058 ± 0.4506) nmol/ml, pada suplementasi 1ml ekstrak bayam (1.0350 ± 0.2383) nmol/ml, Kadar MDA pada kontrol positif paling tinggi yaitu (1.5526 ± 0.3570) nmol/ml.

Aktifitas enzim GSH-Px pada kontrol negatif yang paling tinggi yaitu (616.1 ± 4.6) U/gHb. Pada suplementasi ekstrak bayam 2ml aktifitas enzim GSH-Px adalah (605.5 ± 53.6) U/gHb, pada suplementasi ekstrak bayam 1ml (593.2 ± 40.9) U/gHb, pada suplementasi ekstrak bayam 1.5ml aktifitas enzimnya (575.6 ± 47.7) gHb dan yang paling rendah ada pada kelompok kontrol positif yaitu (525.1 ± 14.2) U/gHb.

Kadar Haemoglobin paling tinggi terlihat pada kontrol positif yaitu (15.0 ± 1.0) g/dl. Pada suplementasi dengan ekstrak bayam 2ml kadar hemoglobinnnya (14.9 ± 0.6) g/dl, pada suplementasi ekstrak bayam 1ml kadar Haemoglobinenya adalah (14.9 ± 0.4) g/dl, pada suplementasi ekstrak bayam 1.5ml kadar Haemoglobinenya adalah (14.3 ± 1.1) g/dl. Kadar Haemoglobine yang paling rendah adalah pada kontrol negatif yaitu (14.1 ± 0.5) g/dl.

Berat badan hewan coba antar perlakuan pada awal perlakuan mulai dari yang terkecil adalah suplementasi ekstrak bayam 2ml sebesar (157.7 ± 7.1) g, suplementasi ekstrak bayam 1ml: (158.0 ± 7.6) g, kontrol negatif: (168.5 ± 11.0) g, suplementasi ekstrak bayam 1.5ml: (168.5 ± 14.8) g dan pada kelompok kontrol positif (169.2 ± 15.9) g. Berat badan hewan coba setelah perlakuan yang terkecil pada kontrol negatif yaitu (143.7 ± 10.7) g dan yang terbesar pada suplementasi ekstrak bayam 1ml yaitu (172.3 ± 14.2) g.



5.2. Hasil Uji Normalitas

Analisis dengan menggunakan *manova* salah satu syaratnya adalah distribusi data normal. Oleh karena itu data yang terkumpul harus diuji normalitasnya. Uji normalitas yang dipakai dalam penelitian ini adalah uji Kolmogorov-Smirnov Z. Hasil uji tersebut dapat dilihat pada tabel sebagai berikut :

Tabel 5.2. Hasil Uji Normalitas Kolmogorov-Smirnov Z.

| Variabel | Kolmogorov-Smirnov Z | Asymp. Sig. |
|--------------------------|----------------------|-------------|
| Kadar MDA(nmol/ml) | 1.084 | 0.190 |
| Aktifitas GSH-Px (U/gHb) | 0.636 | 0.813 |
| Kadar Hb (g/dl) | 0.798 | 0.5469 |
| BB1(g) | 0.580 | 0.890 |
| BB2 (g) | 0.608 | 0.853 |

Dari tabel tersebut variabel kadar MDA, aktifitas GSH-Px, kadar HB, dan berat badan hewan coba sebelum dan sesudah perlakuan terdistribusi normal pada semua kelompok ($p > 0.01$).

5.3. Hasil Uji Homogenitas

Pada uji Manova diasumsikan varian dari variabel yang ada adalah homogen, oleh karena itu perlu dilihat homogenitas dari varian variable yang ada dengan *Lavene Test* . Hasil Lavene test uji homogenitas terlihat pada tabel dibawah ini.

Tabel 5.3. Hasil Uji Lavene untuk Homogenitas Varian Variabel

| Variabel | Levene Statistik | Asymp. Sig |
|--------------------------|------------------|------------|
| Kadar MDA(nmol/ml) | 4.348 | 0.01 |
| Aktifitas GSH-Px (U/gHb) | 2.190 | 0.10 |
| Kadar Hb (g/dl) | 2.447 | 0.07 |
| BB1(g) | 1.171 | 0.35 |
| BB2 (g) | 1.490 | 0.24 |

Dari tabel di atas nilai sig. aktifitas GSH-Px 0.10, nilai sig. kadar Hb 0.07 juga berat badan sebelum dan sesudah perlakuan yang semuanya lebih besar daripada 0.05. Hal itu berarti variabel tersebut memiliki varian yang sama sehingga dapat dianalisa dengan Manova. Nilai sig. kadar MDA 0.01 nilai ini lebih kecil dibanding 0.05 yang berarti varian tidak homogen keadaan ini masih *robust* untuk dilanjutkan dengan manova.

5.4. Hasil Uji Box Matrik Kovarian

Salah satu syarat uji manova adalah matrik kovarian variable dependen adalah sama. Hasil uji tersebut dapat dilihat tabel di bawah ini:

Tabel 5.4. Hasil Uji Boks Matrik Kovarian Variable Dependen

| | |
|---------------|----------|
| Nilai Box's M | 126.784 |
| F hitung | 1.110 |
| df1 | 60 |
| df2 | 1254.496 |
| Sig. | 0.266 |

Dari tabel tersebut di atas diperoleh nilai F hitung 1.110 dengan $\text{sig}=0.266$, karena signifikasinya di atas 0.05 maka *Boks matrik kovarian variable dependent* adalah sama berarti memenuhi syarat untuk uji Manova.

5.5. Hasil Uji Multivariat

Uji ini digunakan melihat apakah setiap factor mempengaruhi variabel dependen. Karena lebih dari 2 grup variabel dependen maka digunakan *Wilks' lambda test*. Hasilnya adalah sebagai berikut :

Tabel 5.5. Hasil Uji Multivariat

| Effect | Sig. |
|---------------|---------|
| Wilks' Lambda | 0.00000 |

Dari tabel tersebut diatas diperoleh dengan $\text{sig} < 0.05$, hal ini berarti ada beda nyata antara perlakuan dengan kelompok variabel dependen yaitu kadar MDA, aktifitas GSH-Px, kadar hemoglobine, BB1 dan BB2

5.6. Hasil Uji Tests of Between-Subjects Effects

Uji ini dilakukan untuk menguji pengaruh univariat anova untuk setiap factor terhadap variabel dependen. Hasil analisis tersebut terlihat pada tabel dibawah ini.

Tabel 5.6. Hasil Uji Between-Subjects Effects(anova)

| Dependent Variable | F | Sig. |
|--------------------|--------|--------|
| Kadar MDA | 8.8514 | 0.0001 |
| Aktifitas GSH-Px | 4.6671 | 0.0059 |
| Kadar Hemoglobin | 1.7184 | 0.1775 |
| BB1 | 1.5286 | 0.2243 |
| BB2 | 3.1680 | 0.0309 |

Dari hasil pengamatan tersebut di atas variabel kadar MDA memiliki nilai sig.=0.0001, atau $p \leq 0.05$ maka ada perbedaan yang bermakna antar perlakuan, demikian juga pada aktifitas enzim GSH-Px yang memiliki sig.= 0.0059 yang lebih kecil dari pada $p=0,05$ berarti ada perbedaan yang bermakna pada antar perlakuan yang diberikan. Kadar hemoglobin tidak berbeda secara bermakna antar perlakuan dan juga BB1(berat badan sebelum perlakuan)tidak ada perbedaan yang bermakna. Pada BB2(berat badan sesudah perlakuan) menunjukkan ada perbedaan yang bermakna diantara perlakuan yang diberikan.

5.7. Hasil Uji LSD (*Least Significant Difference*)

Uji LSD merupakan uji kelanjutan anova yang digunakan untuk mengetahui perlakuan mana yang dinyatakan berbeda secara bermakna pada uji anova. Hasil uji LSD tersebut dapat dilihat pada tabel berikut ini.

Tabel 5.7. Hasil Uji LSD

| Perbandingan antar kelompok | | sig. Kadar MDA | sig.Aktifitas GSH-Px | sig. BB2 |
|-----------------------------|---------------------|-------------------|-------------------------|-------------|
| kontrol positif | kontrol negatif | 0.358 | 0.001(*) | 0.014(*) |
| | ekstrak bayam 1ml | 0.155 | 0.008(*) | 0.717 |
| | ekstrak bayam 1.5ml | 0.004(*) | 0.041(*) | 0.071 |
| | ekstrak bayam 2ml | 0.03(*) | 0.002(*) | 0.364 |
| kontrol negatif | ekstrak bayam 1ml | 1 | 0.336 | 0.006(*) |
| | ekstrak bayam 1.5ml | 0.538 | 0.096 | 0.46 |
| | ekstrak bayam 2ml | 0.986 | 0.654 | 0.46 |
| ekstrak bayam 1ml | ekstrak bayam 1.5ml | 0.053 | 0.46 | 0.46 |
| | ekstrak bayam 2ml | 0.537 | 0.604 | 0.46 |
| ekstrak bayam 1.5ml | ekstrak bayam 2ml | 0.326 | 0.213 | 0.46 |

Keterangan :

BB2 : Berat badan sesudah perlakuan

* : berbeda secara nyata

Sig. : signifikansi perbedaan rerata

Dari analisis tersebut menunjukkan bahwa pada variabel kadar MDA plasma ada perbedaan nyata antara kontrol positif dengan perlakuan ekstrak bayam 1.5ml dan dengan perlakuan 2ml. Antara kontrol negatif dan positif tidak ada beda nyata juga antara perlakuan pemberian ekstrak bayam 1ml; 1,5ml dan 2ml. Hal ini berarti pemberian ekstrak bayam menurunkan kadar MDA pada konsentrasi 1,5ml sedangkan kenaikan dosis tidak memberikan pengaruh secara nyata pada kadar MDA plasma darah.

Hasil uji LSD untuk aktifitas enzim GSH-Px menunjukkan yang berbeda nyata adalah kontrol positif dengan kontrol negatif, suplementasi ekstrak bayam 1ml, 1.5ml dan 2ml. Diantara perlakuan suplementasi ekstrak bayam 1ml, 1.5ml dan 2ml itu tidak ada beda nyata. Hal ini menunjukkan ada pengaruh pemberian ekstrak bayam terhadap aktifitas enzim GSH-Px, tidak dipengaruhi oleh besarnya konsentrasi.

Berat badan setelah perlakuan antara kontrol positif dengan kontrol negatif ada beda nyata, juga diantara kontrol negatif dengan kelompok pemberian ekstrak bayam 1ml. Beda nyata juga dijumpai diantara berat badan kelompok suplementasi ekstrak bayam 1ml dengan kelompok pemberian ekstrak bayam 1.5ml.

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan melihat pengaruh pemberian ekstrak bayam terhadap radikal bebas dan aktifitas antioksidan pada eritrosit *Rattus norvegicus* galur Wistar yang terpapar asap rokok. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan *Extended Randomised Post test Only Control Design*, karena rancangan ini sederhana mudah dilakukan dan dapat dianalisis secara statistik.

6.1. Kadar MDA Plasma Darah

Radikal bebas mengakibatkan berbagai penyakit dan dapat memperpendek kehidupan, oleh karena itu perlu diketahui tidak hanya asal radikal bebas, tetapi juga cara mengatasi atau mengurangi paparannya. Hanya persoalannya radikal bebas tersebar luas dan bahkan tubuh kitapun menghasilkan radikal bebas. Sejarah radikal bebas dalam dunia biologi dan kedokteran dimulai pada saat Mc Chord, Keele dan Fridovich tahun 1965 menemukan enzim SOD(*Superoxide dismutase*) yang bertanggung jawab terhadap peruraian anion superoksida hasil dari reduksi *univalent oksigen*.

Produksi radikal bebas yang berlebihan bertanggung jawab terhadap kerusakan jaringan dan berbagai penyakit pada manusia seperti diabetes mellitus, arthritis, kanker, pankreatitis, stroke, dan lain-lain. Menurut Pryor *et al.*(1976) MDA merupakan senyawa *dialdehid*($C_3H_4O_2$) hasil akhir dari peroksidasi lipid. Menurut Conti *et al.* (1991) dan Halliwell dan Gutteridge (1991), MDA merupakan produk oksidasi asam lemak tidak jenuh oleh radikal bebas, juga merupakan metabolit komponen sel yang dihasilkan oleh radikal bebas.

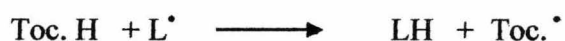
Radikal bebas reaktifitasnya sangat tinggi dan keberadaannya dalam sel umumnya sangat singkat sehingga sulit terdeteksi, oleh karena itu penelitian ini melihat produk pengaruh radikal bebas yang berupa MDA. Senyawa ini merupakan produk akhir peroksidasi lipid sehingga bersifat stabil. Dalam penelitian ini dilihat perubahan kadar MDA plasma darah sebagai indikator terjadinya paparan radikal bebas. Kadar MDA yang tinggi merupakan indikasi kerusakan membran yang tinggi dan penanda aktifitas radikal bebas(Suryohudoyo, 1993).

Pada penelitian ini pemaparan asap rokok diberikan supaya proses peroksidasi lipid terjadi lebih cepat yang ditandai dengan meningkatnya kadar MDA plasma darah pada hewan coba. Berdasarkan hasil penelitian tersebut ada peningkatan pada kontrol positif dimana kadar MDA plasma darahnya (1.5526 ± 0.3570)nmol/ml dibanding kontrol negatif yaitu (1.0058 ± 0.4506)nmol/ml. Dalam penelitian ini juga dilihat perubahan kadar MDA sebagai penanda pengaruh dari pemberian ekstrak bayam pada hewan coba. Dari analisis hasil penelitian ini ada perbedaan nyata antara kadar MDA plasma darah hewan coba kelompok kontrol positif dengan hewan coba yang mendapat perlakuan ekstrak 1.5ml ekstrak bayam. Kadar MDA pada perlakuan ekstrak bayam 1.5ml adalah (0.5828 ± 0.1993)nmol/ml. Kadar tersebut paling rendah dibandingkan kontrol positif kontrol negatif atau perlakuan pemberian ekstrak bayam 1ml atau perlakuan pemberian ekstrak bayam 2ml. Hal ini dapat dijelaskan dengan melihat kandungan pada ekstrak bayam. Kandungan ekstrak bayam yang memiliki sifat antioksidan adalah β -karoten yang merupakan provitamin A, vitamin C dan vitamin E. β -karoten dan vitamin E merupakan vitamin lipofilik yang tidak larut dalam air tetapi larut dalam lemak sehingga sebagai antioksidan kedua senyawa ini aktif pada membran sel sedangkan vitamin C

bersifat hidrofilik maka aktif sebagai antioksidan di dalam sitosol dan cairan ekstraselular (Baynes and Dominiczak, 2005).

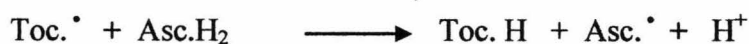
β -karoten merupakan antioksidan yang mempunyai peran dalam menangkap radikal peroksil dalam jaringan pada tekanan parsial oksigen rendah. Kemampuan ini melengkapi kemampuan vitamin E yang efektif pada konsentrasi oksigen yang lebih tinggi (Murray *et al.*, 2000). Selain itu penurunan kadar MDA perlakuan dapat juga karena β -karoten menangkap singlet oksigen atau menangkap radikal hidroksil yang memicu proses peroksidasi lipid (Marks *et al.*, 2000 dan Winarsi, 2007).

Peran vitamin C dan E bekerjasama dalam mencegah peroksidasi lipid. Vitamin E dapat bereaksi dengan radikal lipid dan radikal peroksil lipid (Suryohudoyo, 1993). Secara skematis reaksinya sebagai berikut :

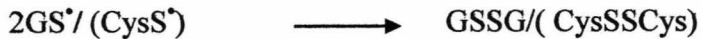
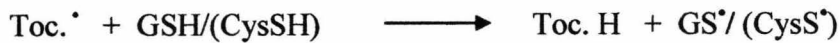


Radikal vitamin E tidak terlalu reaktif, namun dihilangkan dengan berbagai cara antara lain dengan peranan vitamin C. Ada 3 cara menghilangkan radikal vitamin E, yaitu :

1. Radikal vitamin E mengadakan reaksi intra molekuler menghasilkan senyawa yang tidak radikal.
2. Setelah bergeser ke arah permukaan molekul radikal vitamin E bereaksi dengan vitamin C (Asc.H_2) menghasilkan radikal vitamin C dan dengan reaksi dismutasi yang menghasilkan vitamin C nonradikal dan *dehidroksi asam askorbat* (DHAA).



3. Radikal vitamin E bereaksi dengan *Glutation* atau *sistein* yang terdapat di sitosol.



Dari cara kerjanya, vitamin E dan vitamin C ini tergolong antioksidan pemutus rantai. Karena kandungan ekstrak bayam banyak mengandung β -karoten, vitamin C ini maka akan dapat menurunkan proses peroksidasi lipid yang akan berdampak menurunkan konsentrasi MDA pada pengamatan hewan coba. Dari hasil pengamatan tersebut perlakuan dengan pemberian ekstrak bayam 1.5ml memiliki efek yang paling baik menurunkan peroksidasi lipid.

6.2. Aktifitas Enzim GSH-Px

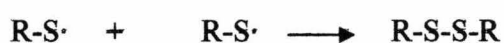
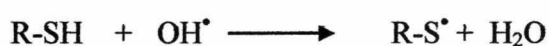
Tubuh memiliki sistem antioksidan yang berguna untuk melindungi ancaman dari radikal bebas yang memapar sel tubuh. Sistem antioksidan menurut Suryohudoyo(1993) tersebut terdiri 2 macam yaitu :

1. Antioksidan yang mencegah terjadinya reaksi berantai(*preventive anti-oxidant*). Antioksidan ini terdiri dari enzim *Superoksida dismutase(SOD)*, enzim *Glutation peroksidase(GSH-Px)* dan enzim *katalase*.
2. Antioksidan pemutus reaksi berantai(*chain breaking anti-oxidant*). Dalam kelompok ini termasuk vitamin E(*tokoferol*), vitamin C(*asam ascorbat*), β -karoten, glutation, sistein dll.

Dalam penelitian ini aktifitas enzim yang diamati adalah enzim GSH-Px yang ada pada sel darah merah. Sel darah merah tidak memiliki inti dan organel intrasel sehingga jika enzim ini berkurang tidak dapat disintesa kembali. Hal ini memudahkan untuk melihat

perubahan aktifitasnya karena faktor paparan radikal bebas. Enzim merupakan protein fungsional yang mudah mengalami kerusakan oleh paparan radikal bebas.

Dari hasil pengamatan aktifitas paling tinggi dijumpai pada kontrol negatif yang tidak mendapat paparan asap rokok, yang paling rendah adalah kontrol positif. Diantara kontrol positif dengan perlakuan suplementasi ekstrak bayam 1ml, 1.5ml dan 2 ml menunjukkan beda nyata. Hal ini dapat disebabkan karena paparan asap rokok menyebabkan meningkatnya paparan radikal bebas sehingga mempengaruhi protein enzim. Menurut Suryohudoyo(1993) radikal hidroksil dapat merusak 3 komponen penting yang mempertahankan integritas sel yaitu lemak, protein dan DNA. Menurut Farr dan Kogama(1991) dan Wijaya(1996) Radikal bebas merusak protein karena bereaksi dengan asam amino penyusunnya, terlebih yang mengandung sulfur dan gugus *thiol* sangat sensitif terhadap radikal oksigen. Dalam hal ini akan membentuk radikal *tiil* yang kemudian *cross linking* membentuk ikatan *disulfida*. Reaksinya adalah sebagai berikut :



Pembentukan ikatan *disulfida* menimbulkan ikatan *intra* dan *antar* molekul protein, sehingga terjadi perubahan struktur protein dan akibatnya protein kehilangan fungsi biologinya sehingga aktifitasnya menurun atau hilang sama sekali. Protein enzim ini tidak dapat disintesa lagi oleh sel darah merah karena sel darah merah tidak berinti dan tidak memiliki organel intraselular. Hal inilah yang mengakibatkan lebih rendahnya aktifitas enzim GSH-Px pada hewan coba yang dipapar asap rokok.

Diantara masing-masing perlakuan suplementasi ekstrak bayam 1ml, 1.5ml dan 2ml tidak menunjukkan perbedaan pengaruh terhadap perubahan aktifitas enzim GSH-PX sehingga tidak dapat dikatakan konsentrasi perlakuan mana yang paling berpengaruh terhadap aktifitas enzim GSH-Px. Terjadinya penghambatan terhadap terjadinya reaksi berantai akibat paparan radikal bebas oleh senyawa antioksidan di dalam ekstrak bayam ini juga terlihat dari rendahnya kadar MDA pada perlakuan dengan ekstrak bayam 1.5ml. Berarti ada penurunan proses peroksidasi lipid.

6.3. Kadar Hemoglobin (Hb)

Hemoglobin dan sejumlah protein lain merupakan kelompok senyawa berwarna dinamakan porfirin. Hemoglobin ini disintesa di hati dan di sumsum tulang, senyawa ini merupakan penyusun utama eritrosit. Rata-rata hidup eritrosit adalah 120 hari, pada akhir masa itu eritrosit dibuang dari sistem sirkulasi dan komponennya didegradasi(Colby,1989). Berdasarkan hasil analisis data penelitian menunjukkan bahwa kadar hemoglobin(Hb) diantara kontrol positif, kontrol negatif, perlakuan dengan ekstrak bayam 1ml, 1.5ml dan perlakuan dengan ekstrak bayam 2ml tidak berbeda nyata. Hal ini disebabkan karena berkurangnya hemoglobin terjadi jika terdegradasi oleh karena sudah melampaui masa edarnya sehingga tidak terjadi penurunan kadar hemoglobin. Disamping itu karena molekul *hem* dalam hemoglobin menyerap cahaya dan dengan adanya atom besi menyebabkan tidak menimbulkan radikal *singlet oksigen* yang reaktif(Colby,1989).

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang pengaruh ekstrak bayam terhadap kadar MDA dan aktifitas enzim GSH-Px pada tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar yang terpapar asap rokok dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Pemberian ekstrak bayam 1.5ml selama 15 hari menurunkan kadar MDA plasma secara bermakna.
2. Pemberian ekstrak bayam memiliki efek nyata terhadap pencegahan penurunan aktifitas enzim GSH-Px.

7.2. Saran

Berdasarkan penelitian ini memang ada bukti penurunan kadar MDA dan pencegahan penurunan aktifitas enzim GSH-Px karena pemberian ekstrak bayam, namun masih ada beberapa persoalan yang belum terjawab, oleh karena itu ada beberapa saran yang perlu disampaikan, yaitu :

1. Perlu diadakan penelitian lanjutan untuk melihat lebih jauh bagaimana ekstrak bayam mempengaruhi peroksidasi lipid dan sejauh mana pengaruhnya terhadap sistem antioksidan enzimatik tubuh.
2. Penelitian yang lebih mendalam pada konsentrasi berapa pemberian ekstrak bayam mempunyai efek penghambatan penurunan aktifitas enzim GSH-Px.

DAFTAR PUSTAKA

- Baynes J.W. and Dominiczak M.H., 2005. **Medical Biochemistry**, 2nd. Ed. , Philadelphia : Elsevier Mosby, pp.:499-500
- Blokhina, O., Virolainen, E. and Fagerstet, K.V. 2003. **Antioxidants, Oxidative Damange and Oxygen Deprivation Stress: a Review**. *Annals of Botany* 91:179-194
- Cao G., Russell R.M., Lischner N. and Prior R.L. 1998. **Serum Antioxidan Capacity Is Increased by Consumption of Strawberries, Spinach, Red Wine or Vitamin C in Elderly Woman**, *J. Nutr.* 128: 2383 - 2390
- Cao G, Sofic E., and Prior R. L., 1996, **Antioxidant Capacity of Tea and Common Vegetables** , *J. Agric. Food Chem.*, 44: 3426-3431
- Cartford M.C., Gemma C., and Bickford P.C., 2002. **Eighten-Month-Old Fisher 344 Rats fed a Spinach- Enriched Diet Show Improved Delay Classical Eyeblink Conditioning and Reduced Expression of Tumor Necrosis Factor α (TNF α) and TNF β in The Cerebellum**, *The Journal of Neuroscience*, 22(14) : 5813-5816
- Dröge, W . 2002. **Free Radikals in the Physiological Control of Cell Function** . *Physiol Rev.* 82:47-95,
- Farr S.B. dan Kogama T., 1991. **Oxidative Stress Responses in Eschericia coli and Salmonella typhimurium**. *Dalam Microbiology Review.* 55 : 561 - 585
- Favier ,A.E. 1982. **Biological Indicator of Oxidative Stress in Human. Trace Element and Free Radikals in Oxidative Deseases**. Champaign Illinois
- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C.,1990, **The Measurement and mechanism of Lipid Peroxidation in Biological Sistem**, *TIBs.*, 129- 135
- Halliwell B. dan Gutteridge J.M.C..1991. **Free Radikals in Biology and Medicine**. Oxford : Clarendon Press
- Halliwell B., 1991. **Reactive Oxygene Species inLiving System: Source, Biochemistry, and Role in Human Disease** , *The American Journal of Medicine*, (91): 3C: 14S-21S
- Harborne, J.B., 2006. **Metode Fitokimia Penuntun cara Modern menganalisis Tumbuhan** , alih bahasa Kosasih Padma winata dan Iwang Soediro, terbitan kedua, Bandung : ITB press, hal 4-8, 158-162

- Hecht, S.S.1999. **Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer**, Journal of the National Cancer Institute, Vol.91, No. 14: 1194 - 1210
- HerkenH., E Uz, " zyurt H O, So"ğ'u S " , Virit, O and Akyol O", 2001, **Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizophrenia**, *Molecular Psychiatry* 6 : 66–73
- Hernani dan Rahardjo M.,2006, **Tanaman berkasiat Antioksidan**, cetakan ke-2, Jakarta: Penebar Swadaya, hal. 5-9
- Ghozali I.,2007, **Aplikasi Analisis Multivariate dengan Program SPSS**, cetakan ke empat, Semarang: Badan Penerbit UNDIP, hal : 75-78
- Imlay , J.A. and Linn S., 1986. **DNA Damage and Oxygen Radikals Toxicity** , *Science* 240 : 1302- 1309
- Kirkpatrick, J.A. , Murpy J.B. and Morelock T. 1999. **Carotenoid Antioxidant Levels in Spinach**. *HortScience* 34: 440 – 565
- Kusumawati D., 2004. **Bersahabat dengan Hewan Coba**, cetakan pertama, Yogyakarta : UGM Press hal.8-73
- Leonard, M.B., Lawton K., Watson I.D., and MacFariane I, 1995, **Free Radical Activity in Young Adult cigarette Smokers**, *J.Clin.pathol.*: 385-387
- Lomnitski, I., Nyska A., ben-shaul V., Maronpot R. R., Haseman JK., Harrus TL., Bergman M., and Grossman S., 2000, **Effects of Antioxidants Apocynin and the Natural Water-Soluble Antioxidant from Spinach on Cellular , Damage Induced by Lipopolysaccharide in the Rat**, *Toxicol Pathol* 2000; 28; 580
- Marks D.B., Marks A.M. and Smith C.M., 2000. **Biokimia Kedokteran Dasar, Sebuah Pendekatan Klinis**, alih bahasa Brahm, Jakarta: EGC, hal.; 330-333
- McCord, J.M., 2007, **The Evolution of Free Radikals and Oxidative Stress**, *The American Journal of Medicine*, Juni , Vol.108:652-659
- Morelock T., Howard L., and Murphy J.B., 2004. **Antioxidant Capacity of Slected Spinach Genotypes**, *HortScience* 39: 754 -897
- Murray, R.K., Granner D.K., Mayes P.A. and Rod well V.W., 2003. **Harper's Illustrated Biochemistry**. 26^{ed}. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical Publishing Division

- Nysca A., Lomnitski L., Spalding J., Dunson D.B., Goldsworthy L., Grossman S., Bergman M. and Boorman G., 2001. **Topical and Oral Administration of The Natural Water Soluble Antioxidant from Spinaach reduces the multiplicity of pappiloma in the Tg.Ac Mouse Model**, Toxicology Letters 122: 33-44
- Oktarina, 2006. **SPSS 13.0 untuk Orang Awam**, cetakan pertama, Palembang: hal.: 40-55
- Paiva, S.A.R. and Russell,R.M. 1999. **β -Carotene and Other Carotenoid as Antioxidants**. Journal of The American College of
- Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Rio D.D., Salvatore S., Bianchi M., and Brighenti F., 2003. **Total Antioxidant Capacity of Plant Food, Beverages and oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays**, The Journal of Nutrition , pp. 2812-2819
- Prawiranegara D.D., 1992, **Daftar Komposisi Bahan Makanan**, cetakan ke-6, Direktorat Gizi Departemen Kesehatan RI, Jakarta : Bhratara, hal.15,16,29
- Pryor, W.A.,1997, **Cigarette Smoke Radicals and the Role of Free Radicals in Chemical Carcinogenicity**, Enviromental Health Perspectives, vol.105, supplement 4, pp.875-882
- Pryor, W.A., J.P. Stanley dan E. Blair . 1976, **Autooxidation of Polyunsaturated Fatty Acid II. A Suggested Mechanism for the Formation of TBA- like Material from Prostaglandin- like Endoperoxides dalam Lemak** 11 : 370 – 379
- Rukmana, R., 1994, **Bayam, Bertanam dan Pengolahan Pascapanen**, Yogyakarta: Kanisius, hal. 9-19
- Sadikin, M. 2001, **“Pelacakan Dampak Radikal Bebas terhadap Makromolekul”** dalam kumpulan makalah Pelatihan Radikal Bebas dan Antioksidan dalam Kesehatan. Jakarta : Fakultas Kedokteran
- Southern, P.A., 1988. **Free Radicals in Medicine II, Involvement in Human Disease**, Mayo Clin Proc 63: 390-408
- Singh A. , Rangasamy T., Thimmulappa Ra. K., Lee H., Osburn W. O., Flohé R.B., Thomas W. K., Yamamoto Ma., and Biswal S., 2006, **Glutathione Peroxidase 2, the Major Cigarette Smoke-Inducible Isoform of GPX in Lungs, Is Regulated by Nrf2** , American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. Vol. 35, pp. 639-650, 2006
- Sjodin B., Westing Y.H. and Apple F.S., 1990. **Biochemical Mechanisms for Oxygen Free Radical Formation during Exercise**, Sport Medicine 10(4): 236-254

- Somantri I, Hasanah H., Adisoemarto M.S., Thohari M., Nurhadi A dan Ida N., 2007, **Mengenal Plasma Nutfah Tanaman Pangan, Balai besar Penelitian dan Pengembangan Bioteklogi dan Sumber daya Genetik Pertanian**, Bogor
- Sudjarwo, 2001. **Optimasi Spektrofouometri pada Penetapan Kadar Malondialdehid di dalam Sperma Manusia**, *Majalah Farmasi Indonesia* 12(3), 152-158
- Sugiyono, 2006. **Statisitika untuk Penelitian**, cetakan ke-9, Bandung : Alfabeta, hal.3-16, 85-108
- Suryohudoyo , P. , 1993. **Oksidan, Antioksidan dan Radikal Bebas**, Makalah Simposium Oksidan dan Antioksidan, Surabaya
- Suryohudoyo , P. , 2000. **Kapita Selekt Ilmu Kedokteran**, Jakarta : Sagung Seto. Hal. : 31- 47
- Tang G., Qin J.,Dolnikovski G.G.,Russhell R.M. and Grusak, M.A., 2005. **Spinach or Carrots can Suplay significant Amount of vitamin A as Assessed by Feeding With Instrinsically deuterated Vegetables**, *AJCN* 82 : 821-828
- Trusswell, A.S. 2003. **ABC of Nutrition** . 4th. Ed. London : BMJ- Publising Group
- Winarsi, H. 2007. **Antioksidan Alami dan Radikal Bebas, Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan**, Yogyakarta: Kanisius, hal. 49-93
- Ware G. W. and Collum J.P. Mc. ,1975. **Producing Vegetable Crops**, The interstate Printer publisher Inc.
- Wijaya A., 1996. **Radikal Bebas dan Parameter Status Antioksidan**, *Forum Diagnosticum* (1): 1-11
- Youngson, R., 2005, **Antioksidan : manfaat vitamin C dan E bagi kesehatan**, alih bahasa: Susi Purwoko, Jakarta : Archan, hal. 45-52
- Young I.S., and WoodSide JV., 2000. **Antioxidant in Health and Desease**. *J. Clinical Pathology* (54) : 176 – 186
- Ziccarelli V.E and Basu T.K., 2003, **An in Vivo Studi of Antioxidant Potentials of a Plant Food Concentrate**, *JACN* vol.22, no.4, 277-282

LAMPIRAN 1. Penghitungan Besar Sampel

Besarnya sampel ditentukan dengan menggunakan rumus Steel and Torrie, 1982 sebagai berikut :

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

Keterangan :

t : banyaknya kelompok perlakuan

r : jumlah replikasi

Penggunaan rumus tersebut bila diperoleh derajat bebas (db) ≥ 15 , Dalam penelitian ini ada 5 kelompok perlakuan, sehingga diperoleh db sisa:

$$\text{db total} = 30 - 1 = 29$$

$$\text{db perlakuan} = 5 - 1 = 4$$

$$\text{db sisa} = 25$$

Banyaknya kelompok perlakuan dalam penelitian ini adalah 5, maka persamaan tersebut =

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

$$r \geq \frac{15}{4} + 1$$

$$r \geq 3,75 + 1$$

$$r \geq 4,75$$

Sehingga perulangan tiap kelompok perlakuan minimal 5, dalam penelitian ini perulangan menggunakan 6 individu setiap kelompok perlakuan.

LAMPIRAN 2. Tabel Konversi Dosis untuk Beberapa Jenis dan Manusia

| | Mencit 20g | Tikus 200g | Marmut 400g | Kelinci 1.5kg | Kucing 2kg | Kera 4kg | Anjing 12kg | Manusia 70kg |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|-----------------------|---------------------|------------------------|-------------------------|
| Mencit 20g | 1 | 7 | 2.25 | 27.8 | 29.7 | 64.1 | 124.2 | 387.9 |
| Tikus 200g | 0.14 | 1 | 1.74 | 3.9 | 4.2 | 9.2 | 17.8 | 56 |
| Marmut 400g | 0.08 | 0.57 | 1 | 2.25 | 2.4 | 5.2 | 10.2 | 31.5 |
| Kelinci 1.5kg | 0.04 | 0.25 | 0.44 | 1 | 1.08 | 2.4 | 4.5 | 14.2 |
| Kucing 2kg | 0.03 | 0.23 | 0.41 | 0.92 | 1 | 2.2 | 4.1 | 13 |
| Kera 4kg | 0.016 | 0.11 | 0.19 | 0.42 | 0.45 | 1 | 1.9 | 6.1 |
| Anjing 12kg | 0.008 | 0.06 | 0.1 | 0.22 | 0.24 | 0.52 | 1 | 3.1 |
| Manusia 70kg | 0.0026 | 0.018 | 0.031 | 0.07 | 0.076 | 0.16 | 0.32 | 1 |

Sumber : Kusumawati, 2004

LAMPIRAN 3. Komposisi Pakan Tikus

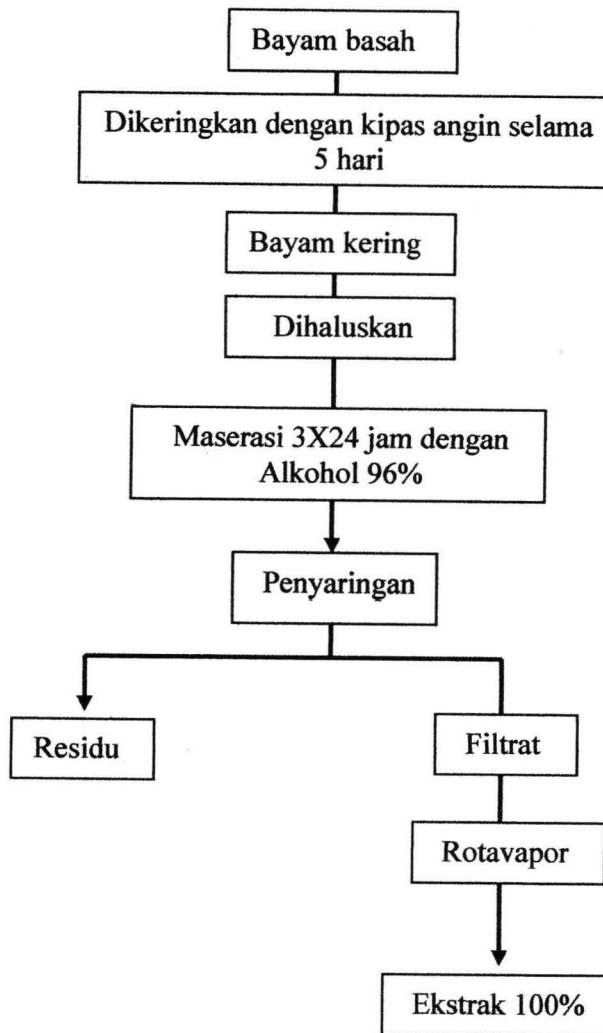
| | | |
|--------------|----------|---------|
| 1. Protein | maksimal | 21- 23% |
| 2. Lemak | minimal | 5,0% |
| 3. Serat | minimal | 5,0% |
| 4. Kadar Air | maksimal | 13% |
| 5. Abu | maksimal | 7% |
| 6. Kalsium | minimal | 0,9% |
| 7. Fosfat | minimal | 0,6% |

Sumber : PT. Charoen Pokphand Indonesia

LAMPIRAN 4. Proses Ekstraksi Bayam

1. Bayam basah ditimbang 5,4kg selanjutnya dikeringkan pada suhu kamar dengan kipas selama 5 hari, setelah kering bayam dikumpulkan lagi untuk ditimbang dengan timbangan analitik sampai beratnya konstan.
2. Bayam kering dihaluskan dengan menggunakan penggiling hingga menjadi bubuk halus.
3. Bubuk bayam kering ditimbang beratnya dengan menggunakan timbangan analitik
4. Ditambahkan ethanol 96 % sebanyak 2 liter diaduk sampai rata
5. Diinapkan selama kurang lebih 24 jam
6. Cairan disaring atau dipisahkan dengan *vacum pump Roch*, kemudian dievaporasi
7. Bubuk ditambahkan ethanol 96% lagi sampai larutan berwarna jernih
8. Evaporator *Buchii R-153* dipasang pada tiang permanen agar dapat tergantung dengan kemiringan $30^{\circ} - 40^{\circ}$ terhadap meja percobaan
9. Diletakkan satu set alat evaporator sehingga bagian labu pemisah ekstraksi terendam air dalam *water bath*
10. Hubungkan *waterbath* dengan sumber listrik dan naikan suhunya menjadi 70°C sesuai dengan titik didih ethanol
11. Biarkan sirkulasi berjalan sehingga hasil *evaporasi* tersisa di dalam labu pemisah ekstraksi
12. Hasil akhir ini yang akan dipergunakan dalam penelitian.

Secara skematis dapat dilihat sebagai berikut:



LAMPIRAN 5. Perhitungan Kadar Ekstrak Bayam

Bayam basah yang diekstrak dengan ethanol 96% seberat 5.403g menghasilkan 65,6g ekstrak kering, setiap 100g bayam basah mengandung 6090IU vitamin A. Dalam 5.403 g bayam basah (65,6 g ekstrak kering) mengandung :

$$\frac{5.403g}{100g} \times 6090 \text{ IU vitamin A} = 329.042,7 \text{ IU vitamin A}$$

Dari 65,5g ekstrak kering tersebut dibagi menjadi 5 bagian karena larutan stok dibuat hanya untuk 3 hari. Oleh karena itu dari total ekstrak bayam kering tersebut, diambil 12g lalu diencerkan dengan aquadest dan 1%CMC-Na menjadi 100ml larutan, larutan ini dinamakan larutan stok, sehingga dalam 1ml mengandung $\frac{12}{65.6} \times \frac{1}{100} \times 329.042,7 \text{ IU vitamin A} = 601,907403 \text{ IU vitamin A}$.

Besarnya konsentrasi ekstrak bayam yang akan diberikan berdasarkan rerata kebutuhan vitamin A harian berdasarkan hasil *International Health Interview Survey* (1992), untuk laki-laki 2900IU/ hari dan untuk wanita 2500 IU/hari, bila bertujuan untuk menurunkan resiko penyakit kronis membutuhkan 3000IU–6000IUvit. A/hari. Oleh karena itu dibuat 3 variasi suplementasi ekstrak bayam yang kemudian dikonversikan ke tikus dengan tabel konversi (konstanta konversi = 0,018) maka diperoleh hasil sebagai berikut:

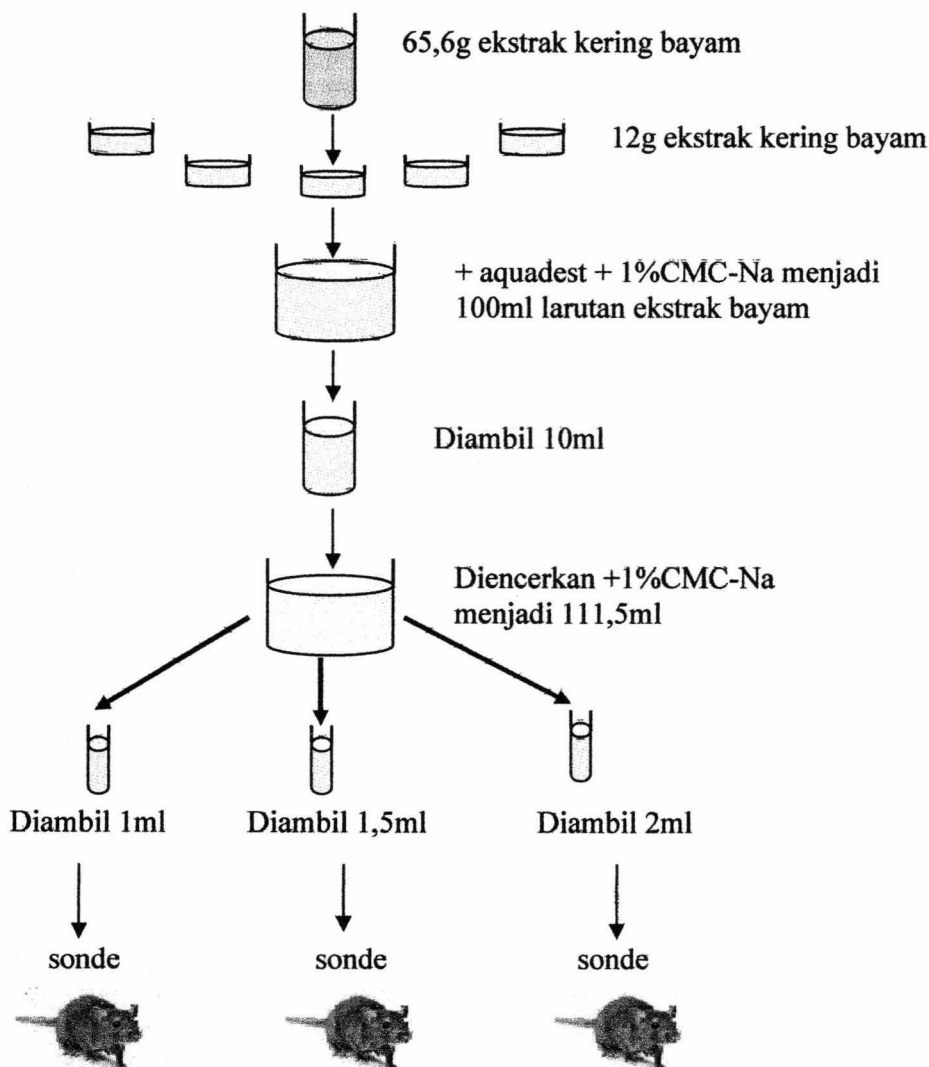
| Kelompok suplementasi | Hasil konversi |
|-----------------------|----------------|
| 1. Kadar 3000 IU | 54 IU |
| 2. Kadar 4500 IU | 81 IU |
| 3. Kadar 6000 IU | 108 IU |

Dari larutan stok tersebut di atas diambil 10ml sehingga mengandung : $10 \times 601,907403IU$ vitamin A = $6019,07403IU$ vitamin A. Untuk memperoleh 1ml ekstrak bayam dengan kandungan 54 vitamin A, dilakukan dengan cara mengambil 10ml dari larutan stok tersebut di atas selanjutnya diencerkan menjadi :

$$\frac{6019,07403IU}{54IU} \text{ ml} = 111,5\text{ml.}$$

Selanjutnya untuk kelompok suplementasi I hewan coba disonde dengan 1ml ekstrak bayam, untuk kelompok suplementasi II hewan coba disonde dengan 1.5ml ekstrak bayam kelompok suplementasi III hewan coba disonde dengan 2ml ekstrak bayam.

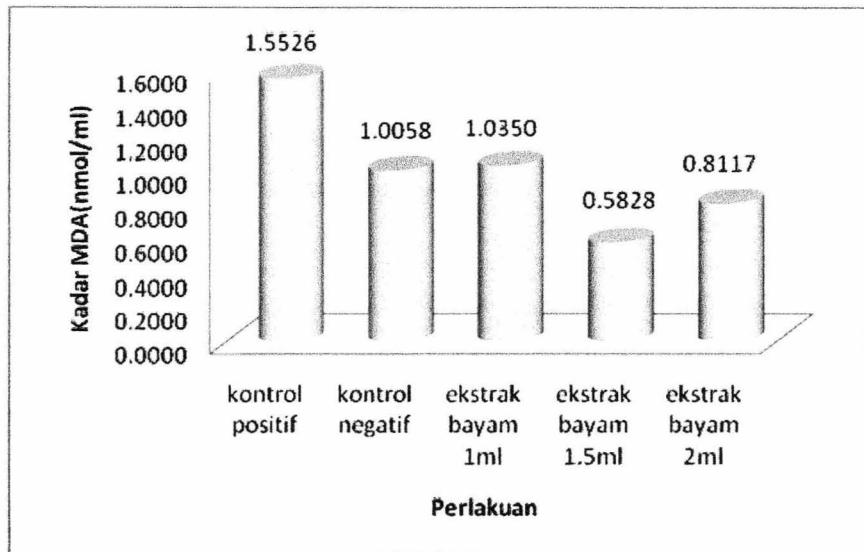
Secara skematis adalah sebagai berikut :



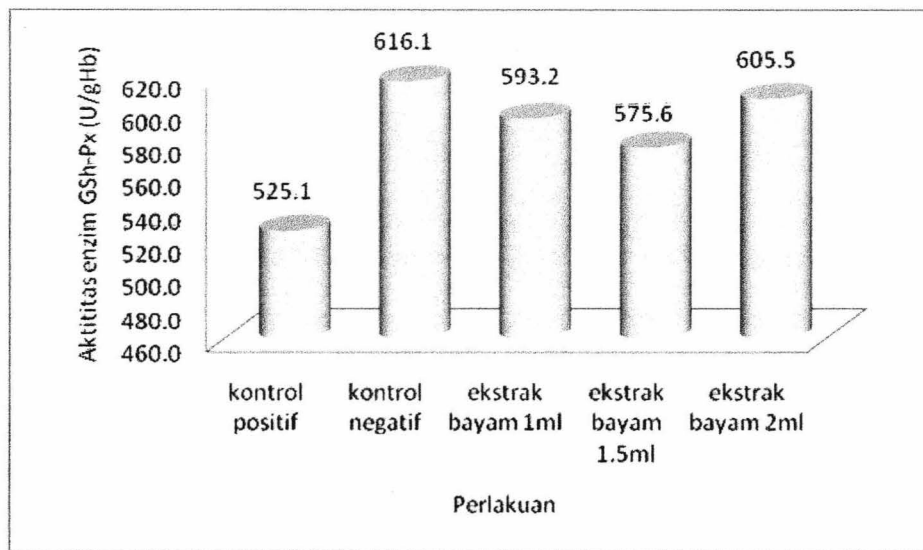
LAMPIRAN 6. Hasil Pengukuran Data

| PERLAKUAN | MDA(nmol/ml) | GSH-Px(U/gHb) | Hb(g/dl) | BB1(gr) | BB2(gr) |
|-----------|--------------|---------------|----------|---------|---------|
| k11 | 1.8917 | 522.9 | 16.2 | 174 | 155 |
| k12 | 1.8145 | 530.4 | 15.6 | 175 | 191 |
| k13 | 1.829 | 521.6 | 15.3 | 187 | 180 |
| k14 | 1.5056 | 500 | 14.1 | 160 | 168 |
| k17 | 1.0145 | 532.8 | 15.1 | 142 | 140 |
| k18 | 1.2601 | 542.7 | 13.5 | 177 | 179 |
| k21 | 0.8011 | 588.7 | 14.8 | 156 | 143 |
| k22 | 0.5556 | 630.6 | 14.2 | 165 | 152 |
| k23 | 1.5379 | 561.7 | 14.3 | 164 | 135 |
| k24 | 0.5556 | 624.7 | 13.9 | 173 | 129 |
| k26 | 1.0467 | 657.2 | 13.4 | 188 | 158 |
| k27 | 1.5379 | 633.9 | 13.8 | 165 | 145 |
| p11 | 0.8917 | 534.6 | 15.2 | 160 | 185 |
| p12 | 1.0145 | 623.6 | 15.2 | 172 | 195 |
| p13 | 0.8917 | 582.1 | 15.2 | 156 | 165 |
| p14 | 1.3829 | 653.3 | 15 | 157 | 165 |
| p15 | 0.7689 | 578.1 | 14.9 | 151 | 164 |
| p16 | 1.2601 | 587.4 | 14.1 | 152 | 160 |
| p21 | 0.4467 | 547.9 | 14.6 | 151 | 145 |
| p22 | 0.8011 | 578.6 | 15.3 | 154 | 152 |
| p23 | 0.2778 | 502.3 | 14.4 | 172 | 145 |
| p24 | 0.5556 | 644.8 | 12.8 | 172 | 160 |
| p25 | 0.7689 | 589.5 | 13.2 | 170 | 138 |
| p26 | 0.6467 | 590.5 | 15.7 | 192 | 165 |
| p31 | 0.8917 | 558.4 | 13.9 | 158 | 175 |
| p32 | 0.6284 | 622 | 14.7 | 152 | 130 |
| p33 | 0.8012 | 576.7 | 15.1 | 167 | 195 |
| p36 | 0.874 | 661.4 | 15.5 | 164 | 165 |
| p37 | 0.8917 | 670.2 | 15.1 | 148 | 160 |
| p38 | 0.7834 | 544.3 | 15.2 | 157 | 135 |

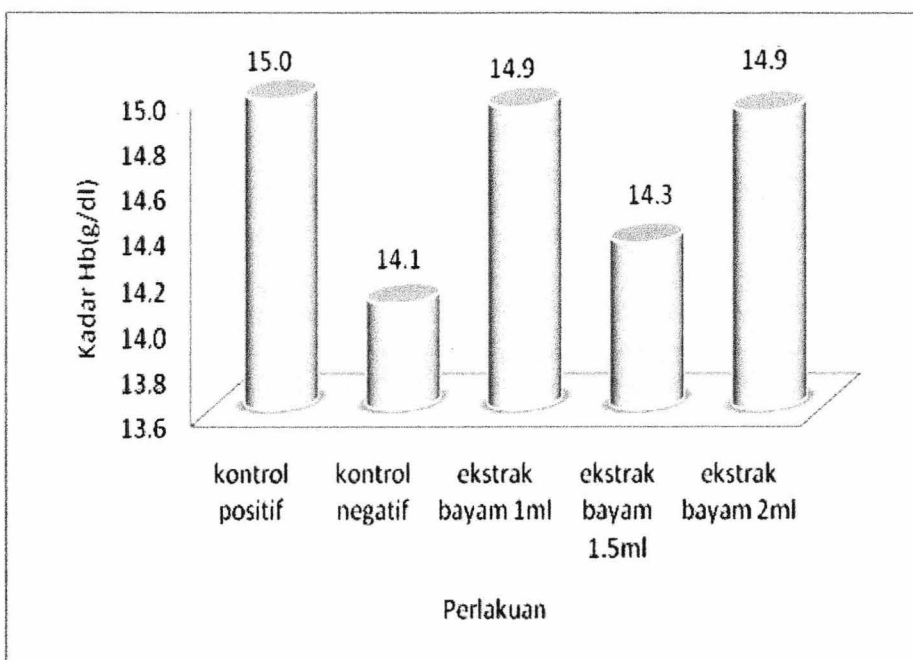
LAMPIRAN 7. Grafik Hasil Pengukuran Data



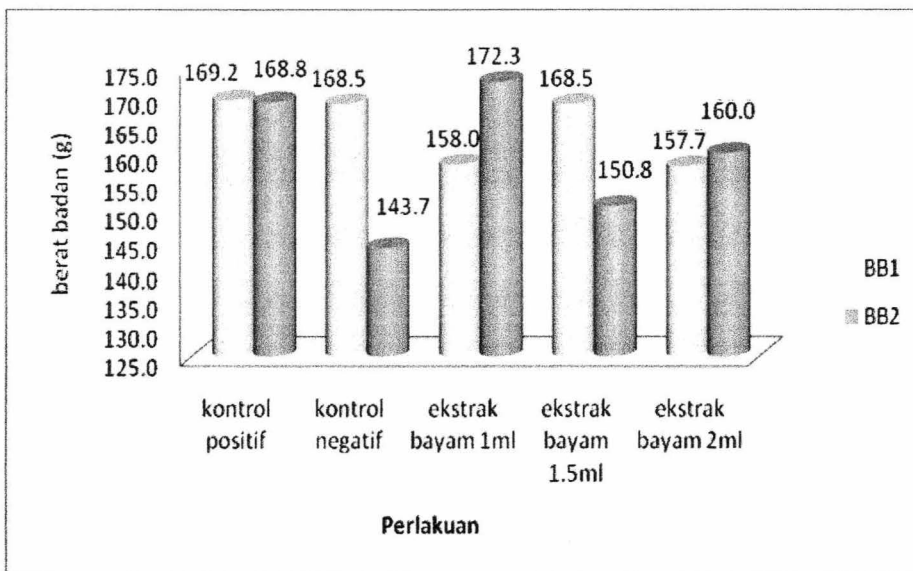
Grafik 1. Rerata Kadar MDA plasma pada tiap Perlakuan



Grafik 2. Rerata Aktivitas Enzim GSH-Px pada tiap Perlakuan



Grafik 3. Rerata Kadar Hb pada tiap Perlakuan



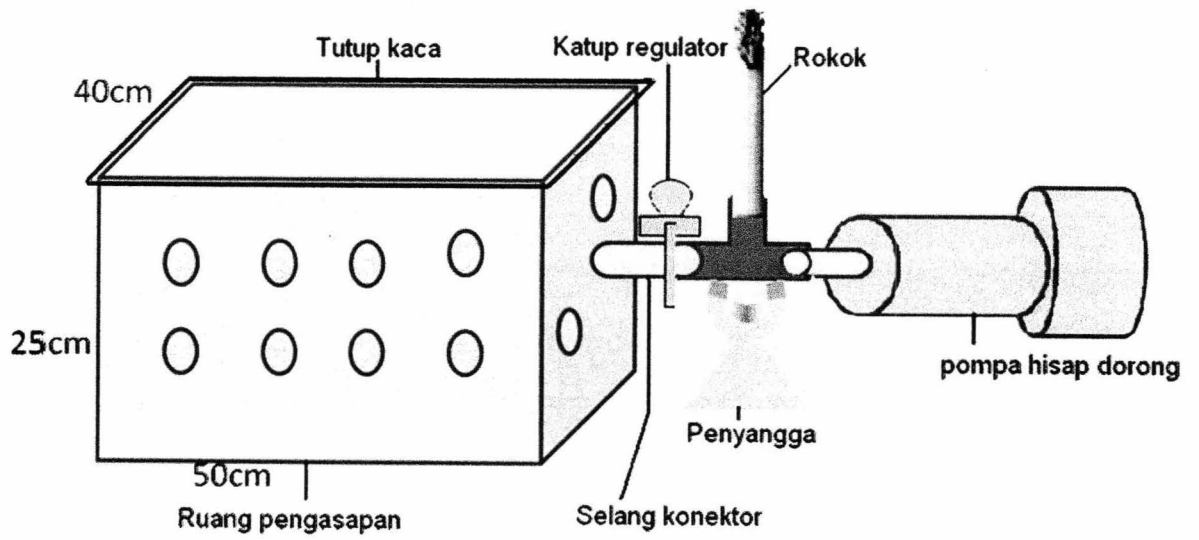
Keterangan :

BB1 : Berat Badan sebelum perlakuan

BB2 : Berat Badan sesudah perlakuan

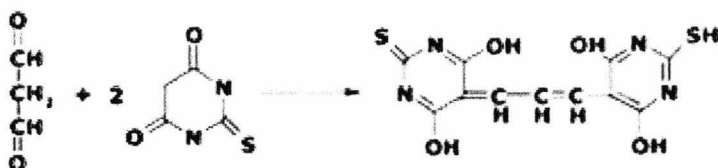
Grafik 4. Rerata Berat Badan sebelum Perlakuan dan sesudah Perlakuan

LAMPIRAN 8. Gambar sketsa *smoking pump*



LAMPIRAN 9. Pemeriksaan MDA

Konsentrasi MDA ditentukan dengan metoda metoda *thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)* Uchiyama dan Mihara. Prinsip metoda ini adalah pengaruh asam dan panas akan menyebabkan dekomposisi lipid peroksida dan terbentuk MDA. Reaksi MDA dan TBA pada pH 2-3 dan temperatur 97°C-100°C terbentuk warna merah muda. Reaksinya sebagai berikut :



Warna ini diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 529 nm. Reaksi yang paling populer dalam menentukan kadar MDA dalam sistem biologi

Cara kerjanya sebagai berikut :

1. Penentuan panjang gelombang maksimum dari MDA
2. Pembuatan kurva baku MDA
3. Pengukuran kadar MDA dari sample

Prosedur penentuan panjang gelombang maksimum dari MDA adalah sebagai berikut:

1. Larutan MDA konsentrasi tertentu ditambahkan 0,1ml TCA(asam trikloroasetat) 20%, 0,1ml Natrium Thiobarbiturat 1% dan HCl 1N sampai volume 10ml pada labu ukur.
2. Larutan pada nomor 1 di atas dipanaskan dengan penangas air selama 135 menit.
3. Larutan berwarna yang terbentuk sebanyak 3ml diekstraksi dengan 5ml larutan isobutanol. Fase isobutanol ini digunakan untuk menentukan panjang gelombang eksitasi dan emisi

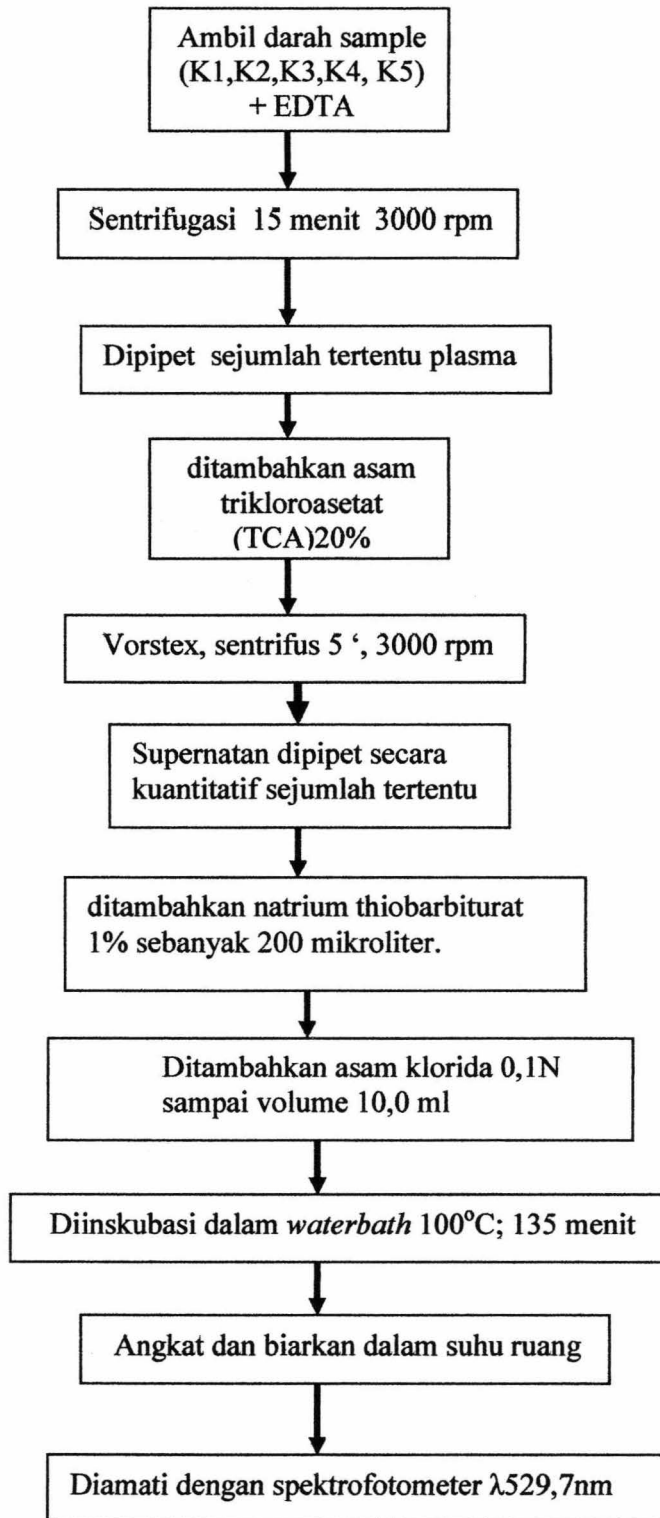
Pembuatan kurva baku MDA dilakukan dengan prosedur sebagai berikut;

1. Larutan MDA murni dipipet dengan *microsyrink* sebanyak 5 μ l, 10 μ l, 20 μ l, 50 μ l dan 200 μ l dan aquabidest sebagai blanko.
2. Masing-masing larutan tersebut di tambahkan 0,5ml TCA dan 200 μ l TBA
3. Masing-masing larutan diinkubasi pada penangas air(*water bath*) selama 135 menit.
4. Selanjutnya diamati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 529,7nm
5. Hasil pengamatan dibuat analisa regresi linear dan dihitung nilai koefisien korelasinya.

Pengukuran kadar MDA sampel adalah sebagai berikut;

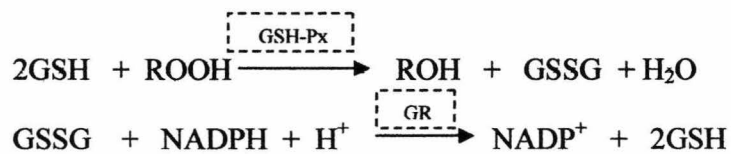
1. Diambil darah dari sampel sebanyak 2ml secara intracardial, dimasukkan dalam tabung fenojek yang sudah ada EDTA-nya.
2. Darah dalam tabung fenojek digojok secara perlahan dan disentrifugasi pada kecepatan 3000rpm selama 15 menit.
3. Dipipet bagian plasmanya dan digunakan sebagai bahan pengukuran MDA
4. Sampel plasma *divorstek* selama 5 menit selanjutnya dipipet 0,5ml dan ditambahkan 0,5cc TCA.
5. Larutan di atas disentrifugasi pada kecepatan 3000rpm selama 3menit dan super natan yang terbentuk dipipet sebanyak 0,5cc.
6. Larutan 0,5cc supernatant tersebut ditambahkan 0,5ccHCl 1N dan 200 μ l larutan TBA selanjutnya diinskubasi pada penangas air selama 135 menit.
7. Setelah diinskubasi larutan diencerkan menjadi 10cc dan diamati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 529,7nm, selanjutnya kadar dihitung berdasarkan kurva baku yang telah dibuat sebelumnya.

Prosedur kerja sebagai berikut :



LAMPIRAN 10. Pemeriksaan GSH-Px

Untuk mengukur aktifitas enzim GSH-Px , dengan menggunakan metoda Paglia dan Valentine, 1967. Pada prinsipnya *glutathione peroksidase* mengkatalisis reaksi oksidasi glutation(GSH). Keberadaan Glutation reduktase(GR) dan NADPH segera Glutation teroksidasi(GSSG) diubah menjadi bentuk tereduksi disertai oksidasi NADPH menjadi NADP^+ . Penurunan absobansi diukur pada panjang gelombang 340nm. Reaksinya sebagai berikut :



Prosedurnya adalah sebagai berikut :

1. Penentuan panjang gelombang (λ) maksimum (nm)
2. Pembuatan kurva baku
3. Pengukuran aktifitas GSH-Px pada sampel per gram Hb

Preparasi sampel :

1. Koleksi sampel sampel darah diberi larutan EDTA dan disentrifugasi pada temperature 4°C , 1000rpm selama 10 menit.
2. Dipipet plasma yang berwarna bening tanpa mengacaukan lapisan yang berwarna putih susu, simpan plasma pada suhu -80°C .
3. Lapisan putih susu (leukosit) dipisahkan atau dibuang,
4. Lisiskan eritrosit(sel darah merah) dalam 4 volume HPLC Disentrifugasi pada kecepatan 10000rpm pada suhu 4°C selama 15 menit.

5. Tampung supernatant eritrosit(*eritrosit lysat*), bahan ini yang akan dipergunakan untuk analisa aktifitas enzim GSH-Px

Pembuatan kurva Baku dan penghitungan aktifitas GSH-Px sampel

1. Pada sumuran non enzimatik ditambahkan 120 μ l larutan buffer, 50 μ l larutan campuran kosubstrat.
2. Pada sumuran larutan control positif (*Bovine eritrosit GSH-Px*) ditambahkan 100 μ l larutan buffer, 50 μ l larutan kosubstrat dan 20 μ l enzim GSH-Px (control),
3. Pada sumuran sampel ditambahkan 100 μ l larutan buffer, 50 μ l larutan kosubstrat dan 20 μ l sampel.
4. Tambahkan 20 μ l larutan Cumene hidropersid pada semua sumuran.
5. Secara hati-hati plate digojok untuk mencampur larutan.
6. Dibaca absorbansinya setiap menit dengan spektrofotometer pada 340nm dengan menggunakan plate reader untuk memperoleh paling sedikit 5 titik.
7. Tentukan perubahan absorbansi *Bovine eritrosit GSH-Px* per menit dengan plotting antara absorbansi terhadap fungsi waktu untuk memperoleh kurva linear.
8. Tentukan perubahan absorbansi permenit untuk sumuran non enzimatik (*background*) dan sumuran substrat (*sampel*). Ditentukan aktifitas enzim GSH-Px dengan persamaan yang diperoleh.

Between-Subjects Factors

| Perlakuan | Value Label | N |
|-----------|---------------------|---|
| 1 | kontrol positif | 6 |
| 2 | kontrol negatif | 6 |
| 3 | ekstrak bayam 1ml | 6 |
| 4 | ekstrak bayam 1.5ml | 6 |
| 5 | ekstrak bayam 2ml | 6 |

Descriptive Statistics

| | Perlakuan | Mean | Std. Deviation | N |
|-----|---------------------|----------|----------------|----|
| mda | kontrol positif | 1.552567 | .3570138 | 6 |
| | kontrol negatif | 1.005800 | .4505987 | 6 |
| | ekstrak bayam 1ml | 1.034967 | .2383290 | 6 |
| | ekstrak bayam 1.5ml | .582800 | .1993286 | 6 |
| | ekstrak bayam 2ml | .811733 | .1011843 | 6 |
| | Total | .997573 | .4268039 | 30 |
| gsh | kontrol positif | 525.0667 | 14.45153 | 6 |
| | kontrol negatif | 616.1333 | 34.64209 | 6 |
| | ekstrak bayam 1ml | 593.1833 | 40.87784 | 6 |
| | ekstrak bayam 1.5ml | 575.6000 | 47.65090 | 6 |
| | ekstrak bayam 2ml | 605.5000 | 53.62171 | 6 |
| | Total | 583.0967 | 49.77244 | 30 |
| Hb | kontrol positif | 14.9667 | .99532 | 6 |
| | kontrol negatif | 14.0667 | .48028 | 6 |
| | ekstrak bayam 1ml | 14.9333 | .42740 | 6 |
| | ekstrak bayam 1.5ml | 14.3333 | 1.14134 | 6 |
| | ekstrak bayam 2ml | 14.9167 | .56006 | 6 |
| | Total | 14.6433 | .81481 | 30 |
| BB1 | kontrol positif | 169.17 | 15.867 | 6 |
| | kontrol negatif | 168.50 | 10.968 | 6 |
| | ekstrak bayam 1ml | 158.00 | 7.616 | 6 |
| | ekstrak bayam 1.5ml | 168.50 | 14.802 | 6 |
| | ekstrak bayam 2ml | 157.67 | 7.118 | 6 |
| | Total | 164.37 | 12.254 | 30 |
| BB2 | kontrol positif | 168.83 | 18.670 | 6 |
| | kontrol negatif | 143.67 | 10.652 | 6 |
| | ekstrak bayam 1ml | 172.33 | 14.166 | 6 |
| | ekstrak bayam 1.5ml | 150.83 | 10.187 | 6 |
| | ekstrak bayam 2ml | 160.00 | 24.495 | 6 |
| | Total | 159.13 | 18.842 | 30 |

Box's Test of Equality of Covariance Matrices^a

IR – PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

| | |
|---------|----------|
| Box's M | 126.784 |
| F | 1.110 |
| df1 | 60 |
| df2 | 1254.496 |
| Sig. | .266 |

Tests the null hypothesis that the observed covariance matrices of the dependent variables are equal across groups.

a. Design: Intercept+perlakuan

Multivariate Tests^c

| Effect | | Value | F | Hypothesis df | Error df | Sig. |
|-----------|--------------------|---------|-----------------------|---------------|----------|------|
| Intercept | Pillai's Trace | .999 | 3952.193 ^a | 5.000 | 21.000 | .000 |
| | Wilks' Lambda | .001 | 3952.193 ^a | 5.000 | 21.000 | .000 |
| | Hotelling's Trace | 940.998 | 3952.193 ^a | 5.000 | 21.000 | .000 |
| | Roy's Largest Root | 940.998 | 3952.193 ^a | 5.000 | 21.000 | .000 |
| perlakuan | Pillai's Trace | 1.566 | 3.090 | 20.000 | 96.000 | .000 |
| | Wilks' Lambda | .092 | 3.710 | 20.000 | 70.599 | .000 |
| | Hotelling's Trace | 4.014 | 3.914 | 20.000 | 78.000 | .000 |
| | Roy's Largest Root | 2.256 | 10.829 ^b | 5.000 | 24.000 | .000 |

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

c. Design: Intercept+perlakuan

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

| | F | df1 | df2 | Sig. |
|-----|-------|-----|-----|------|
| mda | 4.348 | 4 | 25 | .008 |
| gsh | 2.190 | 4 | 25 | .099 |
| Hb | 2.447 | 4 | 25 | .073 |
| BB1 | 1.171 | 4 | 25 | .347 |
| BB2 | 1.490 | 4 | 25 | .235 |

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+perlakuan

| Source | Dependent Variable | Type III Sum of Squares | df | Mean Square |
|-----------------|--------------------|-------------------------|----|--------------|
| Corrected Model | mda | 3.096 ^a | 4 | .774 |
| | gsh | 30712.515 ^b | 4 | 7678.129 |
| | Hb | 4.152 ^c | 4 | 1.038 |
| | BB1 | 855.800 ^d | 4 | 213.950 |
| | BB2 | 3463.133 ^e | 4 | 865.783 |
| Intercept | mda | 29.855 | 1 | 29.855 |
| | gsh | 10200051.680 | 1 | 10200051.680 |
| | Hb | 6432.816 | 1 | 6432.816 |
| | BB1 | 810492.033 | 1 | 810492.033 |
| | BB2 | 759702.533 | 1 | 759702.533 |
| perlakuan | mda | 3.096 | 4 | .774 |
| | gsh | 30712.515 | 4 | 7678.129 |
| | Hb | 4.152 | 4 | 1.038 |
| | BB1 | 855.800 | 4 | 213.950 |
| | BB2 | 3463.133 | 4 | 865.783 |
| Error | mda | 2.186 | 25 | .087 |
| | gsh | 41129.075 | 25 | 1645.163 |
| | Hb | 15.102 | 25 | .604 |
| | BB1 | 3499.167 | 25 | 139.967 |
| | BB2 | 6832.333 | 25 | 273.293 |
| Total | mda | 35.137 | 30 | |
| | gsh | 10271893.270 | 30 | |
| | Hb | 6452.070 | 30 | |
| | BB1 | 814847.000 | 30 | |
| | BB2 | 769998.000 | 30 | |
| Corrected Total | mda | 5.283 | 29 | |
| | gsh | 71841.590 | 29 | |
| | Hb | 19.254 | 29 | |
| | BB1 | 4354.967 | 29 | |
| | BB2 | 10295.467 | 29 | |

| Source | Dependent Variable | F | Sig. |
|-----------------|--------------------|-----------|------|
| Corrected Model | mda | 8.851 | .000 |
| | gsh | 4.667 | .006 |
| | Hb | 1.718 | .177 |
| | BB1 | 1.529 | .224 |
| | BB2 | 3.168 | .031 |
| Intercept | mda | 341.376 | .000 |
| | gsh | 6200.025 | .000 |
| | Hb | 10649.183 | .000 |
| | BB1 | 5790.608 | .000 |
| | BB2 | 2779.806 | .000 |
| perlakuan | mda | 8.851 | .000 |
| | gsh | 4.667 | .006 |
| | Hb | 1.718 | .177 |
| | BB1 | 1.529 | .224 |
| | BB2 | 3.168 | .031 |
| Error | mda | | |
| | gsh | | |
| | Hb | | |
| | BB1 | | |
| | BB2 | | |
| Total | mda | | |
| | gsh | | |
| | Hb | | |
| | BB1 | | |
| | BB2 | | |
| Corrected Total | mda | | |
| | gsh | | |
| | Hb | | |
| | BB1 | | |
| | BB2 | | |

- a. R Squared = .586 (Adjusted R Squared = .520)
- b. R Squared = .428 (Adjusted R Squared = .336)
- c. R Squared = .216 (Adjusted R Squared = .090)
- d. R Squared = .197 (Adjusted R Squared = .068)
- e. R Squared = .336 (Adjusted R Squared = .230)

Estimated Marginal Means

| Dependent Variable | Perlakuan | Mean | Std. Error | 95% Confidence Interval | |
|--------------------|---------------------|---------|------------|-------------------------|-------------|
| | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| mda | kontrol positif | 1.553 | .121 | 1.304 | 1.801 |
| | kontrol negatif | 1.006 | .121 | .757 | 1.254 |
| | ekstrak bayam 1ml | 1.035 | .121 | .786 | 1.284 |
| | ekstrak bayam 1.5ml | .583 | .121 | .334 | .831 |
| | ekstrak bayam 2ml | .812 | .121 | .563 | 1.060 |
| gsh | kontrol positif | 525.067 | 16.559 | 490.963 | 559.170 |
| | kontrol negatif | 616.133 | 16.559 | 582.030 | 650.237 |
| | ekstrak bayam 1ml | 593.183 | 16.559 | 559.080 | 627.287 |
| | ekstrak bayam 1.5ml | 575.600 | 16.559 | 541.497 | 609.703 |
| | ekstrak bayam 2ml | 605.500 | 16.559 | 571.397 | 639.603 |
| Hb | kontrol positif | 14.967 | .317 | 14.313 | 15.620 |
| | kontrol negatif | 14.067 | .317 | 13.413 | 14.720 |
| | ekstrak bayam 1ml | 14.933 | .317 | 14.280 | 15.587 |
| | ekstrak bayam 1.5ml | 14.333 | .317 | 13.680 | 14.987 |
| | ekstrak bayam 2ml | 14.917 | .317 | 14.263 | 15.570 |
| BB1 | kontrol positif | 169.167 | 4.830 | 159.219 | 179.114 |
| | kontrol negatif | 168.500 | 4.830 | 158.553 | 178.447 |
| | ekstrak bayam 1ml | 158.000 | 4.830 | 148.053 | 167.947 |
| | ekstrak bayam 1.5ml | 168.500 | 4.830 | 158.553 | 178.447 |
| | ekstrak bayam 2ml | 157.667 | 4.830 | 147.719 | 167.614 |
| BB2 | kontrol positif | 168.833 | 6.749 | 154.934 | 182.733 |
| | kontrol negatif | 143.667 | 6.749 | 129.767 | 157.566 |
| | ekstrak bayam 1ml | 172.333 | 6.749 | 158.434 | 186.233 |
| | ekstrak bayam 1.5ml | 150.833 | 6.749 | 136.934 | 164.733 |
| | ekstrak bayam 2ml | 160.000 | 6.749 | 146.100 | 173.900 |

Perlakuan

Multiple Comparisons

| Dependent Variable | (I) Perlakuan | (J) Perlakuan | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | | | |
|--------------------|---------------|---------------------|-----------------------|---------------------|----------|-------------------------|-------------|----------|----------|
| | | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| mda | LSD | kontrol positif | kontrol negatif | .546767* | .1707374 | .004 | .195126 | .898407 | |
| | | | ekstrak bayam 1ml | .517600* | .1707374 | .006 | .165960 | .869240 | |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | .969767* | .1707374 | .000 | .618126 | 1.321407 | |
| | | | ekstrak bayam 2ml | .740833* | .1707374 | .000 | .389193 | 1.092474 | |
| | | kontrol negatif | kontrol positif | -.546767* | .1707374 | .004 | -.898407 | -.195126 | |
| | | | ekstrak bayam 1ml | -.029167 | .1707374 | .866 | -.380807 | .322474 | |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | .423000* | .1707374 | .020 | .071360 | .774640 | |
| | | | ekstrak bayam 2ml | .194067 | .1707374 | .266 | -.157574 | .545707 | |
| | | ekstrak bayam 1ml | kontrol positif | -.517600* | .1707374 | .006 | -.869240 | -.165960 | |
| | | | kontrol negatif | .029167 | .1707374 | .866 | -.322474 | .380807 | |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | .452167* | .1707374 | .014 | .100526 | .803807 | |
| | | | ekstrak bayam 2ml | .223233 | .1707374 | .203 | -.128407 | .574874 | |
| | | ekstrak bayam 1.5ml | kontrol positif | -.969767* | .1707374 | .000 | -1.321407 | -.618126 | |
| | | | kontrol negatif | -.423000* | .1707374 | .020 | -.774640 | -.071360 | |
| | | | ekstrak bayam 1ml | -.452167* | .1707374 | .014 | -.803807 | -.100526 | |
| | | | ekstrak bayam 2ml | -.228933 | .1707374 | .192 | -.580574 | .122707 | |
| | | ekstrak bayam 2ml | kontrol positif | -.740833* | .1707374 | .000 | -1.092474 | -.389193 | |
| | | | kontrol negatif | -.194067 | .1707374 | .266 | -.545707 | .157574 | |
| | | | ekstrak bayam 1ml | -.223233 | .1707374 | .203 | -.574874 | .128407 | |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | .228933 | .1707374 | .192 | -.122707 | .580574 | |
| | | Tamhane | kontrol positif | kontrol negatif | .546767 | .2346977 | .358 | -.302237 | 1.395771 |
| | | | | ekstrak bayam 1ml | .517600 | .1752425 | .155 | -.132664 | 1.167864 |
| | | | | ekstrak bayam 1.5ml | .969767* | .1669285 | .004 | .328247 | 1.611286 |
| | | | | ekstrak bayam 2ml | .740833* | .1514910 | .030 | .078853 | 1.402814 |

Based on observed means.

Multiple Comparisons
IR – PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

| Dependent Variable | (I) Perlakuan | (J) Perlakuan | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | | |
|--------------------|---------------|---------------------|-----------------------|------------|----------|-------------------------|-------------|----------|
| | | | | | | Lower Bound | Upper Bound | |
| mda | Tamhane | kontrol negatif | kontrol positif | -.546767 | .2346977 | .358 | -1.395771 | .302237 |
| | | | ekstrak bayam 1ml | -.029167 | .2081025 | 1.000 | -.838152 | .779819 |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | .423000 | .2011513 | .538 | -.389355 | 1.235355 |
| | | | ekstrak bayam 2ml | .194067 | .1885371 | .986 | -.652768 | 1.040902 |
| | | ekstrak bayam 1ml | kontrol positif | -.517600 | .1752425 | .155 | -1.167864 | .132664 |
| | | | kontrol negatif | .029167 | .2081025 | 1.000 | -.779819 | .838152 |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | .452167 | .1268415 | .053 | -.004115 | .908448 |
| | | | ekstrak bayam 2ml | .223233 | .1057032 | .537 | -.207299 | .653766 |
| | | ekstrak bayam 1.5ml | kontrol positif | -.969767* | .1669285 | .004 | -1.611286 | -.328247 |
| | | | kontrol negatif | -.423000 | .2011513 | .538 | -1.235355 | .389355 |
| | | | ekstrak bayam 1ml | -.452167 | .1268415 | .053 | -.908448 | .004115 |
| | | | ekstrak bayam 2ml | -.228933 | .0912598 | .326 | -.586840 | .128973 |
| | | ekstrak bayam 2ml | kontrol positif | -.740833* | .1514910 | .030 | -1.402814 | -.078853 |
| | | | kontrol negatif | -.194067 | .1885371 | .986 | -1.040902 | .652768 |
| | | | ekstrak bayam 1ml | -.223233 | .1057032 | .537 | -.653766 | .207299 |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | .228933 | .0912598 | .326 | -.128973 | .586840 |
| gsh | LSD | kontrol positif | kontrol negatif | -91.0667* | 23.41768 | .001 | -139.2963 | -42.8371 |
| | | | ekstrak bayam 1ml | -68.1167* | 23.41768 | .008 | -116.3463 | -19.8871 |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | -50.5333* | 23.41768 | .041 | -98.7629 | -2.3037 |
| | | | ekstrak bayam 2ml | -80.4333* | 23.41768 | .002 | -128.6629 | -32.2037 |
| | | kontrol negatif | kontrol positif | 91.0667* | 23.41768 | .001 | 42.8371 | 139.2963 |
| | | | ekstrak bayam 1ml | 22.9500 | 23.41768 | .336 | -25.2796 | 71.1796 |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | 40.5333 | 23.41768 | .096 | -7.6963 | 88.7629 |
| | | | ekstrak bayam 2ml | 10.6333 | 23.41768 | .654 | -37.5963 | 58.8629 |
| | | ekstrak bayam 1ml | kontrol positif | 68.1167* | 23.41768 | .008 | 19.8871 | 116.3463 |
| | | | kontrol negatif | -22.9500 | 23.41768 | .336 | -71.1796 | 25.2796 |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | 17.5833 | 23.41768 | .460 | -30.6463 | 65.8129 |
| | | | ekstrak bayam 2ml | -12.3167 | 23.41768 | .604 | -60.5463 | 35.9129 |

Based on observed means.

Multiple Comparisons
IR – PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

| Dependent Variable | (I) Perlakuan | (J) Perlakuan | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | | | |
|--------------------|---------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------|-------------------------|-------------|-----------|----------|
| | | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| gsh | LSD | ekstrak bayam 1.5ml | kontrol positif | 50.5333* | 23.41768 | .041 | 2.3037 | 98.7629 | |
| | | | kontrol negatif | -40.5333 | 23.41768 | .096 | -88.7629 | 7.6963 | |
| | | | ekstrak bayam 1ml | -17.5833 | 23.41768 | .460 | -65.8129 | 30.6463 | |
| | | | ekstrak bayam 2ml | -29.9000 | 23.41768 | .213 | -78.1296 | 18.3296 | |
| | | ekstrak bayam 2ml | kontrol positif | 80.4333* | 23.41768 | .002 | 32.2037 | 128.6629 | |
| | | | kontrol negatif | -10.6333 | 23.41768 | .654 | -58.8629 | 37.5963 | |
| | | | ekstrak bayam 1ml | 12.3167 | 23.41768 | .604 | -35.9129 | 60.5463 | |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | 29.9000 | 23.41768 | .213 | -18.3296 | 78.1296 | |
| | Tamhane | kontrol positif | kontrol negatif | ekstrak bayam 1ml | -91.0667* | 15.32384 | .007 | -153.7052 | -28.4281 |
| | | | | ekstrak bayam 1.5ml | -68.1167 | 17.70049 | .076 | -142.7990 | 6.5657 |
| | | | | ekstrak bayam 1.5ml | -50.5333 | 20.32837 | .389 | -138.4977 | 37.4310 |
| | | | | ekstrak bayam 2ml | -80.4333 | 22.67206 | .124 | -180.1749 | 19.3082 |
| | | | kontrol negatif | kontrol positif | 91.0667* | 15.32384 | .007 | 28.4281 | 153.7052 |
| | | | | ekstrak bayam 1ml | 22.9500 | 21.87492 | .979 | -55.6486 | 101.5486 |
| | | | | ekstrak bayam 1.5ml | 40.5333 | 24.05093 | .739 | -47.4718 | 128.5385 |
| | | | | ekstrak bayam 2ml | 10.6333 | 26.06199 | 1.000 | -86.6500 | 107.9166 |
| | | ekstrak bayam 1ml | kontrol positif | kontrol negatif | 68.1167 | 17.70049 | .076 | -6.5657 | 142.7990 |
| | | | | kontrol negatif | -22.9500 | 21.87492 | .979 | -101.5486 | 55.6486 |
| | | | | ekstrak bayam 1.5ml | 17.5833 | 25.63073 | .999 | -74.4184 | 109.5851 |
| | | | | ekstrak bayam 2ml | -12.3167 | 27.52661 | 1.000 | -112.3684 | 87.7351 |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | kontrol positif | 50.5333 | 20.32837 | .389 | -37.4310 | 138.4977 |
| | | | | kontrol negatif | -40.5333 | 24.05093 | .739 | -128.5385 | 47.4718 |
| | | | | ekstrak bayam 1ml | -17.5833 | 25.63073 | .999 | -109.5851 | 74.4184 |
| | | | | ekstrak bayam 2ml | -29.9000 | 29.28565 | .982 | -134.7615 | 74.9615 |
| ekstrak bayam 2ml | | kontrol positif | kontrol negatif | 80.4333 | 22.67206 | .124 | -19.3082 | 180.1749 | |
| | | | kontrol negatif | -10.6333 | 26.06199 | 1.000 | -107.9166 | 86.6500 | |
| | | | ekstrak bayam 1ml | 12.3167 | 27.52661 | 1.000 | -87.7351 | 112.3684 | |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | 29.9000 | 29.28565 | .982 | -74.9615 | 134.7615 | |

Based on observed means.

Multiple Comparisons

IR – PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

| Dependent Variable | (I) Perlakuan | (J) Perlakuan | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | | |
|--------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|------------|--------|-------------------------|-------------|--------|
| | | | | | | Lower Bound | Upper Bound | |
| Hb | LSD | kontrol positif | kontrol negatif | .9000 | .44873 | .056 | -.0242 | 1.8242 |
| | | | ekstrak bayam 1ml | .0333 | .44873 | .941 | -.8908 | .9575 |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | .6333 | .44873 | .170 | -.2908 | 1.5575 |
| | | | ekstrak bayam 2ml | .0500 | .44873 | .912 | -.8742 | .9742 |
| | | kontrol negatif | kontrol positif | -.9000 | .44873 | .056 | -1.8242 | .0242 |
| | | | ekstrak bayam 1ml | -.8667 | .44873 | .065 | -1.7908 | .0575 |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | -.2667 | .44873 | .558 | -1.1908 | .6575 |
| | | | ekstrak bayam 2ml | -.8500 | .44873 | .070 | -1.7742 | .0742 |
| | | ekstrak bayam 1ml | kontrol positif | -.0333 | .44873 | .941 | -.9575 | .8908 |
| | | | kontrol negatif | .8667 | .44873 | .065 | -.0575 | 1.7908 |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | .6000 | .44873 | .193 | -.3242 | 1.5242 |
| | | | ekstrak bayam 2ml | .0167 | .44873 | .971 | -.9075 | .9408 |
| | ekstrak bayam 1.5ml | kontrol positif | -.6333 | .44873 | .170 | -1.5575 | .2908 | |
| | | kontrol negatif | .2667 | .44873 | .558 | -.6575 | 1.1908 | |
| | | ekstrak bayam 1ml | -.6000 | .44873 | .193 | -1.5242 | .3242 | |
| | | ekstrak bayam 2ml | -.5833 | .44873 | .205 | -1.5075 | .3408 | |
| | ekstrak bayam 2ml | kontrol positif | -.0500 | .44873 | .912 | -.9742 | .8742 | |
| | | kontrol negatif | .8500 | .44873 | .070 | -.0742 | 1.7742 | |
| | | ekstrak bayam 1ml | -.0167 | .44873 | .971 | -.9408 | .9075 | |
| | | ekstrak bayam 1.5ml | .5833 | .44873 | .205 | -.3408 | 1.5075 | |
| | Tamhane | kontrol positif | kontrol negatif | .9000 | .45117 | .589 | -.8888 | 2.6888 |
| | | | ekstrak bayam 1ml | .0333 | .44222 | 1.000 | -1.7636 | 1.8303 |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | .6333 | .61824 | .982 | -1.5831 | 2.8498 |
| | | | ekstrak bayam 2ml | .0500 | .46625 | 1.000 | -1.7389 | 1.8389 |
| kontrol negatif | | kontrol positif | -.9000 | .45117 | .589 | -2.6888 | .8888 | |
| | | ekstrak bayam 1ml | -.8667 | .26247 | .078 | -1.8064 | .0731 | |
| | | ekstrak bayam 1.5ml | -.2667 | .50553 | 1.000 | -2.3294 | 1.7961 | |
| | | ekstrak bayam 2ml | -.8500 | .30120 | .170 | -1.9312 | .2312 | |

Based on observed means.

Multiple Comparisons
IR – PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

| Dependent Variable | (I) Perlakuan | (J) Perlakuan | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | | |
|--------------------|---------------|---------------------|-----------------------|------------|--------|-------------------------|-------------|--------|
| | | | | | | Lower Bound | Upper Bound | |
| Hb | Tamhane | ekstrak bayam 1ml | kontrol positif | -.0333 | .44222 | 1.000 | -1.8303 | 1.7636 |
| | | | kontrol negatif | .8667 | .26247 | .078 | -.0731 | 1.8064 |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | .6000 | .49755 | .957 | -1.4773 | 2.6773 |
| | | | ekstrak bayam 2ml | .0167 | .28761 | 1.000 | -1.0286 | 1.0619 |
| | | ekstrak bayam 1.5ml | kontrol positif | -.6333 | .61824 | .982 | -2.8498 | 1.5831 |
| | | | kontrol negatif | .2667 | .50553 | 1.000 | -1.7961 | 2.3294 |
| | | | ekstrak bayam 1ml | -.6000 | .49755 | .957 | -2.6773 | 1.4773 |
| | | | ekstrak bayam 2ml | -.5833 | .51903 | .970 | -2.6338 | 1.4671 |
| | | ekstrak bayam 2ml | kontrol positif | -.0500 | .46625 | 1.000 | -1.8389 | 1.7389 |
| | | | kontrol negatif | .8500 | .30120 | .170 | -.2312 | 1.9312 |
| | | | ekstrak bayam 1ml | -.0167 | .28761 | 1.000 | -1.0619 | 1.0286 |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | .5833 | .51903 | .970 | -1.4671 | 2.6338 |
| BB1 | LSD | kontrol positif | kontrol negatif | .67 | 6.830 | .923 | -13.40 | 14.73 |
| | | | ekstrak bayam 1ml | 11.17 | 6.830 | .115 | -2.90 | 25.23 |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | .67 | 6.830 | .923 | -13.40 | 14.73 |
| | | | ekstrak bayam 2ml | 11.50 | 6.830 | .105 | -2.57 | 25.57 |
| | | kontrol negatif | kontrol positif | -.67 | 6.830 | .923 | -14.73 | 13.40 |
| | | | ekstrak bayam 1ml | 10.50 | 6.830 | .137 | -3.57 | 24.57 |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | .00 | 6.830 | 1.000 | -14.07 | 14.07 |
| | | | ekstrak bayam 2ml | 10.83 | 6.830 | .125 | -3.23 | 24.90 |
| | | ekstrak bayam 1ml | kontrol positif | -11.17 | 6.830 | .115 | -25.23 | 2.90 |
| | | | kontrol negatif | -10.50 | 6.830 | .137 | -24.57 | 3.57 |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | -10.50 | 6.830 | .137 | -24.57 | 3.57 |
| | | | ekstrak bayam 2ml | .33 | 6.830 | .961 | -13.73 | 14.40 |
| | | ekstrak bayam 1.5ml | kontrol positif | -.67 | 6.830 | .923 | -14.73 | 13.40 |
| | | | kontrol negatif | .00 | 6.830 | 1.000 | -14.07 | 14.07 |
| | | | ekstrak bayam 1ml | 10.50 | 6.830 | .137 | -3.57 | 24.57 |
| | | | ekstrak bayam 2ml | 10.83 | 6.830 | .125 | -3.23 | 24.90 |

Based on observed means.

Multiple Comparisons
IR – PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

| Dependent Variable | (I) Perlakuan | (J) Perlakuan | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | | | |
|--------------------|-----------------|---------------------|-----------------------|---------------------|--------|-------------------------|-------------|--------|-------|
| | | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| BB1 | LSD | ekstrak bayam 2ml | kontrol positif | -11.50 | 6.830 | .105 | -25.57 | 2.57 | |
| | | | kontrol negatif | -10.83 | 6.830 | .125 | -24.90 | 3.23 | |
| | | | ekstrak bayam 1ml | -.33 | 6.830 | .961 | -14.40 | 13.73 | |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | -10.83 | 6.830 | .125 | -24.90 | 3.23 | |
| | Tamhane | kontrol positif | kontrol negatif | kontrol negatif | .67 | 7.875 | 1.000 | -28.38 | 29.71 |
| | | | | ekstrak bayam 1ml | 11.17 | 7.185 | .831 | -17.35 | 39.69 |
| | | | | ekstrak bayam 1.5ml | .67 | 8.859 | 1.000 | -30.98 | 32.31 |
| | | | | ekstrak bayam 2ml | 11.50 | 7.100 | .802 | -17.09 | 40.09 |
| | | kontrol negatif | kontrol positif | kontrol positif | -.67 | 7.875 | 1.000 | -29.71 | 28.38 |
| | | | | ekstrak bayam 1ml | 10.50 | 5.451 | .595 | -9.59 | 30.59 |
| | | | | ekstrak bayam 1.5ml | .00 | 7.521 | 1.000 | -27.44 | 27.44 |
| | | | | ekstrak bayam 2ml | 10.83 | 5.338 | .539 | -9.08 | 30.74 |
| | | ekstrak bayam 1ml | kontrol positif | kontrol positif | -11.17 | 7.185 | .831 | -39.69 | 17.35 |
| | | | | kontrol negatif | -10.50 | 5.451 | .595 | -30.59 | 9.59 |
| | | | | ekstrak bayam 1.5ml | -10.50 | 6.796 | .832 | -37.08 | 16.08 |
| | | | | ekstrak bayam 2ml | .33 | 4.256 | 1.000 | -14.87 | 15.53 |
| | | ekstrak bayam 1.5ml | kontrol positif | kontrol positif | -.67 | 8.859 | 1.000 | -32.31 | 30.98 |
| | | | | kontrol negatif | .00 | 7.521 | 1.000 | -27.44 | 27.44 |
| | | | | ekstrak bayam 1ml | 10.50 | 6.796 | .832 | -16.08 | 37.08 |
| | | | | ekstrak bayam 2ml | 10.83 | 6.705 | .801 | -15.77 | 37.44 |
| ekstrak bayam 2ml | kontrol positif | kontrol positif | -11.50 | 7.100 | .802 | -40.09 | 17.09 | | |
| | | kontrol negatif | -10.83 | 5.338 | .539 | -30.74 | 9.08 | | |
| | | ekstrak bayam 1ml | -.33 | 4.256 | 1.000 | -15.53 | 14.87 | | |
| | | ekstrak bayam 1.5ml | -10.83 | 6.705 | .801 | -37.44 | 15.77 | | |
| BB2 | LSD | kontrol positif | kontrol negatif | 25.17* | 9.545 | .014 | 5.51 | 44.82 | |
| | | | ekstrak bayam 1ml | -3.50 | 9.545 | .717 | -23.16 | 16.16 | |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | 18.00 | 9.545 | .071 | -1.66 | 37.66 | |
| | | | ekstrak bayam 2ml | 8.83 | 9.545 | .364 | -10.82 | 28.49 | |

Based on observed means.

Multiple Comparisons

IP - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

| Dependent Variable | (I) Perlakuan | (J) Perlakuan | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | | |
|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|------------|--------|-------------------------|-------------|-------|
| | | | | | | Lower Bound | Upper Bound | |
| BB2 | LSD | kontrol negatif | kontrol positif | -25.17* | 9.545 | .014 | -44.82 | -5.51 |
| | | | ekstrak bayam 1ml | -28.67* | 9.545 | .006 | -48.32 | -9.01 |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | -7.17 | 9.545 | .460 | -26.82 | 12.49 |
| | | | ekstrak bayam 2ml | -16.33 | 9.545 | .099 | -35.99 | 3.32 |
| | | ekstrak bayam 1ml | kontrol positif | 3.50 | 9.545 | .717 | -16.16 | 23.16 |
| | | | kontrol negatif | 28.67* | 9.545 | .006 | 9.01 | 48.32 |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | 21.50* | 9.545 | .033 | 1.84 | 41.16 |
| | | ekstrak bayam 1.5ml | ekstrak bayam 2ml | 12.33 | 9.545 | .208 | -7.32 | 31.99 |
| | | | kontrol positif | -18.00 | 9.545 | .071 | -37.66 | 1.66 |
| | | | kontrol negatif | 7.17 | 9.545 | .460 | -12.49 | 26.82 |
| | ekstrak bayam 2ml | ekstrak bayam 1ml | -21.50* | 9.545 | .033 | -41.16 | -1.84 | |
| | | ekstrak bayam 2ml | -9.17 | 9.545 | .346 | -28.82 | 10.49 | |
| | | kontrol positif | -8.83 | 9.545 | .364 | -28.49 | 10.82 | |
| | | kontrol negatif | 16.33 | 9.545 | .099 | -3.32 | 35.99 | |
| | Tamhane | kontrol positif | kontrol negatif | 25.17 | 8.775 | .192 | -8.41 | 58.74 |
| | | | ekstrak bayam 1ml | -3.50 | 9.568 | 1.000 | -38.30 | 31.30 |
| | | | ekstrak bayam 1.5ml | 18.00 | 8.683 | .532 | -15.53 | 51.53 |
| | | | ekstrak bayam 2ml | 8.83 | 12.574 | .999 | -36.87 | 54.54 |
| | | kontrol negatif | kontrol positif | -25.17 | 8.775 | .192 | -58.74 | 8.41 |
| | | | ekstrak bayam 1ml | -28.67* | 7.236 | .031 | -55.01 | -2.32 |
| ekstrak bayam 1.5ml | | | -7.17 | 6.017 | .952 | -28.64 | 14.31 | |
| ekstrak bayam 2ml | | | -16.33 | 10.905 | .861 | -60.53 | 27.86 | |
| ekstrak bayam 1ml | | kontrol positif | 3.50 | 9.568 | 1.000 | -31.30 | 38.30 | |
| | | kontrol negatif | 28.67* | 7.236 | .031 | 2.32 | 55.01 | |
| | ekstrak bayam 1.5ml | 21.50 | 7.123 | .135 | -4.61 | 47.61 | | |
| | ekstrak bayam 2ml | 12.33 | 11.552 | .978 | -31.74 | 56.40 | | |

Based on observed means.

Multiple Comparisons
IR – PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

| Dependent Variable | (I) Perlakuan | (J) Perlakuan | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | | |
|--------------------|-------------------|---------------------|-----------------------|------------|--------|-------------------------|-------------|-------|
| | | | | | | Lower Bound | Upper Bound | |
| BB2 | Tamhane | ekstrak bayam 1.5ml | kontrol positif | -18.00 | 8.683 | .532 | -51.53 | 15.53 |
| | | | kontrol negatif | 7.17 | 6.017 | .952 | -14.31 | 28.64 |
| | | | ekstrak bayam 1ml | -21.50 | 7.123 | .135 | -47.61 | 4.61 |
| | | | ekstrak bayam 2ml | -9.17 | 10.830 | .996 | -53.47 | 35.13 |
| | ekstrak bayam 2ml | kontrol positif | -8.83 | 12.574 | .999 | -54.54 | 36.87 | |
| | | kontrol negatif | 16.33 | 10.905 | .861 | -27.86 | 60.53 | |
| | | ekstrak bayam 1ml | -12.33 | 11,552 | .978 | -56.40 | 31.74 | |
| | | ekstrak bayam 1.5ml | 9.17 | 10.830 | .996 | -35.13 | 53.47 | |

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.