

1. VITAMINS
2. CELL MEMBRANE
3. ACETAMINOPHEN

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

KIC
TKD 23/01
Ohi
P

TESIS

PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI VITAMIN C DAN VITAMIN E TERHADAP HAMBATAN KERUSAKAN MEMBRAN SEL AKIBAT PEMBERIAN PARASETAMOL DOSIS TINGGI

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



OLEH :
AQSA SJUHADA OKI
NIM. 099813032 M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2001**

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI
VITAMIN C DAN VITAMIN E TERHADAP
HAMBATAN KERUSAKAN MEMBRAN SEL AKIBAT
PEMBERIAN PARASETAMOL DOSIS TINGGI**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

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

Oleh :

AQSA SJUHADA OKI
NIM. 099813032-M



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2001**

LEMBAR PENGESAHAN

TESIS INI TELAH DISETUJUI PADA TANGGAL 25 JUNI 2001

Disetujui oleh

Pembimbing I



Dr. Sunarko Setyawan, dr., MS
NIP. 131949832

Pembimbing II



Prof. Martin Setiabudi, dr., PhD
NIP. 130246650

Mengetahui

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Program Pascasarjana Universitas Airlangga



Soetjipto, dr., MS., PhD
NIP. 130687606

HALAMAN PENETAPAN PANITIA PENGUJI

Telah diuji pada tanggal 30 April 2001

Panitia Penguji Tesis

Ketua : H. Choesnan Effendy, dr., PFK

Anggota : 1. Dr. Sunarko Setyawan, dr., MS

2. Prof. Martin Setiabudi, dr., PhD

3. Muhammad Cholil Munif, dr., PFK

4. Harlina Soetjipto, dr., MS

RINGKASAN

Vitamin E dan vitamin C telah dikenal sebagai antioksidan yang potensial. Kombinasi kedua vitamin tersebut sangat sinergis dalam memecah radikal bebas baik di kompartemen lemak maupun cair. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian kombinasi vitamin E dan vitamin C terhadap penurunan kerusakan membran sel akibat radikal yang dihasilkan oleh pemberian parasetamol dosis tinggi.

Sampel penelitian adalah tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) sejumlah 18 ekor yang terbagi dalam tiga kelompok. Rancangan yang dipergunakan adalah rancangan acak lengkap – *post test only design*. Kelompok pertama mendapatkan kombinasi vitamin E (0,8 mg/100 gr BB/hari selama enam minggu) dan vitamin C (2 mg/100 gr BB/hari selama enam minggu) serta parasetamol satu kali dengan dosis tinggi (400 mg/kg BB); kelompok kedua hanya mendapatkan satu kali parasetamol dosis tinggi (400 mg/kg BB) sedangkan kelompok ketiga mendapatkan plasebo sebagai kontrol. 2 x 24 jam setelah dilakukan pemberian parasetamol dilakukan pengambilan sampel darah untuk diperiksa kadar MDA-nya.

Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan cara Satoh, yaitu dari kurva standar hubungan antara besarnya absorpsi gelombang dengan lima konsentrasi larutan standar yang menjangkau kadar dalam serum yang diperiksa. Rerata kadar MDA plasma tikus pada kelompok yang diberi parasetamol dan vitamin E dan C, kelompok yang diberi parasetamol saja, serta kelompok kontrol berturut-turut adalah $0,345 \pm 0,067$, $0,473 \pm 0,036$, $0,346 \pm 0,049$ mMol/L.

Dengan metode statistik Anava-1 dengan taraf signifikan 5% didapatkan bahwa antara kelompok pertama dan kedua terdapat perbedaan kadar MDA yang bermakna.

($p=0,001$), antara kelompok pertama dan ketiga tidak terdapat perbedaan ($p=0,991$), serta antara kelompok kedua dan ketiga terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,001$).

Berdasarkan penelitian tersebut bahwa pemberian kombinasi vitamin E dan vitamin C dapat menurunkan kerusakan membran sel akibat pemberian parasetamol dosis tinggi.

ABSTRACT

*The influence of administration of combination of vitamin E and vitamin C on the decrease of cell membrane damage after high dose paracetamol administration have been studied. The subjects were 18 Wistar rats (*Rattus norvegicus*) that were divided into three experimental groups. The experimental design was the post test only design. The subjects in first experimental group were supplemented with the adequate dose of combination of vitamin E and vitamin C, also high dose of paracetamol to promote lipid peroxidation and significantly decrease the antioxidant potential of animals; the subjects in second experimental group were only administered with high dose of paracetamol; and the subjects in third experimental group were given placebo as a control group.*

The results were analyzed using Anova-1 test with the level of significance of 5% to find the difference of MDA level between groups. There was the significance difference of MDA level between the first group and the second group, and also between the second group and the third group ($p=0,001$). There were no differences between the first and the third group.

This study indicated that the administration of combination of vitamin E and vitamin C could reduce the cell membrane damage after high dose paracetamol administration.

Key words: *vitamin C, vitamin E, malondialdehyde, cell membrane damage, paracetamol.*

UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmanirrahim,

Pertama-tama saya panjatkan puji dan sujud syukur ke hadirat Allah SWT yang telah memberikan limpahan rahmat, taufik dan hidayah-Nya sehingga akhirnya tesis ini dapat terselesaikan.

Rasa hormat dan terima kasih yang setinggi-tingginya kami sampaikan pada Pemerintah Republik Indonesia c.q. Menteri Pendidikan Nasional yang memberikan dana BPPS (Bantuan Pendidikan Pasca Sarjana) sehingga sangat meringankan kami dalam pendanaan selama pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Dengan selesainya tesis ini perkenankan pula kami mengucapkan terima kasih yang tidak terhingga kepada:

Soetjipto, dr., MS., PhD., selaku Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang membantu saya dan memberi dorongan dalam menyelesaikan tesis ini.

Prof. Dr. Juliati Hood Assegaf, dr., MS., Sp.PA, FIAC, selaku mantan Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang menerima kami sebagai mahasiswa Pascasarjana Universitas Airlangga dengan bantuan dana BPPS.

Dr. Sunarko Setyawan, dr., MS., selaku pembimbing pertama yang dengan penuh kesabaran dan pengertian telah memberikan bimbingan dan arahan yang sangat efektif dan bermanfaat dalam penyelesaian tesis ini.

Prof. Martin Setiabudi, dr., PhD., selaku pembimbing kedua sekaligus Kepala Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah

memberikan bimbingan, dorongan dan filosofinya selama masa pendidikan di Program Pascasarjana.

Prof. H. Soedarto, dr., DTM&H, PhD., Rektor Universitas Airlangga yang telah berkenan memberikan kesempatan kepada kami untuk mengikuti pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Prof. Dr. H. Muhammad Amin, dr., Sp.P., Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang telah memberi ijin kepada kami untuk mengikuti pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

H. Choesnan Effendy, dr., PFK selaku Ketua Minat Ilmu Faal Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar di Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang selalu memberikan kemudahan dan motivasi selama pendidikan saya di Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Dr. Boedihardjo, drg., MSc., Sp.Perio., mantan Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang telah mengijinkan saya untuk melanjutkan pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Dr. Mohamad Rubianto, drg., MS., Sp.Perio., Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang telah banyak memberikan bantuan dan kemudahan selama masa studi saya di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Mahayatra Soendoro, drg., Kepala Laboratorium Biologi Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang memberi kesempatan, nasihat dan dorongan saya sebelum dan selama masa pendidikan saya di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Harlina Soetjipto, dr., MS., yang telah banyak memberikan masukan dan informasi tambahan guna penyempurnaan tesis ini.

Seluruh staf pengajar mata kuliah Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga: Hadi Soedarjanto, drg., PFK; J. Koentjoro Ongkowidjojo, Phys.; Jenny Soenariani, drg., MS.; Anis Irmawati, drg dan Yuliati, drg., yang selalu memberikan dorongan, motivasi, pengertian yang mendalam serta bantuan moral-material yang sangat membantu kelancaran studi kami di Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Seluruh staf pengajar dan karyawan Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga atas segala bantuan moral dan material yang tidak bisa diungkapkan betapa berartinya untuk kelancaran studi kami.

Seluruh staf pengajar dan karyawan Laboratorium Biologi Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga atas bantuan dan kerjasamanya yang sangat mendukung proses belajar kami Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Muhammad Cholil Munif, dr., PFK., sebagai konsultan metodologi dan statistik yang sangat membantu proses analisa statistik tesis ini.

Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr., Kepala Laboratorium Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga beserta stafnya yang telah memberikan ijin penelitian dan bantuan pemeriksaan laboratorium.

Teman sejawat yang telah banyak membantu dalam penelitian dan penulisan tesis ini yang tidak dapat kami sebutkan satu-persatu.

Mama dan Papa (alm) tercinta yang dengan susah payah dan tetesan keringat telah membesarkan dan mendidik kami, serta dengan doa dan air matanya selalu memohon ke

haridat Allah SWT agar kami diberi kekuatan dan kemudahan selama pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Mama dan Papa mertua yang dengan penuh perhatian telah memberikan bantuan moral dan material serta motivasi dan semangat kami dalam menempuh pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Adik-adik dan saudara-saudara ipar yang dengan penuh perhatian memberikan dorongan selama masa pendidikan kami di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Istri tercinta Asri Budianti Sjuhada, dr., serta anak-anak Nadine Salsabila Sjuhada dan Rayhan Razaqi Sjuhada yang dengan penuh kesetiaan mendampingi dalam suka dan duka serta selalu memberikan inspirasi dan motivasi sebelum dan selama saya menempuh pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Akhirnya semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan dan penyelesaian tesis ini yang belum sempat kami sebutkan satu-persatu, kami ucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya; semoga budi baiknya dibalas Allah SWT dengan pahala.

Semoga amal ibadah mereka semua selalu mendapat tempat di sisi Allah SWT.

Surabaya, April 2001

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN KULIT	
HALAMAN JUDUL	
HALAMAN PENGESAHAN	i
HALAMAN PENETAPAN PENGUJI	ii
RINGKASAN	iii
ABSTRACT	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
DAFTAR ISI	x
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan umum	3
1.3.2 Tujuan khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Pengertian Radikal Bebas, Oksidan dan Antioksidan	5

2.2	Malondialdehid (MDA) dan <i>Superoxide Dismutase</i> (SOD)...	16
2.3	Manfaat Vitamin C dan Vitamin E Sebagai Antioksidan	17
2.4	Metabolisme Parasetamol di Hepar Serta Terjadinya Produk Oksidan	25
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	28
3.1	Kerangka Konseptual Penelitian	28
3.2	Hipotesis Penelitian	29
BAB 4	METODE PENELITIAN	30
4.1	Rancangan Penelitian	30
4.2	Populasi, Sampel, Teknik Pengambilan Sampel dan Besar Sampel	31
4.2.1	Populasi	31
4.2.2	Sampel	31
4.2.3	Teknik Pengambilan Sampel	31
4.2.4	Besar Sampel	31
4.3	Variabel Penelitian	32
4.3.1	Variabel bebas	32
4.3.2	Variabel tergantung	33
4.3.3	Variabel kendali	33
4.4	Definisi Operasional	
4.4.1	MDA (Malondialdehid)	33
4.4.2	Vitamin E	33
4.4.3	Vitamin C	33

4.4.4	Plasebo	33
4.5	Bahan Penelitian	34
4.6	Instrumen Penelitian	34
4.7	Lokasi dan Waktu Penelitian	35
4.8	Prosedur Pengumpulan Data	35
4.9	Cara Analisis Data	36
BAB 5	HASIL DAN ANALISA DATA	37
5.1	Pengaruh Pemberian Vitamin E dan C Terhadap Kadar MDA Plasma Tikus	37
5.2	Pengaruh Variabel Moderator (Umur dan Berat Badan) Terhadap Kadar MDA Plasma Tikus	40
BAB 6	PEMBAHASAN	44
6.1	Pembahasan Metode	44
6.2	Pembahasan Hasil Penelitian	47
BAB 7	KESIMPULAN DAN SARAN	50
7.1	Kesimpulan	51
7.2	Saran	51
	DAFTAR PUSTAKA	53

DAFTAR LAMPIRAN**Lampiran 1**

Prosedur Pemeriksaan Malondialdehid (MDA) 58

Lampiran 2

Hasil Statistik Lengkap 59

Lampiran 3

Foto-Foto 72

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 : Peningkatan kadar vitamin C dan vitamin E akibat pemberian vitamin C pada bayi-bayi dengan kadar vitamin E rendah.	21
Tabel 2.2 : Peningkatan kadar vitamin E dan penurunan kadar TBA akibat pemberian vitamin C pada hewan dengan kadar vitamin E dan vitamin C rendah.	22
Tabel 5.1. : Hasil uji normalitas data kadar MDA plasma menurut Kolmogorov-Smirnov test	36
Tabel 5.2: Perbedaan kadar MDA pada tiap kelompok perlakuan	38
Tabel 5.3: Hasil uji normalitas data umur dan berat badan tikus menurut Kolmogorov-Smirnov test	40
Tabel 5.4. Hasil uji LSD data umur dan berat badan tikus antar-kelompok. ...	41
Tabel 5.5. Hasil uji Anakova data umur dan berat tikus terhadap kadar MDA plasma tikus	42

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 : Jalur reduksi molekul oksigen oleh SOD, glutation peroksidase dan katalase	17
Gambar 2.2. : Kemampuan vitamin C dalam membantu mempertahankan kadar vitamin E setelah diberi stres oksidatif ...	23
Gambar 2.3. : Mekanisme vitamin C dalam membantu mempertahankan kadar vitamin E setelah diberi stres oksidatif	24
Gambar 5.1.: Rerata MDA menurut kelompok perlakuan	37
Gambar 5.2.: Perubahan kadar MDA plasma tikus pada ketiga kelompok	38
Gambar 5.3.: Rerata berat badan dan umur tikus menurut kelompok perlakuan	39

BAB I PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang

Manfaat vitamin C sebagai antioksidan yang kuat telah banyak dikenal. Vitamin C dapat memutus rantai radikal bebas (*chain breaking antioxidant*) dalam kompartemen air (McCall, 1999). Sifat vitamin C yang begitu mudah berubah menjadi dehidroksi asam askorbat secara reversibel membuat zat ini terlibat dalam berbagai reaksi oksidasi-reduksi dalam jaringan.

Vitamin E (α -tokoferol) adalah antioksidan yang larut dalam lemak sehingga bekerja pada kompartemen lemak. Antioksidan ini merupakan garda depan pertahanan dalam melawan peroksidasi asam lemak tak jenuh ganda, yang merupakan komponen utama fosfolipid membran seluler dan subseluler. Konsentrasi vitamin E cukup tinggi pada membran-membran plasma, mitokondria dan retikulum endoplasma karena vitamin E mempunyai afinitas terhadap membran-membran tersebut. Peran vitamin E sebagai antioksidan adalah memutus berbagai reaksi rantai radikal bebas dengan memindahkan hidrogen fenolat kepada radikal bebas peroksil dari asam lemak tak jenuh ganda yang mengalami peroksidasi.

Vitamin C tidak hanya berperan aktif memecah radikal bebas yang berada dalam kompartemen air tetapi secara sinergia mendukung kinerja vitamin E dalam memecah radikal bebas pada kompartemen lemak, sehingga manfaat pemberian kombinasi vitamin C dan vitamin E sebagai antioksidan telah banyak dikenal (May, 1999; Niki, 1991).

Parasetamol (asetaminofen) adalah analgesik yang cukup banyak digunakan. Beberapa merek dagang obat analgesik yang secara generik berisi kandungan parasetamol dijual bebas sehingga masyarakat bisa mendapatkannya tanpa resep dan pengawasan dokter. Pemberian parasetamol dosis tinggi dan di luar toleransi tubuh akan mengakibatkan kerusakan pada hepar (Melmon et al, 1992). Pada pemberian parasetamol dosis tinggi terjadi peningkatan produk radikal dan mengakibatkan peningkatan kadar radikal bebas yang akan merusak protein dan mengakibatkan kerusakan pada membran sel yang pada akhirnya akan mengakibatkan kematian sel hepar (Ioannides et al, 1983; Jamil et al, 1999; Jones, 1998; Kourounakis, 1997). Peningkatan produk radikal tersebut akan banyak menghabiskan antioksidan alami tubuh yang berfungsi untuk menetralsirnya sehingga diperlukan pemberian suplemen antioksidan untuk mempertahankan keseimbangan antara oksidan dan antioksidan dalam tubuh sehingga kerusakan sel akibat oksidasi dapat dicegah (Murray et al, 1997).

Setiap terjadi kerusakan jaringan yang disebabkan oleh senyawa oksigen reaktif dapat merangsang aktivitas enzim antioksidan alami tubuh, yaitu *superoxide dismutase* (SOD), katalase dan glutathion peroksidase. Bila senyawa oksigen reaktif (radikal hidroksil) bereaksi dengan komponen asam lemak membran sel akan terjadi peroksidasi lemak yang menyebabkan kerusakan membran sel (Halliwell & Gutteridge, 1999). Proses tersebut merupakan suatu reaksi berantai yang hasil akhirnya berupa terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa toksik terhadap sel yang dapat merusak membran sel. Salah satu hasil senyawa toksik yang

banyak dipakai sebagai indikator terjadinya peroksidasi membran sel adalah malondialdehida (MDA).

Penelitian mengenai pengaruh pemberian kombinasi vitamin C dan vitamin E terhadap kemampuannya menghambat radikal bebas yang diakibatkan oleh overdosis parasetamol dirasa belum dilakukan, dengan demikian diperlukan suatu penelitian untuk membuktikan sejauh mana pemberian kombinasi vitamin C dan vitamin E dapat meredam radikal yang dihasilkan akibat pemberian parasetamol dosis tinggi. Penelitian ini bermaksud mengungkap hal tersebut dengan melihat *superoxide dismutase* (SOD) sebagai indikator aktivitas enzim antioksidan alami tubuh serta malondialdehida (MDA) sebagai indikator terjadinya peroksidasi membran sel.

1.2 Rumusan Masalah

Sebagai rumusan masalah penelitian adalah apakah pemberian vitamin C dan vitamin E dapat menghambat kerusakan membran sel akibat pemberian parasetamol dosis tinggi?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Tujuan umum penelitian adalah untuk membuktikan bahwa kombinasi vitamin C dan vitamin E dapat menghambat kerusakan membran sel akibat pemberian parasetamol dosis tinggi.

1.3.2 Tujuan khusus:

Tujuan khusus penelitian adalah membuktikan bahwa kombinasi vitamin C dan vitamin E dapat menghambat peningkatan kadar malondialdehid akibat pemberian parasetamol dosis tinggi.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan memberikan kontribusi pada pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi dan pemanfaatannya dalam dunia kedokteran, antara lain:

1. Bila penelitian ini berhasil mengungkap adanya efektifitas pemberian kombinasi vitamin C dan vitamin E sebagai antioksidan yang berfungsi menghambat radikal yang dihasilkan akibat overdosis parasetamol, maka diharapkan akan memberikan wawasan yang bermanfaat dalam penggunaan antioksidan.
2. Bila penelitian ini berhasil mengungkap manfaat pemberian vitamin C dan vitamin E sebagai antioksidan yang berfungsi meredam radikal yang dihasilkan akibat overdosis parasetamol maka kombinasi kedua vitamin tersebut dapat dipertimbangkan secara ilmiah sebagai salah satu alternatif dalam mencegah terjadinya kerusakan jaringan akibat overdosis parasetamol.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pengertian Radikal Bebas, Oksidan dan Antioksidan

Oksigen senantiasa diasosiasikan dengan sumber kehidupan dan komponen utama dalam respirasi. Banyak spesies bergantung kelangsungan hidupnya dari keberadaan oksigen, untuk mengoksidasi zat makanan, pelepasan energi, respirasi dan masih banyak lagi. Di samping banyak manfaat tersebut, ternyata oksigen mempunyai potensi untuk menciptakan suatu kondisi yang tidak menguntungkan tubuh makhluk hidup yaitu terjadinya senyawa oksidan dan radikal bebas (Diplock, 1994; Erenel, 1993).

Pengertian radikal bebas adalah atom atau molekul yang memiliki elektron yang tidak berpasangan (*unpaired electron*). Atom-atom yang bisa membentuk radikal bebas berupa atom halogen Cl atau Br, atom logam alkali seperti Na atau K, atau ion logam transisi seperti Cu^{2+} atau Ce^{3+} . Beberapa molekul lain juga berpotensi menjadi radikal bebas antara lain ClO, Cl_2 atau O_2 (Thomas, 1995).

Bila molekul air (H_2O) terpapar suatu energi yang besar atau terkena radiasi maka molekul tersebut akan mengalami pembelahan hemolitik, berupa:



Ikatan atom oksigen dengan hidrogen adalah ikatan kovalen, suatu ikatan kimia yang terjadi karena sepasang elektron yang diikat bersama oleh dua atom. Atom H dapat dianggap sebagai radikal karena memiliki elektron yang tidak berpasangan.

Selain pembelahan hemolitik molekul air dapat juga mengalami pembelahan heterolitik, berupa



Proses dari reaksi tersebut adalah ionisasi karena dari reaksi tersebut yang dihasilkan bukanlah radikal melainkan ion-ion. Berbeda dengan pembelahan hemolitik, proses ionisasi ini tidak membutuhkan energi yang besar (Suryohudoyo, 1991; Thomas, 1995).

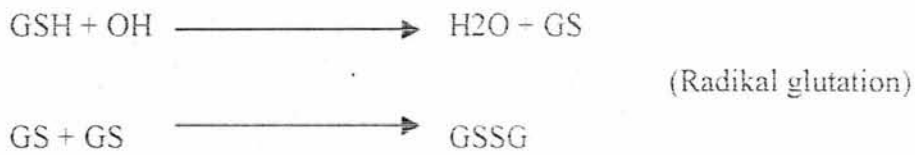
Suatu elektron yang berpasangan adalah lebih stabil daripada yang tidak berpasangan, oleh karena itu radikal bebas sangat reaktif. Radikal bebas bisa berikatan dengan sesama radikal bebas dengan mempertemukan kedua elektron yang tidak berpasangan yang dimiliki keduanya, selanjutnya membentuk ikatan kovalen; misalnya elektron yang tidak berpasangan dalam suatu senyawa disimbolkan dengan

• maka reaksi tersebut adalah:



Suatu radikal bebas juga mungkin mendonorkan elektron bebasnya kepada molekul lain atau mengambil elektron molekul lain untuk mendapatkan pasangan bagi molekul bebasnya. Apabila suatu radikal bebas berikatan dengan senyawa yang bukan radikal bebas dengan beberapa cara tersebut maka reaksi tersebut akan mengubah senyawa yang bukan radikal tersebut menjadi radikal baru. Proses

tersebut dikenal dengan reaksi berantai (*chain reaction*). Reaksi berantai tersebut berlangsung berulang kali, menghasilkan radikal baru tetapi bisa diredam (*quenched*) sampai radikal bebas tersebut bertemu dengan radikal bebas yang lain (Halliwell, 1991; Thomas, 1995). Misalnya reaksi radikal hidroksil dengan glutation (GSH):

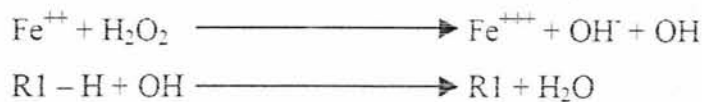


Reaksi tersebut akan berhenti karena dua radikal glutation (GS) akan bereaksi membentuk glutation teroksidasi.

Menurut Suryohudoyo (1991) dan Thomas (1995) reaksi berantai radikal bebas dapat dijabarkan menjadi tiga tahap yaitu:

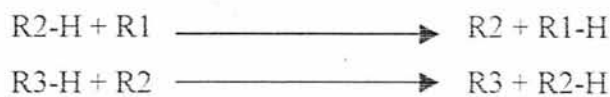
a. Tahap inisiasi

Tahap dimulainya reaksi berantai, misalnya:



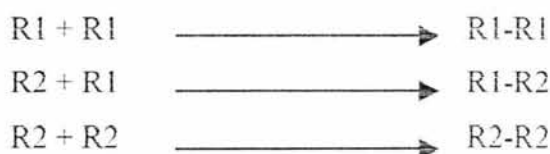
b. Tahap propagasi

Tahap pengoksidasian senyawa, misalnya:



c. Tahap terminasi

Tahap berakhirnya reaksi berantai, misalnya:



Dari penjelasan di atas dapat dilihat bahwa radikal bebas mempunyai dua sifat penting, yaitu:

- a. Bersifat reaktif, karena mempunyai kecenderungan menarik elektron
- b. Mempunyai kemampuan mengubah suatu molekul menjadi suatu radikal.

Pengertian oksidan adalah senyawa penerima elektron, senyawa yang dapat menarik suatu elektron. Misalnya ion ferri yang dapat menarik elektron dengan reaksi:



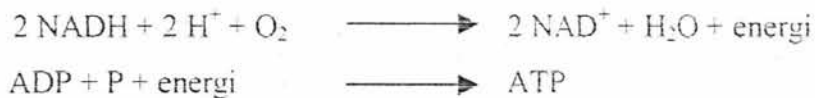
Sifat oksidan tersebut mirip dengan kemampuan radikal bebas untuk menarik elektron. Tidak semua oksidan adalah radikal bebas tetapi radikal bebas adalah oksidan. Radikal bebas lebih berbahaya daripada oksidan yang bukan radikal.

Pada keadaan fisiologis oksidan berfungsi sebagai perangkat kekebalan tubuh dalam melawan mikroorganisme patogen. Untuk menghadapi mikroorganisme patogen tersebut sel-sel radang (*inflammatory cell*) seperti granulosit, monosit dan makrofag dapat menghasilkan oksidan-oksidan seperti H_2O_2 (hidrogen peroksida), O_2^{-} (anion superoksida), $\cdot\text{OH}$ (radikal hidroksil) dan lain-lain. Di samping senyawa-senyawa tersebut berfungsi menghancurkan organisme-organisme patogen, senyawa-senyawa tersebut juga berpotensi merusak jaringan tubuh, apalagi bila radang yang terjadi cukup berat sehingga kerusakan jaringan tidak dapat dihindari (Widjaja, 1997)

Oksidan yang didapat pada berbagai kondisi patologis sebagian besar justru berasal dari proses-proses biologis alami serta melibatkan senyawa oksigen reaktif. Penyebab kondisi patologis tersebut dikenal dengan stres oksidatif. Senyawa oksigen reaktif yang ditemukan akibat stres oksidatif tersebut bisa berbentuk radikal

hidroksil (OH), radikal peroksil (OOH) dan ion superoksida (O_2^-), bentuk non-radikal yang mungkin dihasilkan adalah singlet oksigen, hidrogen peroksida (H_2O_2) serta ion hipoklorit (ClO^-) (Halliwell, 1987; Suryohudoyo, 1991).

Stres oksidatif dapat terjadi karena proses pengalihan elektron secara fisiologis yang tidak berlangsung sempurna sehingga menghasilkan senyawa-senyawa oksigen yang berbahaya dan berpotensi merusak sel, misalnya reaksi fosforilasi oksidatif di mitokondria, yaitu:



Reduksi O_2 menjadi H_2O secara sederhana dapat dijelaskan sebagai berikut:



Bila pengalihan 4 elektron di atas berlangsung kurang sempurna dapat menghasilkan stres oksidatif.

Terjadinya stres oksidatif ditandai dengan peningkatan produksi O_2^- dan H_2O_2 . Selain gangguan transfer elektron fisiologis kondisi ini disebabkan karena:

- Peningkatan aktivitas fagosit; fagosit menghasilkan O_2^- dan H_2O_2 yang berfungsi mematikan bakteri, bila kadar O_2^- dan H_2O_2 tersebut berlebihan akan mengakibatkan stres oksidatif. Pencemaran zat racun seperti aloksan, paraquat dan adriamisin
- Pencemaran zat racun seperti aloksan, paraquat dan adriamisin

Secara struktur kimia radikal bebas dapat dibedakan menjadi beberapa tipe, yaitu:

- a. Radikal bebas dengan pusat atom hidrogen, misalnya atom H dengan satu proton dan satu elektron.
- b. Radikal bebas dengan pusat atom karbon, misalnya radikal triklorometil dan karbon triklorida (CCl_3).
- c. Radikal bebas dengan pusat atom sulfur, misalnya radikal *thiyl*.
- d. Radikal bebas dengan pusat atom nitrogen, radikal fenildiazin dan $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}=\text{N}$.
- e. Radikal bebas dengan pusat oksigen, terdiri dari dua macam, yaitu:
 - 1 . Anorganik, misalnya superoksida (O_2) dan radikal hidroksil (HO)
 - 2 . Organik, misalnya radikal alkoksi (LO) dan radikal peroksi (LO_2)
- f. Ion logam transisi, misalnya Cu^+

2.1.1. Aktivitas oksidan

Aktivitas oksidan dalam hal merusak sel terdapat pada tiga target utama, yaitu:

1. DNA

Banyak studi menunjukkan pada pemeriksaan *in vivo* di purin dan pirimidin terdapat 10.000 perubahan DNA setiap sel setiap hari. Hal ini menimbulkan potensi terjadinya mutasi dan kanker (Ames, 1991). Oksidan adalah satu dari empat penyebab signifikan terjadinya kerusakan DNA, selain metilasi, deaminasi dan depurinasi. Dari keempat penyebab tersebut oksidan diperkirakan paling berpotensi merusak struktur DNA (Diplock, 1994).

2. Protein

Aktivitas oksidan dalam merusak protein ada dua, yaitu:

- a. Mengubah struktur enzim sehingga tidak berfungsi.

Perubahan pada struktur enzim pada umumnya akan menimbulkan efek karena perubahan pada satu jenis asam amino pada *active site* enzim akan mempengaruhi ikatan enzim dengan *active site* tersebut sehingga menimbulkan efek katalitik yang cukup nyata.

- b. Mengubah struktur protein sehingga terjadi perubahan struktur sel.

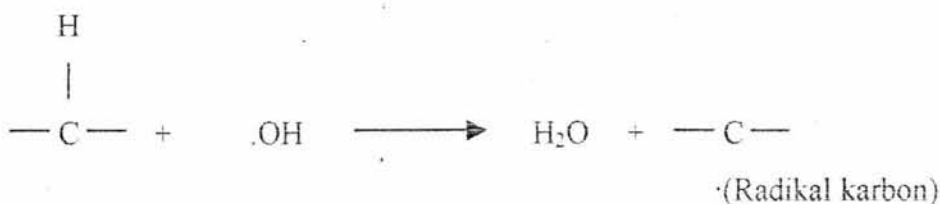
Perubahan struktur protein pada membran sel dapat mengganggu integritas membran secara keseluruhan sehingga dikhawatirkan bisa menurunkan kestabilan perbedaan ion di membran.

3. Asam lemak tak jenuh.

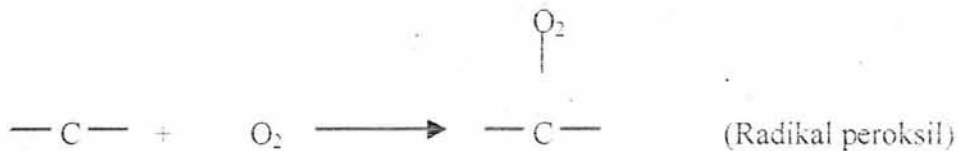
Dalam hal merusak asam lemak tak jenuh oleh radikal bebas bisa ditinjau dalam dua aspek, yaitu:

- a. Peroksidasi asam lemak tak jenuh dalam lokasinya di membran.
- b. Oksidasi asam lemak tak jenuh ganda (*polyunsaturated fatty acid*) dalam lipoprotein.

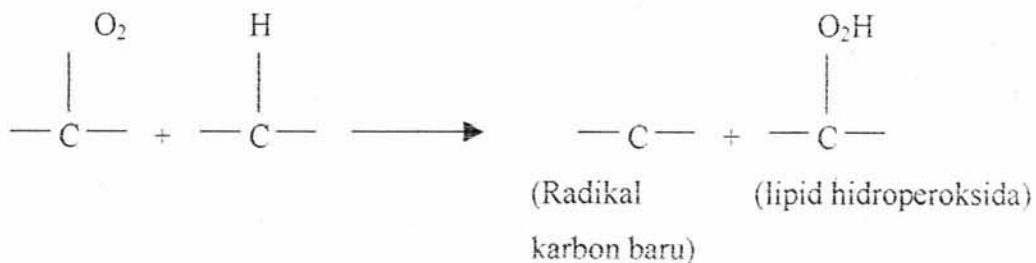
Kedua proses tersebut menghasilkan peroksidasi lipid, misalnya aktivitas radikal hidroksil ($\cdot\text{OH}$) yang digambarkan sebagai berikut:



Radikal karbon (carbon centered radical) terbentuk karena atom hidrogen yang telah dipindahkan hanya mempunyai satu elektron, radikal ini akan bereaksi dengan oksigen untuk membentuk radikal peroksil (COO.)



Radikal peroksil yang terbentuk akan menyerang rantai-rantai asam lemak yang berdekatan sehingga akan terbentuk lipid hidroperoksida (COOH) dan radikal karbon yang baru.



Dengan terbentuknya radikal karbon yang baru maka akan terjadi reaksi berantai yang berjalan terus (Widjaja, 1997)

2.1.2. Antioksidan

Penggunaan anti oksidan dibagi menjadi tiga, yaitu:

1. Penggunaan antioksidan yang secara alamiah dihasilkan tubuh, misalnya vitamin E (α -tokoferol), glutathion dan superoksida dismutase (SOD).
2. Penggunaan antioksidan sintetik, misalnya probukol atau bahan-bahan yang menekan radikal bebas Fe.



3. Obat-obatan yang dikembangkan untuk melindungi kerusakan jaringan yang kemungkinan mempunyai efek sebagai antioksidan, misalnya penghambat *angiotensin converting enzyme (ACE inhibitor)* captopril yang diduga berfungsi tambahan sebagai antioksidan *in vivo*. (McCall, 1999; Halliwell, 1991)

Antioksidan yang ideal mempunyai beberapa syarat, antara lain:

1. Berada pada kadar yang memadai (adekuat) dalam tubuh, sehingga kestabilan kadar antioksidan dan prooksidan dapat terjaga.
2. Dapat bereaksi dengan berbagai macam radikal bebas (*versatile*).
3. Dapat disimpan dengan baik dalam tubuh sehingga dapat dipergunakan pada saat dibutuhkan. Dalam hal ini ukuran adalah penting, antioksidan dengan ukuran partikel kecil lebih baik daripada partikel besar karena lebih mudah menembus berbagai membran.
4. Tersedia dalam bentuk zat yang bisa dikonsumsi secara diet. Bila salah satu jenis antioksidan tidak bisa diproduksi oleh tubuh (misalnya vitamin C) maka zat tersebut harus tersedia dalam bentuk makanan dan tetap stabil sehingga dapat berfungsi efektif setelah dilakukan proses pencernaan.
5. Mempunyai kemampuan regenerasi setelah melakukan netralisasi terhadap radikal bebas sehingga kadarnya tidak cepat berkurang untuk menetralkan radikal bebas lain.
6. Dapat direabsorpsi di ginjal sehingga tidak terbuang melalui urin dan kadarnya dalam tubuh tetap tinggi.

7. Tidak bersifat toksik baik sebelum maupun sesudah bereaksi dengan radikal bebas (Rose & Bode, 1993).

Macam-macam antioksidan yang sering dipergunakan sebagai upaya untuk meredam efek negatif dari radikal bebas adalah:

1. Antioksidan sintetik

Contoh:

- *Butylated hydroxyanisole*
- *Butylated hydroxytoluene*

2. Antioksidan buatan

Contoh:

- Vitamin E
- Vitamin C
- Vitamin A

Menurut cara kerjanya antioksidan dibagi menjadi tiga golongan, yaitu:

1. *True antioxidants*

Antioksidan ini bekerja menghambat reaksi oksidasi dengan cara bereaksi dengan dengan radikal bebas sehingga dapat menghentikan rantai radikal yang terjadi atau memblok reaksi berantai sehingga periode induksi antioksidan dapat diperpanjang.

Contoh:

- *Butylated hydroxytoluene*
- Vitamin E

2. *Reducing agent*

Antioksidan jenis ini mempunyai potensial yang lebih rendah daripada bahan aktif atau bahan obatnya. Senyawa ini juga dapat bereaksi dengan radikal bebas dan efektif terhadap oksidator.

Contoh:

- Vitamin C^d

3. Antioksidan sinergis

Antioksidan jenis ini mempunyai efek antioksidan yang kecil tetapi dapat menambah efek antioksidan yang lain dengan jalan bereaksi dengan ion logam berat yang merupakan katalisator reaksi antioksidan.

Contoh:

- Asam sitrat

- Asam asetat dan garamnya

2.2 Malondialdehida (MDA) dan *Superoxide Dismutase* (SOD)

Malondialdehid (MDA) adalah suatu senyawa aldehid endogen yang terdapat di dalam darah, membran sel, sperma dan lain-lain. Di samping sebagai senyawa endogen aldehid adalah hasil peroksidasi asam lemak tak jenuh oleh radikal bebas. Aldehid yang merupakan hasil peroksidasi asam lemak tak jenuh oleh radikal bebas tersebut bersifat toksik. Hasil peroksidasi asam lemak tak jenuh oleh radikal bebas antara lain MDA, 9-hidroksi-nonenal, etana, pentana dan lain-lain.

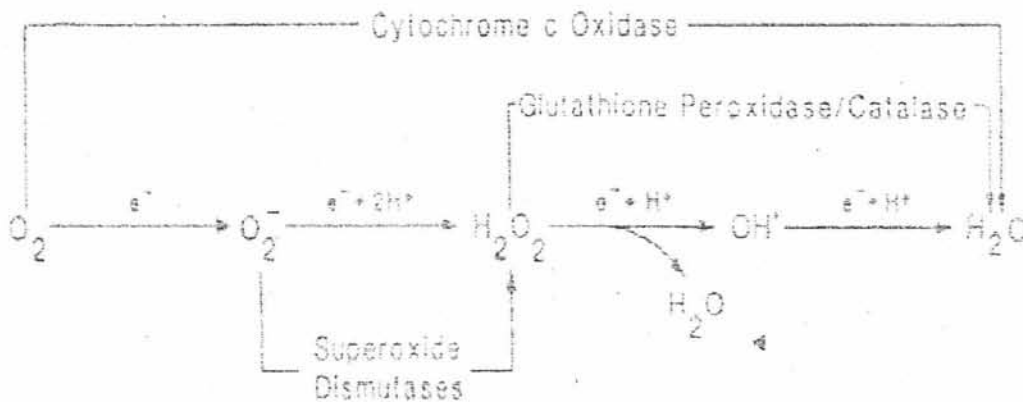
Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan analisis kuantitatif metode spektrofotometrik (Suryohudoyo, 1993).

Superoxide dismutase (SOD) adalah suatu enzim yang dihasilkan di mitokondria dan berfungsi sebagai antioksidan. SOD bekerja dengan cara memecah senyawa oksigen reaktif (Halliwell & Gutteridge, 1999). Bersama-sama dengan glutathion peroksidase dan katalase SOD berperan penting dalam jalur reduksi molekul oksigen sehingga akumulasi senyawa oksigen reaktif tidak terbentuk.

Aktivitas SOD dipengaruhi oleh beberapa hal, antara lain:

1. Usia
2. Peningkatan radikal O_2^- dan H_2O_2
3. Kadar logam
4. Kadar imunomodulator limfokin.

(Dreosti, 1991)



Gambar 2.1 : Jalur reduksi molekul oksigen oleh SOD, glutathion peroksidase dan katalase.
 Sumber : Dreosti IE, 1991. Trace elements, micronutrients, and free radicals. New Jersey: Humana Press.

2.3 Manfaat Vitamin C dan Vitamin E Sebagai Antioksidan

Vitamin C (asam askorbat / *ascorbic acid*) adalah vitamin larut air yang mudah dioksidasi dalam bentuk larutan terutama bila kena panas. Vitamin ini pertama kali diisolasi pada tahun 1928 oleh Szent Gyorgyi dari jaringan adrenal, jeruk dan kol dengan nama *hexuronic acid*. Empat tahun kemudian Gyorgyi dan Glenn menyatakan bahwa *hexuronic acid* sebagai vitamin C.

Dengan tingkat absorpsi rata-rata 90% vitamin C termasuk vitamin yang mudah diabsorpsi. Penyimpanan vitamin ini di kelenjar adrenal, ginjal, hati dan limpa.

Kebutuhan vitamin C minimum tiap hari adalah sekitar 10 mg untuk bayi sampai dengan 1 tahun, 15 mg untuk anak berusia 2-6 tahun, 30 mg untuk anak berusia 7 tahun sampai sebelum remaja dan 20 mg untuk orang dewasa.

Sumber vitamin C utama dari makanan adalah buah-buahan dan sayur-sayuran segar seperti jeruk, nenas, nangka, daun sayuran mentah, tomat, arbei, kool, cabai hijau, brokoli dan blewa. Karena sifatnya yang mudah hancur oleh oksidasi terutama dengan adanya panas maka vitamin ini akan segera hancur dengan pemasakan. Penyajian terbaik vitamin ini adalah pada bahan-bahan yang tidak dimasak atau dimasak secara cepat dengan sedikit air dan disajikan segera (Kartawiguna, 1998).

Selain berperan pada berbagai reaksi enzimatik dan berfungsi sebagai antioksidan untuk menginaktivkan oksigen yang sangat reaktif, vitamin C juga dapat memberikan satu elektronnya sehingga berfungsi sebagai antioksidan yang kuat dalam kompartemen cair. Vitamin C sangat efektif untuk meredam radikal hidroksil atau radikal peroksil.

Dengan berat molekul 176, vitamin C cukup sulit menembus membran sel sehingga pergerakan antara kompartemen tubuh lambat. Transpor melalui membran sel dibantu oleh mekanisme difusi fasilitasi sehingga dengan bantuan suatu carrier vitamin C dapat memasuki sel sesuai dengan gradien elektrokimia. Mekanisme lain pada transpor membran sel adalah transpor aktif yang memungkinkan perpindahan zat yang melawan gradien elektrokimia (Rose & Bode, 1993).

Vitamin E merupakan salah satu vitamin yang larut lemak dimana senyawa paling efektif adalah dalam bentuk α - tokoferol. Selain berfungsi penting dalam proses metabolisme asam nukleat, protein, asam lemak dan lipid, vitamin E bekerja pada metabolisme antara proses oksidasi-reduksi dan sebagai penangkap radikal, penghambat pembentukan peroksida pada membran sel. Vitamin E juga

diperlukan tubuh untuk mempertahankan integritas membran sel atau membran organel. Dalam hal ini vitamin E sangat stabil pada membran sel.

Vitamin E sebagai antioksidan selain melindungi membran sel dari kerusakan akibat radiasi juga dapat memperbaiki kerusakan membran pada batas-batas tertentu (Erenel & Erbas, 1993).

2.3.1. Peran vitamin C dan vitamin E

Manfaat vitamin C sebagai antioksidan yang kuat telah banyak dikenal. Vitamin C dapat memutus rantai radikal bebas (chain breaking antioxidant) (McCall, 1999). Sifat vitamin C yang begitu mudah berubah menjadi dehidroksi asam askorbat secara reversibel membuat zat ini terlibat dalam berbagai reaksi oksidasi-reduksi dalam jaringan. Potensi vitamin C sebagai antioksidan telah dibuktikan oleh Kunert & Tappel dengan menyuntikkan karbon tetraklorida pada kelompok marmut yang mempunyai kadar vitamin C rendah dan tinggi. Pada kelompok marmut yang berkadar vitamin C rendah menghasilkan pentana dan etana yang tinggi dan cukup signifikan. Pentana dan etana adalah hidrokarbon yang dihasilkan karena adanya peroksidasi dari asam lemak tak jenuh ganda omega-3 dan omega-6, sehingga peningkatan kadar pentana dan etana tersebut sering dipergunakan sebagai indikator adanya peroksidasi *lipid in vivo*. Pada kelompok marmut yang telah dilakukan pretreatment dengan vitamin C menampakkan hasil penurunan pentana dan etana yang bermakna. Fenomena ini juga terjadi pada

pretreatment dengan vitamin E dan glutathion (GSH), sehingga dapat dinyatakan bahwa vitamin C juga berfungsi sebagai antioksidan (Chen, 1989).

Walaupun hanya larut dalam air tetapi vitamin C tidak hanya berperan aktif memecah radikal bebas yang berada dalam air tetapi bersama dengan vitamin E dapat secara sinergis memecah radikal bebas dalam kompartemen lemak (May, 1999; Niki, 1991). Sinergisnya kedua vitamin ini dalam berperan sebagai pemecah radikal (*radical scavenger*) terjadi pada beberapa kondisi,

1. Pada kondisi dengan kadar vitamin E yang rendah penambahan vitamin C dapat menjaga kadar vitamin E sehingga tetap tinggi.
2. Pada kondisi dengan kadar vitamin E yang adekuat penambahan vitamin C dalam dosis besar justru akan menurunkan potensi antioksidan, karena kadar vitamin E justru cepat berkurang sehingga kebutuhan vitamin E akan meningkat dengan penambahan vitamin C.

Tabel di bawah ini menunjukkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Chen (1989) pada bayi-bayi dengan kadar vitamin E rendah yang diberi tambahan vitamin C selama satu minggu. Hasilnya adalah peningkatan kadar vitamin E dan vitamin C yang cukup signifikan.

Tabel 2.1 : Peningkatan kadar vitamin C dan vitamin E akibat pemberian vitamin C pada bayi-bayi dengan kadar vitamin E rendah.

Sumber : Chen LH, 1989. Interaction of vitamin E and ascorbic acid (Review). *In Vivo* 3:199-210.

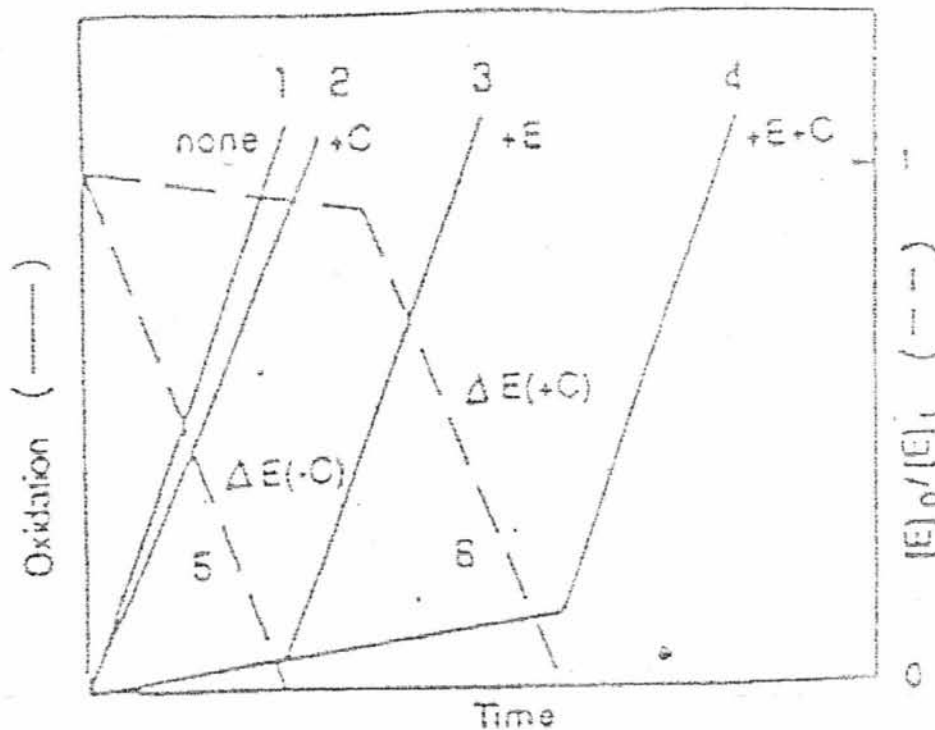
Group	Vitamin C plasma (mg/100 ml)			Vitamin E plasma (mg/100 ml)		
	Sebelum	Sesudah	Harga P	Sebelum	Sesudah	Harga P
Ditambah vit.C	0,39±0,11	0,94±0,14	P<0,002	0,15±0,03	0,21±0,03	P<0,050
Tidak ditambah	0,28±0,05	0,25±0,04	NS	0,27±0,09	0,35±0,07	NS

Penelitian pada marmut yang telah dilakukan Chen (1989) dengan penambahan vitamin C dengan dosis 2 mg/100g berat badan per hari pada hewan dengan kadar vitamin E dan C yang rendah dapat terbukti meningkatkan kadar vitamin E dalam darah. Kadar asam tiobarbiturat (TBA) yang merefleksikan peroksidasi lemak di hati juga menurun setelah penambahan vitamin C. Hasil penelitian tersebut dapat dilihat pada tabel di bawah ini:

Tabel 2.2 : Peningkatan kadar vitamin E dan penurunan kadar TBA akibat pemberian vitamin C pada hewan dengan kadar vitamin E dan vitamin C rendah.

Sumber : Chen LH, 1989. Interaction of vitamin E and ascorbic acid (Review). *In Vivo* 3:199-210.

Group	Pemberian		Vitamin E Plasma	TBA Liver
	Vitamin E	Vitamin C		
AI	0	0	68,5±19,7	237,4±22,0
AII	0,2	0	130,1±7,2	143,5±7,6
AIII	0,4	0	243,4±9,6	111,7±8,6
BI	0	2	105,5±5,9	150,0±10,1
BII	0,2	2	189,9±8,9	103,0±9,7
BIII	0,4	2	319±15,8	63,5±4,8



Gambar 2.2 : Kemampuan vitamin C dalam membantu mempertahankan kadar vitamin E setelah diberi stres oksidatif.

Sumber : Niki E, 1991. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *Am.SocClinNutr* 54: 1119S-24S.

Grafik di atas diambil dari penelitian Niki (1991) yang menggambarkan betapa vitamin C dapat membantu mempertahankan kadar vitamin E sebagai anti oksidan. Grafik tersebut adalah hasil penelitian tingkat oksidasi yang terjadi terhadap waktu setelah diberi stres oksidatif pada beberapa kondisi

Garis 1 menggambarkan dalam kondisi tanpa antioksidan

Garis 2 menggambarkan kondisi setelah diberi vitamin C

Garis 3 menggambarkan kondisi setelah diberi vitamin E

Garis 4 menggambarkan kondisi setelah diberi vitamin C dan vitamin E

Garis 5 menggambarkan konsentrasi vitamin E tanpa penambahan vitamin C

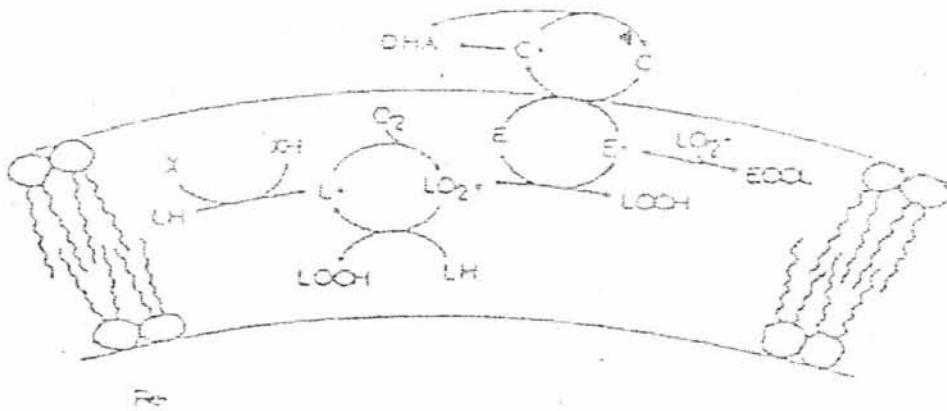
Garis 6 menggambarkan konsentrasi vitamin E dengan penambahan vitamin C

Pemberian makanan dasar yang bebas vitamin C dan vitamin E selama 8 bulan pada hewan akan menghasilkan perubahan biokimia berupa karakteristik kekurangan vitamin E, yaitu:

1. Peningkatan asam tiobarbiturat (TBA) yang menggambarkan adanya peroksidasi lipid di hati.
2. Penurunan kadar glutathion (GSH) yang menggambarkan berkurangnya salah satu antioksidan alami yang penting di tubuh
3. Peningkatan *glutamic-oxaloacetic transaminase*



Dari banyak penelitian *in vivo* di atas dapat diketahui bahwa selain secara sinergis bersama vitamin E memecah radikal bebas, vitamin C berperan penting dalam menjaga dan mempertahankan kadar vitamin E dalam jaringan serta mencegah penurunan kadar vitamin E setelah proses pemecahan radikal bebas berlangsung. Hal ini dapat dijelaskan sebagai berikut:



Gambar 2. 3 : Mekanisme vitamin C dalam membantu mempertahankan kadar vitamin E setelah diberi stres oksidatif.

Sumber : Niki F, 1991. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *Am.SocClinNutr* 54: 1119S-24S.

Keterangan gambar:

1. Bila di membran sel ada serangan radikal bebas (X), lipid (LH) memberikan ion H pada radikal bebas sehingga menjadi radikal lipid L• dan radikal bebas menjadi XH.
2. L• segera bereaksi dengan O₂ untuk membentuk *lipid peroxyl radical* (LO₂•).

3. Vitamin E (E) berfungsi memecah *lipid peroxy radical* ($LO_2\bullet$) menjadi LOOH dengan menghasilkan radikal baru yang dinamakan radikal tokoferoksil ($E\bullet$).
4. Vitamin C (C) berperan mengubah radikal tokoferoksil ($E\bullet$) menjadi vitamin kembali dengan menghasilkan *ascorbyl radical* ($C\bullet$).
5. *Ascorbyl radical* ($C\bullet$) akan menghasilkan *dehydroascorbic acid* (DHA) dimana keduanya akan direduksi secara enzimatis kembali menjadi vitamin C (May, 1999; Niki, 1991).

2.4 Metabolisme Parasetamol di Hepar Serta Terjadinya Produk Oksidan

Parasetamol (asetaminofen) adalah analgesik yang cukup banyak digunakan. Beberapa merek dagang obat analgesik yang secara generik berisi kandungan parasetamol dijual bebas sehingga masyarakat bisa mendapatkannya tanpa resep dan pengawasan dokter. Pemberian parasetamol dosis tinggi akan mengakibatkan kerusakan pada hepar (Melmon et al, 1992; Julia, 1988).

Pemberian parasetamol dalam dosis terapi akan didetoksikasi oleh konjugasi parasetamol dengan glucuronic acid dan sulfat, sedangkan radikal bebas yang dihasilkan akan diredam oleh glutathion. Metabolisme parasetamol dilakukan di hepar oleh mirosom halus pada membran lipofilik retikulum endoplasma. Pada proses oksidasi-reduksi tersebut terdapat dua enzim mikrosomal yang memegang peranan

penting, yaitu flavoprotein dan sitokrom P-450. Akhir proses tersebut menghasilkan produk oksidan (Bessems et al, 1998).

Bila pemberian parasetamol dilakukan dalam dosis tinggi maka sulfat dan glutathion akan cepat berkurang karena banyak terpakai untuk meredam produk radikal dan mengakibatkan peningkatan kadar radikal bebas yang pada akhirnya akan mengakibatkan kerusakan jaringan hepar (Ioannides et al, 1983; Jamil et al, 1999; Jones, 1998; Kourounakis, 1997).

Sitokrom p-450 yang bertanggung jawab memetabolisme parasetamol adalah CYP2E1. Pada hewan coba yang CYP2E1-nya telah dihilangkan sitokrom tidak lagi sensitif terhadap parasetamol (Halliwell and Gutteridge, 1999). Dengan menggunakan NADPH dan molekul oksiden, metabolisme parasetamol oleh sitokrom P-450 menghasilkan suatu *reactive intermediete* yang disebut *N-acetyl-p-benzoquinone imine* (NAPQI) atau disebut juga *quinoneimine* (Jones, 1998; Kourounakis et al, 1997; Timbrell, 1991). Radikal *quinoneimine* sangat reaktif berpotensi merusak protein. Antoksidan alami yang berfungsi meredam radikal *quinoneimine* adalah glutathion.

Pada kondisi overdosis terhadap parasetamol radikal *quinoneimine* yang dihasilkan sangat tinggi sehingga persediaan glutathion untuk meredam radikal tersebut akan cepat habis sehingga radikal *quinoneimine* dengan cepat akan merusak protein, termasuk Ca^{2+} -ATPase di retikulum endoplasma, sistem pengeluaran Ca^{2+} di membran sel dan protein di mitokondria. Hal-hal tersebut akan mengakibatkan "kebocoran" membran sel terhadap ion Ca^{2+} dan tingginya kadar Ca^{2+} dalam sitoplasma. Gangguan keseimbangan ion tersebut akan mengakibatkan kerusakan sel

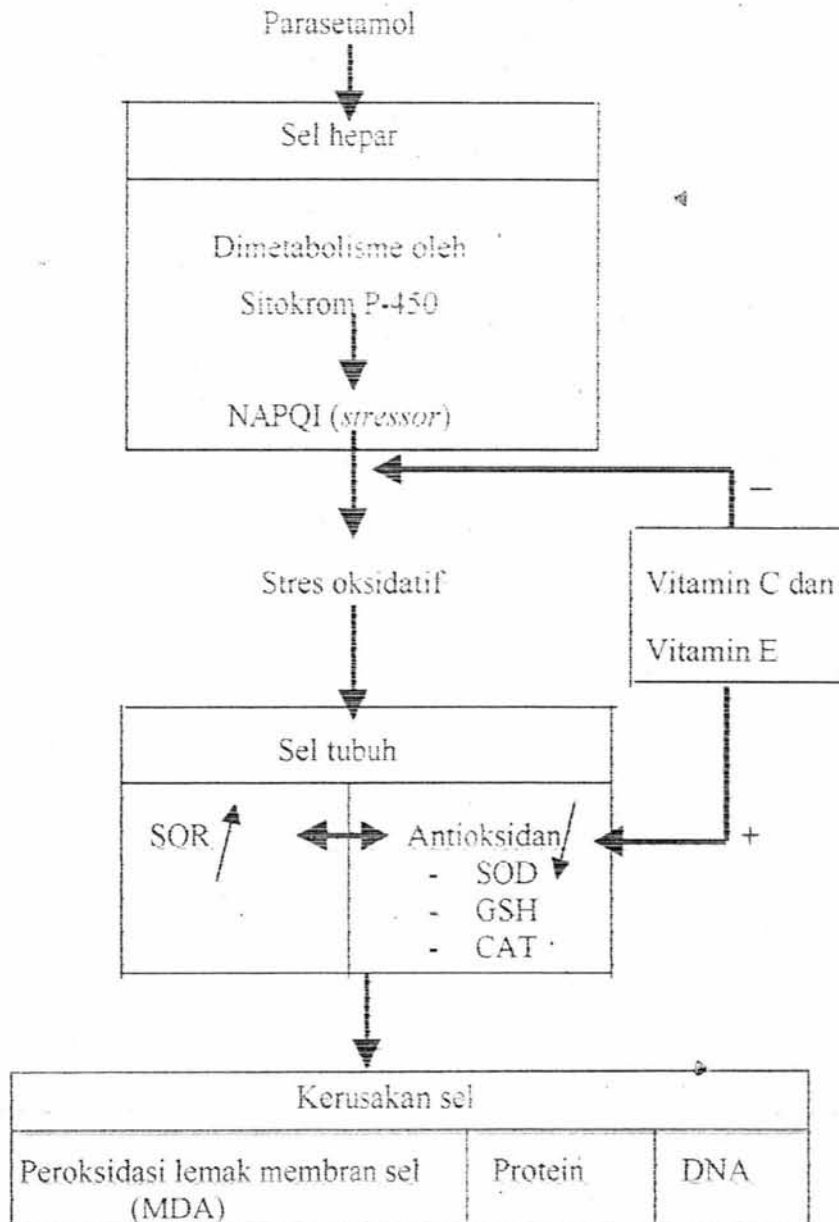
dan bila terus berlanjut akan mengakibatkan kematian sel (Halliwell and Gutteridge, 1999; Timbrell, 1991).

Peningkatan kadar Ca^{2+} dalam sitoplasma akan mengaktifkan produksi NO^* yang berpotensi sebagai oksidan bagi jaringan lain. Pada penderita yang mengalami kerusakan hepar akibat overdosis parasetamol juga ditemukan kadar besi dan tembaga yang cukup tinggi, dimana pemecahan kedua logam tersebut dapat memicu terjadinya radikal bebas dalam tubuh, mekanisme inilah yang disebut reaksi radikal bebas sekunder oleh parasetamol. Jadi kerusakan jaringan akibat oksidasi oleh parasetamol tidak hanya disebabkan oleh satu macam mekanisme di hepar saja melainkan juga reaksi radikal bebas sekunder di seluruh tubuh. (Halliwell & Gutteridge, 1999).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian



Keterangan:

- GSH: Glutation peroksidase
- CAT: Katalase
- SOD: Superoksida dismutase
- SOR: Senyawa oksigen reaktif
- NAPQI: *N-acetyl-p-benzoquinone imine*

3.2 Hipotesis

Hipotesis penelitian adalah:

Pemberian vitamin C dan vitamin E dapat menghambat kadar malondialdehid (MDA) setelah pemberian parasetamol dosis tinggi.

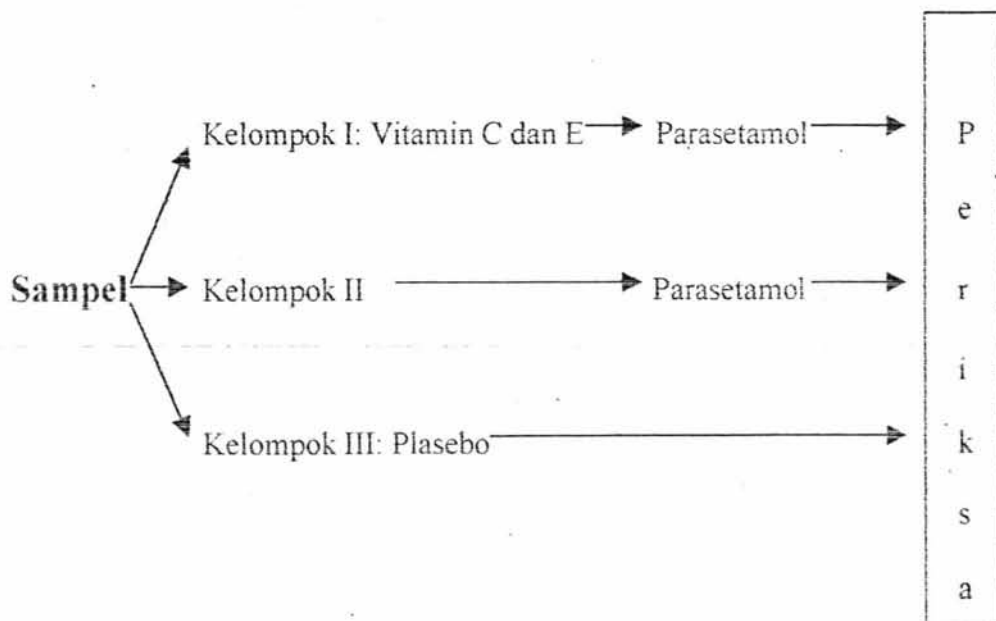
BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini dirancang untuk memenuhi tujuan penelitian yang hendak mengungkapkan pengaruh pemberian kombinasi vitamin C dan vitamin E terhadap kadar malondialdehid dan *superoxide dismutase* akibat pemberian parasetamol dosis tinggi berdasarkan teori radikal bebas.

Kadar malondialdehid dipakai sebagai indikator besarnya proses perusakan membran sel akibat peroksidasi lemak pada membran sel oleh senyawa oksigen reaktif (SOR) yang diakibatkan oleh konsumsi parasetamol dosis tinggi. Rancangan penelitian yang dipergunakan adalah *post test only design* (Tjokronegoro & Sudarsono, 1985).



4.2. Populasi, Sampel, Teknik Pengambilan Sampel dan Besar Sampel

4.2.1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) dewasa jantan yang telah berumur 50 – 60 hari dengan berat badan 100-200 gram.

4.2.2. Sampel

Penelitian ini membagi sampel dalam tiga kelompok, yaitu:

1. Kelompok kombinasi vitamin C dan E

Dilakukan pemberian vitamin C dan E serta parasetamol dosis tinggi.

2. Kelompok parasetamol

Dilakukan pemberian aqua dan parasetamol dosis tinggi.

3. Kelompok plasebo / kontrol

Hanya dilakukan pemberian aqua.

3.2.3. Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dan pembagian kelompok dilakukan secara random dengan cara *random cluster sampling* (Tjokronegoro & Sudarsono, 1985).

3.2.4. Besar Sampel

Adapun besar sampel minimal ditentukan dengan rumus Higgin & Klinbaum (1985) sebagai berikut:

$$n = \frac{1}{1-f} \times \frac{2(Z\alpha + Z\beta)^2 \cdot Sc^2}{(Xc - Xt)^2}$$



Keterangan:

n = Besar sampel

X_t = Nipura kelompok eksperimen

X_c = Nipura kelompok kontrol

S_c = Simpang baku kelompok kontrol

f = Simpang baku kelompok kontrol

$Z_\alpha = 1,96$ ($\alpha = 0,05$)

$Z_\beta = 1,28$ ($\beta = 0,10$)

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Chen (1989) diperoleh data sebagai berikut:

$X_c = 237,4$

$X_t = 63,5$

$S_c = 22$

Dari hasil perhitungan ditemukan bahwa n adalah 0,336. Karena jumlah n yang terlalu kecil maka harus dibulatkan menjadi 6 sebagai batas minimal n dalam statistika inferensial. Dengan kelompok sebanyak 3 kelompok maka jumlah sampel seluruhnya adalah 18 hewan coba.

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas adalah:

- vitamin E
- vitamin C

- parasetamol

4.3.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung adalah malondialdehid (MDA)

4.3.3 Variabel kendali

Variabel kendali adalah jenis kelamin dan umur hewan coba, suhu kandang, diet, cara pengambilan dan penyimpanan sediaan darah, cara preparasi unit analisis, cara pemeriksaan unit analisis (Smith & Mangkoewidjojo, 1988).

4.4. Definisi Operasional

4.4.1. MDA (Malondialdehid)

Hasil kadar malondialdehid yang didapatkan dari pengukuran cara Satoh, yaitu dari kurva standar hubungan antara besarnya absorpsi gelombang dengan lima konsentrasi larutan standar yang menjangkau kadar dalam serum yang diperiksa dalam satuan mMol/L.

4.4.2. Vitamin E

Vitamin E dalam bentuk *alpha-tocopherol* serbuk pro-analisa dari perusahaan farmasi PT Interbat.

4.4.3. Vitamin C

Vitamin C atau asam askorbat dalam bentuk serbuk pro-analisa dari perusahaan farmasi PT Interbat.

4.4.4. Plasebo

Plasebo dalam penelitian ini adalah aquades.

4.5. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Tikus wistar (*Rattus novergicus*)
2. Vitamin C (asam askorbat) pro analisa
3. Vitamin E (*alpha-tocopherol*) pro analisa
4. Aqua
5. Heparin
6. *Carboxy methyl cellulose*
7. Parasetamol (pro analisa)
8. Perangkat pemeriksaan MDA
 - Larutan TCA 5 %
 - Larutan asam sulfat 0,05 M
 - Larutan natrium sulfat 2 M
 - Larutan TBA 0,2 % (dalam natrium sulfat 2 M)

4.6. Instrumen Penelitian

Instrumen yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Labu ukur
2. Pipet volume
3. Pipet mikro
4. Spektrofotometer Shimadzu UV-VIS 360
5. Tabung plasma

6. Disposable spuit 5 cc
7. Sonde set
8. Gelas ukur
9. Mortar set

4.7. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Pemeliharaan, perlakuan dan pengambilan sampel pada hewan coba dilakukan pada tempat yang sama. Kegiatan penelitian ini berlangsung mulai bulan September 2000 sampai dengan November 2000.

Pemeliharaan hewan coba, pengambilan sampel serta pemeriksaan malondialdehid (MDA) dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Analisis data dan statistik dilakukan di Pusat Komputer Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

4.8. Prosedur Pengumpulan Data

Prosedur pengumpulan data penelitian ini adalah:

1. Pemberian vitamin C dan E dilakukan pada kelompok I selama 6 (enam) minggu dengan dosis masing-masing 2 mg/100 gr BB/hari dan 0,8 mg/100 gr BB/hari secara per-oral dengan sonde. Hewan-hewan coba pada kelompok II dan III mendapatkan aqua lewat sonde (Chen, 1989).

2. Pada minggu ke-6 dilakukan pemberian parasetamol sebagai stressor satu kali dengan dosis hepatotoksik sebesar 400 mg/kgBB pada kelompok I dan II (Liu et al, 1993; Ray et al, 1996).
3. 2 x 24 jam setelah dilakukan pemberian parasetamol dilakukan pengambilan sampel darah melalui jantung sebanyak 5 ml dan langsung dilakukan pemeriksaan laboratoris (Smith & Mangkoewidjojo, 1988).

4.9. Cara Analisis Data

Data yang diperoleh ditampilkan dalam bentuk nilai rata-rata \pm simpang baku dan dianalisis dengan uji *Anava-1*, untuk melihat perbedaan di antara masing-masing kelompok. Pengaruh variabel moderator diuji dengan *Anakova*.

BAB 5

HASIL DAN ANALISA DATA

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan didapatkan hasil data *post test*. Data hasil penelitian ini disajikan dalam bentuk rangkuman hasil analisis data secara statistik dalam bentuk tabel untuk tiap variabel, baik variabel inti maupun variabel moderator dalam penelitian ini.

Hasil perhitungan statistik yang didapat dalam penelitian ini diolah dengan program bantu statistik SPSS melalui pusat komputer Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

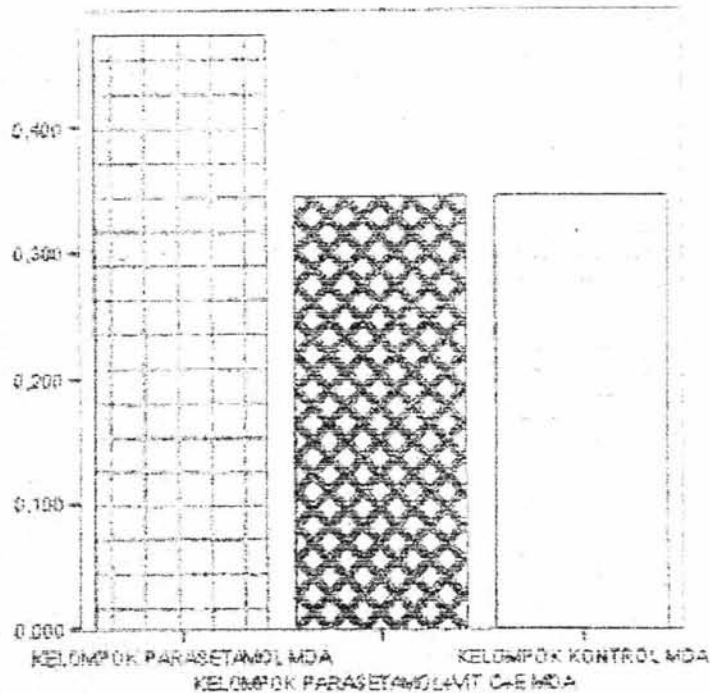
5.1. Pengaruh Pemberian Vitamin E dan C Terhadap Kadar MDA Plasma Tikus

Hasil uji normalitas data kadar MDA plasma menurut Kolmogorov-Smirnov test menunjukkan distribusi normal (lihat lampiran statistik halaman 61).

Tabel 5.1. Hasil uji normalitas data kadar MDA plasma menurut Kolmogorov-Smirnov test

Kelompok	Harga Z	Keterangan distribusi
Parasetamol	0,469	$p > 0,05$ (Distribusi normal)
Parasetamol dan vitamin E dan C	0,640	$p > 0,05$ (Distribusi normal)
Kontrol	0,417	$p > 0,05$ (Distribusi normal)

Rerata kadar MDA plasma tikus pada kelompok yang diberi parasetamol saja, kelompok yang diberi parasetamol dan vitamin E dan C serta kelompok kontrol berturut-turut adalah $0,473 \pm 0,036$, $0,345 \pm 0,067$, $0,346 \pm 0,049$ mMol/L.



Gambar 5.1. Rerata MDA menurut kelompok perlakuan

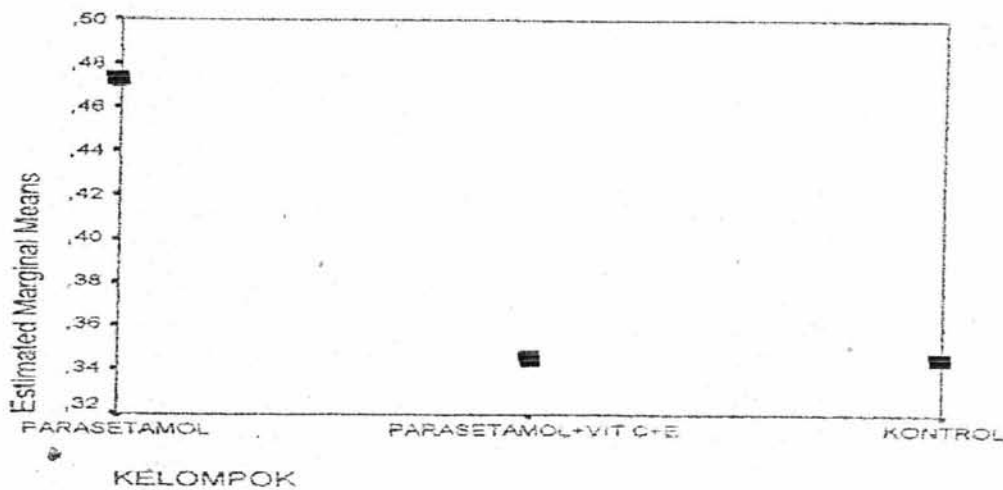
Keterangan gambar: Perbedaan kadar MDA pada ketiga kelompok perlakuan

Dengan Anova $p < 0,05$ didapatkan bahwa kelompok yang mendapatkan parasetamol saja berbeda secara bermakna bila dibandingkan dengan kelompok yang mendapatkan parasetamol dan vitamin E dan C serta kelompok kontrol; sedangkan antara kelompok yang mendapatkan parasetamol dan vitamin E dan C dengan

kelompok kontral tidak ditemukan perbedaan. Hasil statistik selengkapnya bisa dilihat di lampiran statistik halaman 60.

Tabel 5.2. Perbedaan kadar MDA pada tiap kelompok perlakuan

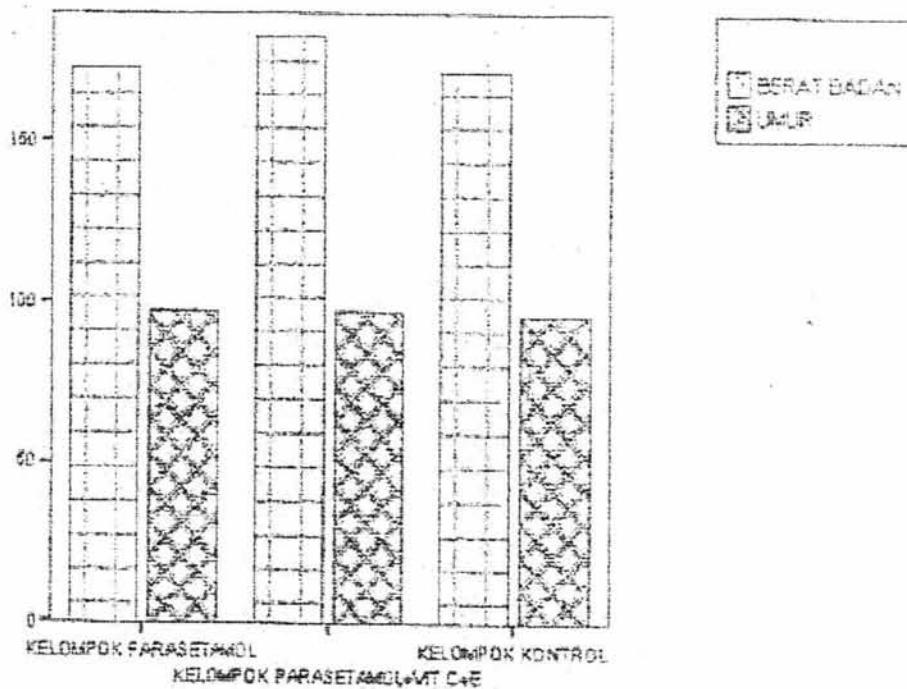
Kelompok	Kelompok	Keterangan
Parasetamol	Parasetamol dan vitamin E dan C	$P < 0,05$ (Berbeda)
	Kontrol	$P < 0,05$ (Berbeda)
Parasetamol dan vitamin E dan C	Parasetamol	$P < 0,05$ (Berbeda)
	Kontrol	$P > 0,05$ (Tidak berbeda)
Kontrol	Parasetamol	$P < 0,05$ (Berbeda)
	Parasetamol dan vitamin E dan C	$P > 0,05$ (Tidak berbeda)



Gambar 5.2. Perubahan kadar MDA plasma tikus pada ketiga kelompok

5.2. Pengaruh Variabel Moderator (Umur dan Berat Badan Tikus) Terhadap Kadar MDA Plasma Tikus

Rerata umur tikus pada kelompok parasetamol, parasetamol dan vitamin E dan C serta kontrol berturut-turut adalah: 97 , 97 , 96 hari. Sedangkan rerata berat badan tikus pada kelompok parasetamol, parasetamol dan vitamin E dan C serta kontrol berturut-turut adalah: 173 , 183 , 172 gram.



Gambar 5.3. Rerata berat badan dan umur tikus menurut kelompok perlakuan

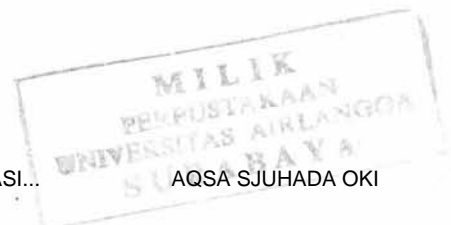
Hasil uji normalitas menurut Kolmogorov-Smirnov Test menunjukkan bahwa harga $p > 0,05$, hal ini berarti distribusi normal.

Tabel 5.3. Hasil uji normalitas data umur dan berat badan tikus menurut Kolmogorov-Smirnov test

Kelompok	Berat Badan	Umur	Keterangan
Parasetamol	$p > 0,05$ $Z = 0,272$	$p > 0,05$ $Z = 0,408$	Distribusi normal
Parasetamol dan Vitamin E dan C	$p > 0,05$ $Z = 0,575$	$p > 0,05$ $Z = 0,449$	Distribusi normal
Kontrol	$p > 0,05$ $Z = 0,517$	$p > 0,05$ $Z = 0,642$	Distribusi normal

Pada test Anova berat badan antar-kelompok dan dalam kelompok didapatkan perbedaan yang bermakna sehingga dilanjutkan dengan pemeriksaan LSD. Test Anova umur antar-kelompok dan dalam kelompok tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna (lihat lampiran statistik halaman 68).

Hasil pemeriksaan LSD menunjukkan perbedaan berat badan yang bermakna antara kelompok parasetamol dengan kelompok parasetamol dan vitamin E dan C, kelompok parasetamol dan vitamin E dan C dengan kelompok kontrol. Antara kelompok kontrol dengan kelompok parasetamol tidak didapatkan perbedaan yang bermakna.



Tabel 5.4. Hasil uji LSD data umur dan berat badan tikus antar-kelompok.

Variabel	Kelompok	Kelompok	Keterangan
Berat badan	Parasetamol	Parasetamol dan vitamin E dan C	$p < 0,05$ (Berbeda)
		Kontrol	$p > 0,05$ (Tidak berbeda)
	Parasetamol dan vitamin E dan C	Parasetamol	$p < 0,05$ (Berbeda)
		Kontrol	$p < 0,05$ (Berbeda)
Umur	Parasetamol	Parasetamol dan vitamin E dan C	$p > 0,05$ (Tidak berbeda)
		Kontrol	$p > 0,05$ (Tidak berbeda)
	Parasetamol dan vitamin E dan C	Parasetamol	$p > 0,05$ (Tidak berbeda)
		Kontrol	$p > 0,05$ (Tidak berbeda)
Kontrol	Parasetamol	$p > 0,05$ (Tidak berbeda)	
	Parasetamol dan vitamin E dan C	$p > 0,05$ (Tidak berbeda)	

Hasil pemeriksaan Anakova menunjukkan bahwa kedua variabel moderator berat badan dan umur tikus tidak berpengaruh pada kadar MDA plasma tikus (lihat lampiran statistik halaman 70).

Tabel 5.5. Hasil uji Anakova data umur dan berat tikus terhadap kadar MDA plasma tikus.

Variabel	Keterangan
Berat badan	$p > 0,05$ (Tidak berpengaruh)
Umur	$p > 0,05$ (Tidak berpengaruh)

BAB 6

PEMBAHASAN

Telah dilakukan penelitian mengenai pengaruh kombinasi vitamin E dan vitamin C terhadap penurunan kerusakan membran sel akibat pemberian parasetamol dosis tinggi.

Pada penelitian ini kadar malondialdehid (MDA) dipakai sebagai indikator kerusakan membran sel akibat aktivasi radikal bebas karena pemberian parasetamol dosis tinggi. Dalam penelitian ini dilakukan pula pemeriksaan terhadap beberapa variabel moderator, yaitu umur dan berat badan, serta pengaruhnya terhadap kadar MDA.

6.1. Pembahasan Metode

Metode penelitian yang dipergunakan adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan acak lengkap – *post test only design*. Pemilihan metode jenis ini dengan pertimbangan sebagai berikut:

1. Variabel bebasnya dapat dikuasai, dikendalikan dan dimanipulasi.
2. Bahwa penelitian eksperimental merupakan salah satu metode penelitian yang tepat untuk menyelidiki hubungan sebab-akibat sesuai dengan permasalahan.
3. Dapat diuji secara statistik.
4. Mudah dilaksanakan.

Penelitian ekperimental laboratoris telah memenuhi syarat yang ditetapkan, yaitu adanya perlakuan (intervensi) kelompok perlakuan, kelompok kontrol, replikasi dan randomisasi (Zainuddin, 1988).

Sampel pada penelitian ini adalah tikus Wistar (*Rattus novergicus*) dewasa jantan yang telah berumur 50-60 hari dengan berat badan 100-200 gram, dengan pertimbangan bahwa hewan jenis ini cukup mudah didapatkan. *Rattus novergicus* juga sangat mudah beradaptasi sesuai dengan lingkungan yang baru serta cukup mudah dimanipulasinya sehingga pengendalian sampel bisa dilaksanakan dengan baik. Tikus-tikus yang dipilih adalah yang sehat serta kandangnya diperhatikan kebersihannya untuk menekan gangguan lingkungan seminimal mungkin sehingga kemungkinan kegagalan sampel (*drop*) bisa dihindari. Dipilihnya kelamin jantan karena tidak adanya perubahan siklus hormonal yang diperkirakan dapat mempengaruhi jalannya penelitian. Pertimbangan terhadap umur dan berat badan juga diperhatikan secara seksama karena pada umur sekitar dua bulan tikus sudah digolongkan dewasa, berat badan menunjukkan status kesehatan hewan coba (Smith & Mangkoewidjojo, 1988).

Pembagian tiga kelompok yang meliputi kelompok yang hanya diberi parasetamol dosis tinggi, kelompok yang diberi vitamin E dan C serta parasetamol dosis tinggi, dan kelompok plasebo dimaksudkan untuk membandingkan adakah perbedaan kadar MDA di antara kelompok-kelompok tersebut.

Pemberian parasetamol dosis tinggi sebesar 400 mg/kg berat badan sesuai dengan penelitian Liu et al (1993) dan Ray el al (1996) dimana pada dosis tersebut hewan akan mengalami hepatotoksik. Pengambilan sampel darah dilakukan 2 x 24

jam setelah dilakukan pemberian parasetamol karena diperkirakan pada saat itu telah terjadi penyebaran radikal sekunder pada jaringan lain sehingga kerusakan yang lebih luas diperkirakan telah terjadi (Liu et al, 1993; Ray et al, 1996)

Teknik sampling yang dipergunakan adalah *random cluster sampling* karena teknik ini memberikan peluang yang sama kepada semua subyek untuk dipilih sebagai sampel, sehingga diharapkan sampel terpilih merupakan refleksi dari populasi induknya atau dengan kata lain dapat mewakili populasi. Dengan demikian hasil penelitian yang diperoleh dapat digeneralisasikan kepada populasi induknya (Zainuddin, 1988).

Sediaan vitamin C dalam bentuk serbuk pro analisa yang dapat dicampur dengan mudah dengan air karena sifat vitamin C yang mudah larut air. Sediaan vitamin E dalam bentuk serbuk alfa tokoferol pro analisa yang perlu mendapat tambahan *carboxy methyl cellulose* agar dapat terdispersi waktu dilarutkan dalam air karena sifat vitamin E yang larut dalam lemak. Pemberian dilakukan lewat sonde agar dosis dapat dikendalikan secara akurat.

Pengambilan sampel darah dilakukan dengan aspirasi langsung pada ventrikel jantung tikus untuk mendapatkan jumlah sampel darah yang cukup memadai untuk pemeriksaan MDA yaitu sekitar 2 cc.

Pengukuran MDA merupakan cara pengukuran aktivitas radikal bebas dan kerusakan membran sel secara tidak langsung karena MDA adalah produk dari radikal bebas, bukan secara langsung. Metode pengukuran MDA pada penelitian ini adalah metode *thiobarbituric acid* (TBA). Prinsip metode ini adalah terbentuknya kromogen yang diukur dengan spektrofotometer (Uchiyama & Mihara, 1978). Hasil

yang didapat dimasukkan dalam kurva baku MDA. Kurva baku tersebut telah diuji mempunyai sensitivitas dan *recovery* yang tinggi sehingga hasil pengukuran MDA yang didapat valid, reliabel dan dapat dipercaya.

6.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa kadar MDA meningkat setelah dilakukan pemberian parasetamol dosis tinggi secara bermakna ($p < 0,05^4$). MDA terbentuk apabila terjadi peroksidasi lemak pada membran sel, dimana peroksidasi lemak itu sendiri adalah reaksi radikal bebas (radikal hidroksi) dengan *polyunsaturated fatty acid* pada membran sel. Diketahui bahwa radikal hidroksi bisa bereaksi dengan protein, rantai DNA dan katekolamin.

Peroksidasi lemak dari membran sel menyebabkan berubahnya fungsi membran sel yaitu peningkatan permeabilitas membran yang pada akhirnya menyebabkan gangguan pada protein sitosol dan yang paling berbahaya adalah terbentuknya radikal peroksi yang dapat memicu rantai radikal bebas. Radikal peroksi tersebut dapat melalui aliran darah dan memulai reaksi peroksidasi pada lokasi yang jauh dari asalnya (Conner & Grisham, 1996).

Radikal bebas hidroksi pada membran sel akan bereaksi dengan *polyunsaturated fatty acid* dan terjadi reaksi rantai yang dikenal dengan sebagai peroksidasi lemak. Hasil akhir dari reaksi rantai ini akan terbentuknya hidroperoksidasi dengan *conjugated dienes*. Hidroperoksidasi tersebut akan menyebabkan dekomposisi beberapa produk aldehid yang bersifat toksik terhadap sel dan berbeda panjang rantainya. Salah satu aldehid utama yang terbentuk adalah *rantai 3-carbon*

malondialdehyde (MDA). Jadi MDA terjadi selama proses autooksidasi berlangsung (Cochrane, 1991).

Peningkatan kadar MDA plasma yang disebabkan oleh pemberian parasetamol dosis tinggi pada penelitian ini dapat dijelaskan sebagai berikut: persediaan sulfat dan glutation yang berfungsi meredam radikal yang dihasilkan oleh parasetamol dosis tinggi (*N-acetyl-p-benzoquinone imine* atau NAPQI atau *quinoneimine*) telah habis sehingga ada kelebihan produk oksidan yang tidak bisa diredam dan sangat berpotensi merusak jaringan hati. Kerusakan jaringan yang terjadi berupa peroksidasi lemak membran sel dan kerusakan protein. Selain itu NAPQI juga merusak Ca^{2+} -ATPase di retikulum endoplasma sehingga sistem pengeluaran dan permeabilitas Ca^{2+} di membran sel terganggu yang dapat mengakibatkan kematian sel. Peningkatan kadar Ca^{2+} dalam sitoplasma akan mengaktifkan produksi NO^{\bullet} yang berpotensi sebagai oksidan bagi jaringan lain. Pada penderita yang mengalami kerusakan hepar akibat overdosis parasetamol juga ditemukan kadar besi dan tembaga yang cukup tinggi, dimana pemecahan kedua logam tersebut dapat memicu terjadinya radikal bebas dalam tubuh, mekanisme inilah yang disebut reaksi radikal bebas sekunder oleh parasetamol. Jadi kerusakan jaringan akibat oksidasi oleh parasetamol tidak hanya disebabkan oleh satu macam mekanisme di hepar saja melainkan juga reaksi radikal bebas sekunder di seluruh tubuh termasuk terjadinya kerusakan pada membran sel lain (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Penelitian ini menunjukkan penurunan kadar MDA secara bermakna yang merupakan indikator penurunan kerusakan membran sel akibat aktivitas radikal bebas

karena mendapatkan parasetamol dosis tinggi yang juga mendapatkan kombinasi vitamin E dan C. Melalui uji anova ($p < 0,05$) didapatkan bahwa kadar MDA kelompok tikus yang mendapatkan parasetamol dan vitamin E dan C berbeda secara bermakna bila dibandingkan dengan kelompok tikus yang hanya mendapatkan parasetamol saja. Hal ini berarti bahwa pemberian kombinasi vitamin E dan C dapat menurunkan kerusakan membran sel akibat aktivitas radikal bebas karena mendapatkan parasetamol dosis tinggi. Untuk meredam efek negatif dari radikal bebas maupun oksidan dapat dipakai senyawa-senyawa yang sifatnya dapat memberikan elektron (donor elektron). Senyawa ini dikenal sebagai antioksidan (Rice-Evans & Diplock, 1993). Dalam penelitian ini vitamin E dan vitamin C berfungsi sebagai antioksidan.

Sinergisme vitamin E dan vitamin C dapat dijelaskan oleh Suryohudoyo (1993) bahwa vitamin E yang berada pada membran sel dapat bereaksi dengan radikal lipid ($L\bullet$) dan radikal peroksi lipid ($LOO\bullet$) sehingga terbentuk radikal tokoferol ($TOC\bullet$). Radikal tokoferol tersebut tidak reaktif karena telah terjadi resonansi dalam molekulnya.

Penambahan vitamin C dapat mengubah radikal tokoferol ($TOC\bullet$) menjadi vitamin E kembali dengan menghasilkan *ascorbyl radical* ($C\bullet$). *Ascorbyl radical* ($C\bullet$) akan menghasilkan *dehydroascorbic acid* (DHA) dimana keduanya akan direduksi secara enzimatis kembali menjadi vitamin C (May, 1999; Niki, 1991). Jadi vitamin C selain bekerja sebagai antioksidan dalam kompartmen cair juga berfungsi

meningkatkan duration of action dari vitamin E sehingga periode induksi antioksidan bisa lebih lama.

Umur dan berat badan tikus dipergunakan sebagai variabel modertor untuk melihat pengaruhnya terhadap kadar MDA, dan ternyata baik umur maupun berat badan tidak berpengaruh terhadap kadar MDA. Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan kadar MDA yang terjadi tidak dipengaruhi oleh kedua variabel moderator tersebut.

Hasil penelitian yang didapat senada dengan hasil yang didapatkan Chen (1989) dimana dengan pemberian kombinasi vitamin E dan C dapat menurunkan kadar MDA marmut. Niki et al (1991) juga menulis bahwa vitamin E dan vitamin C sangat diperlukan guna mempertahankan kadar asam tiobarbiturat (TBA) agar tetap rendah.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat ditarik dari penelitian ini adalah:

1. Pemberian parasetamol dosis tinggi dapat meningkatkan kadar malondialdehida (MDA) yang merupakan indikator kerusakan membran sel akibat aktivitas radikal bebas pada tikus.
2. Pemberian kombinasi vitamin E dan vitamin C dapat menghambat kadar malondialdehida (MDA) yang merupakan indikator kerusakan membran sel akibat aktivitas radikal bebas pada tikus.

7.2. Saran

Saran penelitian ini adalah:

1. Agar bisa didapatkan hasil yang lebih akurat perlu dilakukan pengukuran aktivitas radikal bebas secara langsung, misalnya dengan *electron paramagnetic resonance*.
2. Untuk melihat selektivitas radikal bebas karena pemberian parasetamol dosis tinggi perlu dilakukan pemeriksaan kerusakan membran sel pada fraksi sel hepar, misalnya nukleus, lisosom, peroksisom atau mitokondria.
3. Untuk membandingkan dengan antioksidan jenis lain perlu dilakukan perbandingan efektivitas antioksidan jenis lain dalam meredam radikal bebas karena pemberian parasetamol dosis tinggi.

4. Untuk lebih jelas melihat tahapan kerusakan sel perlu dilakukan pemeriksaan periodik dalam waktu yang lama.
5. Untuk melihat jenis radikal bebas yang mengakibatkan kerusakan membran sel setelah pemberian parasetamol dosis tinggi perlu dilakukan penelitian mengenai jenis radikal bebas yang dihasilkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Bessems JG et al, 1998. Hydrogen atom abstraction of 3,5-disubstituted analogues of paracetamol by horseradish peroxidase and cytochrome P-450. *Xenobiotica* 28(9): 855-75.
- Chen LH, 1989. Interaction of vitamin E and ascorbic acid (Review). *In Vivo* 3:199-210.
- Cochrane CG, 1991. Cellular injury by antioxidants. *Am J Med* 91 (suppl 3C): 3C-23S-30S.
- Conner EM, Grisham MB, 1996. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 12(4): 274-7.
- Diplock AT, 1994. Antioxidants and disease prevention. *Melec.Aspects Med* 15: 293-376.
- Dreosti IE, 1991. Trace elements, micronutrients, and free radicals. 1st ed, New Jersey: Humana Press, 150-156.
- Erenel G, Erbas D, Aricioglu A, 1993. Free radicals and antioxidant systems. *Materia Medica Polona* 1(85): 37-40.
- Halliwell B, 1991. Drug antioxidant effect. A basis for drug selection? *Drugs* 42(4): 569-605.
- Halliwell B, 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The Lancet* 344: 721-24.

- Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, Aruoma OI, 1995. The characterization of antioxidants. *FdChem.Toxic* 33(7): 601-17.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, 1999. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed, New York: Oxford University Press Inc, pp. 573-7.
- Harris ED, 1992. Regulation of antioxidant enzymes. *Faseb* 6: 2675-83.
- Ioannides C et al, 1983. A comparison of the protective effects of N-acetylcystein and S-carboxymethylcysteine against paracetamol-induced hepatotoxicity. *Toxicology* 28(4): 313-21.
- Jamil I et al, 1999. Divergent effects of paracetamol on reactive oxygen intermediate and reactive nitrogen intermediate production by U937 cells. *Int J Mol med* 4(3): 309-12.
- Jones AL, 1998. Mechanism of action and value of N-acetylcystein in the treatment of early and late acetaminophen poisoning: a critical review. *J Toxicol Clin Toxicol* 36(4): 277-85.
- Julia AR. 1988. Perubahan Histologis Sel Hati Tikus Putih Jenis Wistar Akibat Pemberian Parasetamol Dosis Tinggi. Tesis. Fakultas Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Kartawiguna E, 1998. Vitamin yang dapat berfungsi sebagai antioksidan. *Maj. Ilm. Fak. Kedokter. Usakti.* 17(1): 16-26.
- Kourounakis AP, Rekka EA, Kourounakis PN, 1997. Antioxidant activity of guaiazulene and protection against paracetamol hepatotoxicity in rats. *J Pharm Pharmacol* 49(9): 938-42.

- Liu J et al, 1993. Protective effects of oleanolic acid on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 266(3): 1607-13.
- Machlin LS. 1991. *Handbook of Vitamins*. 2nd ed., Reversed and Expanded Marcel Dekker Inc, New York and Basel, 125-50.
- Maxwell SRJ, 1995. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 49(3): 345-361.
- May JM, 1999. Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? *Faseb* 13(9): 995-1006.
- McCall MR, Frei B, 1999. Can antioxidant vitamins maternally reduce oxidative damage in humans? *Free Radic Biol Med*, 26(7-8):1034-53.
- Meister A, 1992. Commentary on the antioxidant effects of ascorbic acid and glutathione. *Biochem Pharmacol* 44(10): 1905-15.
- Melmon KL et al, 1992. *Melmon and Morelli's clinical pharmacology. Basis principles in therapeutics*. 3rd ed, New York: McGraw-Hill, Inc, pp 798-9.
- Motchnik PA, Frei B, Ames BN, 1994. Measurement of antioxidants in human blood plasma. *Methods in Enzymology* 234(23): 269-79.
- Murray RK et al, 1997. *Biokimia Harper (Harper's Biochemistry)*. Edisi 24, Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran ECG, hlm 637-41.
- Niki E, 1991. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *Am Soc Clin Nutr* 54: 1119S-24S.

- Ray SD et al, 1996. Protection of acetaminophen-induced hepatocellular apoptosis and necrosis by cholesteryl hemisuccinate pretreatment. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 279(3): 1470-83.
- Rice-Evans CA, Diplock AT, 1993. Current status of antioxidant therapy. *Free Radical Biology & Medicine* 15: 77-96.
- Rose RC, Bode AM, 1993. Biology of free radical scavengers: An evaluation of ascorbate. *Faseb* 7: 1135-42.
- Sies H, 1986. Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Int Ed Engl* 25: 1058-1071.
- Sies H, Stahl W, Sundquist A, 1990. Antioxidant functions of vitamins. *Annals New York Academy of Sciences*:7-20.
- Smith JB, Mangkoewidjojo S, 1988. Pemeliharaan, pembiakan dan penggunaan hewan percobaan di daerah tropis. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia, pp 3-57.
- Suryohudoyo P, 1993. Oksidan, Antioksidan dan Radikal Bebas. Simposium Oksidan dan Antioksidan, Peranannya Dalam Mencegah Progresivitas Kelainan Pembuluh Darah. Surabaya: Persatuan Ahli Penyakit Dalam Indonesia Cabang Surabaya, pp 37-50.
- Thomas MJ, 1995. The role of free radicals and antioxidants: How do we know that they are working? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35(1&2): 21-39.
- Timbrell JA, 1991. *Principles of Biochemical Toxicology*. 2nd ed, London: Taylor & Francis, pp 225-7.

- Tjokronegoro A, Sudarsono S. 1985. Metodologi Penelitian Bidang Kedokteran. Edisi kedua, Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hal: 123-49.
- Uchiyama M, Mihara M. 1978. Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal.Biochem.* 86, 271-8.
- Van Acker SABE, Koymans LMH, Bast A, 1993. Molecular pharmacology of vitamin E: structural aspect of antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine* 15: 311-28.
- Widjaja S, 1997. Antioksidan: Pertahanan tubuh terhadap efek oksidan dan radikal bebas. *Maj.Ilm.Fak.Kedokter.Usakti* 16(1): 1659-72.
- Zainuddin M. 2000. Metodologi Penelitian. Surabaya: Diktat Kuliah Program Pascasarjana Universitas Airlangga, hal: 61-3.
-

LAMPIRAN I

Prosedur Pemeriksaan Malondialdehida (MDA)

Pemeriksaan ini didasarkan atas kurve standar hubungan antara besarnya absorpsi gelombang dengan konsentrasi MDA dengan lima konsentrasi larutan standar yang menjangkau kadar dalam serum yang diperiksa.

Prosedur pemeriksaan MDA menurut cara Satoh adalah:

1. $\frac{1}{2}$ cc serum ditambah 2,5 ml larutan trikloroasetat 20 mg/dl, dibiarkan selama 10 menit pada suhu kamar.
2. Dilakukan pemusingan 3500 rpm selama 10 menit.
3. Cairan supernatan dibuang sedangkan endapan dicuci sekali dengan larutan H_2SO_4 0,005 M.
4. Ditambahkan 2,5 ml larutan H_2SO_4 0,05 M dan 3 ml TBA 0,2 mg/dl di dalam natrium sulfat 2 M lalu dipanaskan selama 30 menit.
5. Setelah didinginkan dengan air dingin, kromogen yang terbentuk diekstraksi dengan 4 ml n-butyl alkohol dengan kocokan keras.
6. Dilakukan pemusingan 3000 rpm untuk pemurnian.
7. Dilakukan pengukuran besaran absorpsi pada panjang gelombang dengan absorpsi maksimum (530 nm).
8. Penentuan kadar ditentukan dengan bantuan kurva standar.

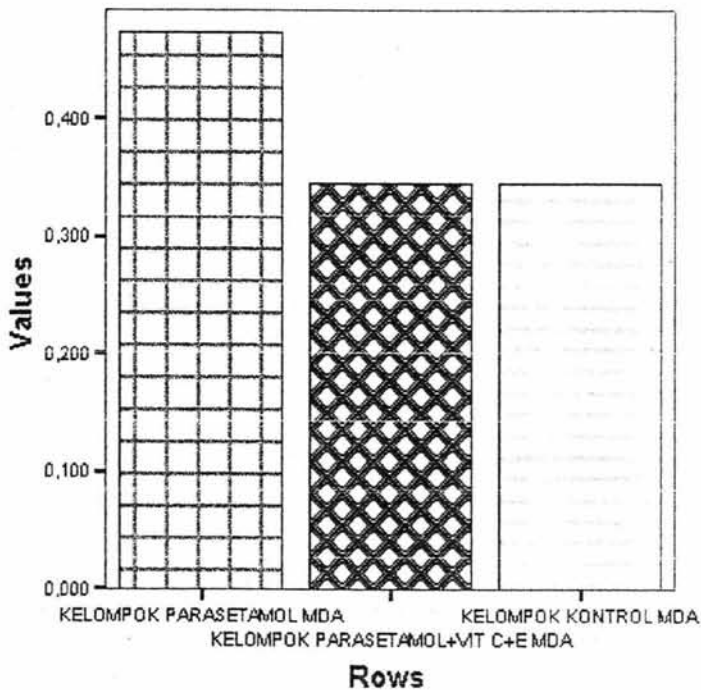
LAMPIRAN 2

Hasil Statistik Lengkap

**RERATA DAN SIMPANG BAKU MDA
MENURUT KELOMPOK PERLAKUAN**

KELOMPOK			RERATA	SIM.BAKU
PARASETAMOL	MDA		,473	,036
PARASETAMOL+VIT C+E	MDA		,345	,067
KONTROL	MDA		,346	,049

Columns : MDA



GAMBAR : RERATA MDA MENURUT KELOMPOK PERLAKUAN

NORMALITY TEST**NPar Tests****KELOMPOK = PARASETAMOL****One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		MDA
N		6
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	,47300
	Std. Deviation	3,60E-02
Most Extreme Differences	Absolute	,191
	Positive	,191
	Negative	-,172
Kolmogorov-Smirnov Z		,469
Asymp. Sig. (2-tailed)		,980

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. KELOMPOK = PARASETAMOL

KELOMPOK = PARASETAMOL+VIT C+E**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		MDA
N		6
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	,34517
	Std. Deviation	6,70E-02
Most Extreme Differences	Absolute	,261
	Positive	,130
	Negative	-,261
Kolmogorov-Smirnov Z		,640
Asymp. Sig. (2-tailed)		,807

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. KELOMPOK = PARASETAMOL+VIT C+E

KELOMPOK = KONTROL**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		MDA
N		6
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	,34550
	Std. Deviation	4,87E-02
Most Extreme Differences	Absolute	,170
	Positive	,111
	Negative	-,170
Kolmogorov-Smirnov Z		,417
Asymp. Sig. (2-tailed)		,995

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. KELOMPOK = KONTROL

Univariate Analysis of Variance**Between-Subjects Factors**

	Value Label	N
KELOMPOK 1	PARASETAMOL	6
2	PARASETAMOL +VIT C+E	6
3	KONTROL	6

Descriptive Statistics

Dependent Variable: MDA

KELOMPOK	Mean	Std. Deviation	N
PARASETAMOL	,47300	3,599E-02	6
PARASETAMOL+VIT C+E	,34517	6,700E-02	6
KONTROL	,34550	4,869E-02	6
Total	,38789	7,895E-02	18

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: MDA

F	df1	df2	Sig.
,494	2	15	,620

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

a. Design: KEL



Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: MDA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	2,773 ^a	3	,924	340,062	,000
KEL	2,773	3	,924	340,062	,000
Error	4,078E-02	15	2,719E-03		
Total	2,814	18			

a. R Squared = ,986 (Adjusted R Squared = ,983)

Estimated Marginal Means KELOMPOK

Estimates

Dependent Variable: MDA

KELOMPOK	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
PARASETAMOL	,473	,021	,428	,518
PARASETAMOL+VIT C+E	,345	,021	,300	,391
KONTROL	,346	,021	,300	,391

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: MDA

(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a
PARASETAMOL	PARASETAMOL+VIT C+E	,128*	,030	,001
	KONTROL	,128*	,030	,001
PARASETAMOL+VIT C+E	PARASETAMOL	-,128*	,030	,001
	KONTROL	-3,333E-04	,030	,991
KONTROL	PARASETAMOL	-,128*	,030	,001
	PARASETAMOL+VIT C+E	3,333E-04	,030	,991

Based on estimated marginal means

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

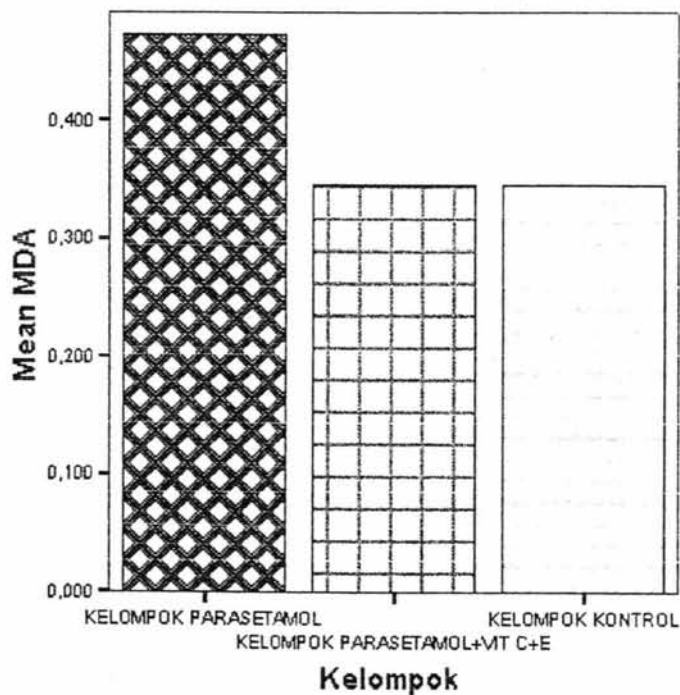
a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Univariate Tests

Dependent Variable: MDA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	6,520E-02	2	3,260E-02	11,991	,001
Error	4,078E-02	15	2,719E-03		

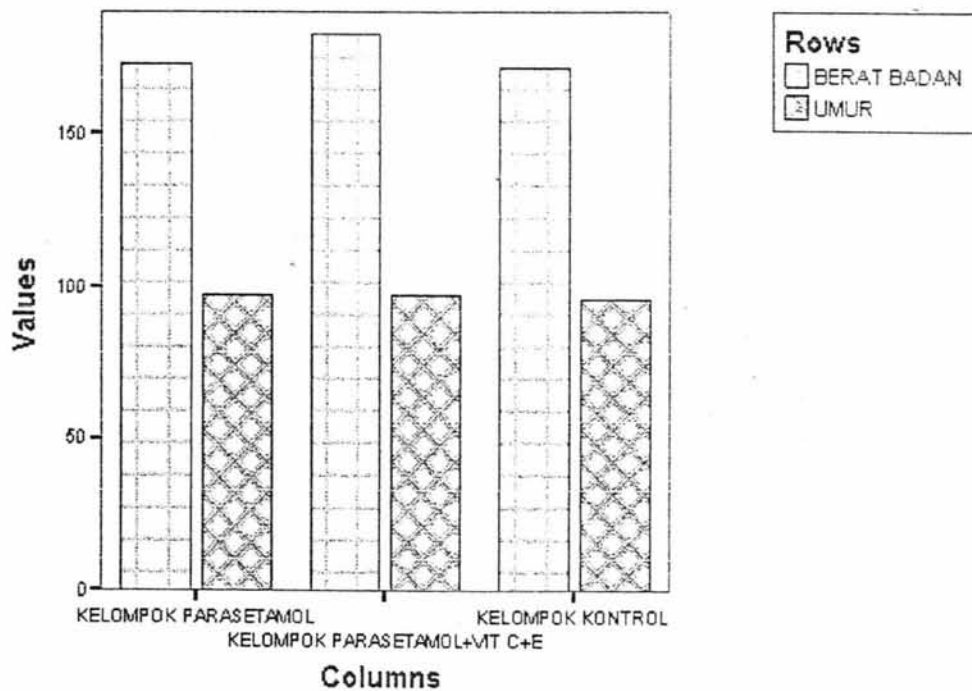
The F tests the effect of KELOMPOK. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.



GAMBAR : PERUBAHAN MDA PADA KETIGA KELOMPOK PERLAKUAN

**RERATA DAN SIMPANG BAKU BERAT BADAN DAN UMUR
MENURUT KELOMPOK PERLAKUAN**

KELOMPOK			RERATA	SIM. BAKL
PARASETAMOL		BERAT BADAN	173	3
		UMUR	97	1
PARASETAMOL+VIT C+E		BERAT BADAN	183	4
		UMUR	97	2
KONTROL		BERAT BADAN	172	7
		UMUR	96	2



**GAMBAR : RERATA BERAT BADAN DAN UMUR TIKUS
MENURUT KELOMPOK PERLAKUAN**

NPar Tests KELOMPOK = PARASETAMOL

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		BERAT BADAN	UMUR
N		6	6
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	172,50	97,00
	Std. Deviation	3,27	1,41
Most Extreme Differences	Absolute	,111	,167
	Positive	,111	,167
	Negative	-,111	-,167
Kolmogorov-Smirnov Z		,272	,408
Asymp. Sig. (2-tailed)		1,000	,996

- a. Test distribution is Normal.
 b. Calculated from data.
 c. KELOMPOK = PARASETAMOL

KELOMPOK = PARASETAMOL+VIT C+E

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		BERAT BADAN	UMUR
N		6	6
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	182,67	97,00
	Std. Deviation	3,88	2,10
Most Extreme Differences	Absolute	,235	,183
	Positive	,235	,183
	Negative	-,115	-,183
Kolmogorov-Smirnov Z		,575	,449
Asymp. Sig. (2-tailed)		,895	,988

- a. Test distribution is Normal.
 b. Calculated from data.
 c. KELOMPOK = PARASETAMOL+VIT C+E

KELOMPOK = KONTROL**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		BERAT BADAN	UMUR
N		6	6
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	171,67	95,67
	Std. Deviation	6,59	1,86
Most Extreme Differences	Absolute	,211	,262
	Positive	,211	,262
	Negative	-,165	-,185
Kolmogorov-Smirnov Z		,517	,642
Asymp. Sig. (2-tailed)		,952	,804

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. KELOMPOK = KONTROL

Oneway**Descriptives**

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minim um	Maxim um
BERAT BADAN	PARASETAMOL	6	172,50	3,27	1,34	168	177
	PARASETAMOL+VIT C+	6	182,67	3,88	1,58	178	189
	KONTROL	6	171,67	6,59	2,69	165	180
	Total	18	175,61	6,84	1,61	165	189
UMUR	PARASETAMOL	6	97,00	1,41	,58	95	99
	PARASETAMOL+VIT C+	6	97,00	2,10	,86	94	100
	KONTROL	6	95,67	1,86	,76	94	99
	Total	18	96,56	1,82	,43	94	100

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
BERAT BADAN	4,072	2	15	,059
UMUR	,625	2	15	,549

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BERAT BADAN	Between Groups	450,111	2	225,056	9,752	,002
	Within Groups	346,167	15	23,078		
	Total	796,278	17			
UMUR	Between Groups	7,111	2	3,556	1,081	,364
	Within Groups	49,333	15	3,289		
	Total	56,444	17			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
BERAT BADAN	PARASETAMOL	PARASETAMOL+VIT C+E	-10,17*	2,77	,002
		KONTROL	,83	2,77	,768
	PARASETAMOL+VIT C+E	PARASETAMOL	10,17*	2,77	,002
		KONTROL	11,00*	2,77	,001
	KONTROL	PARASETAMOL	-,83	2,77	,768
		PARASETAMOL+VIT C+E	-11,00*	2,77	,001
UMUR	PARASETAMOL	PARASETAMOL+VIT C+E	,00	1,05	1,000
		KONTROL	1,33	1,05	,222
	PARASETAMOL+VIT C+E	PARASETAMOL	,00	1,05	1,000
		KONTROL	1,33	1,05	,222
	KONTROL	PARASETAMOL	-1,33	1,05	,222
		PARASETAMOL+VIT C+E	-1,33	1,05	,222

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

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

	Value Label	N
KELOMPOK 1	PARASETAMOL	6
	PARASETAMOL+VIT C+E	6
	KONTROL	6

Descriptive Statistics

Dependent Variable: MDA

KELOMPOK	Mean	Std. Deviation	N
PARASETAMOL	,47300	3,599E-02	6
PARASETAMOL+VIT C+E	,34517	6,700E-02	6
KONTROL	,34550	4,869E-02	6
Total	,38789	7,895E-02	18

Levene's Test of Equality of Error Variances

Dependent Variable: MDA

F	df1	df2	Sig.
,693	2	15	,515

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

a. Design: BB+UMR+KEL

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: MDA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	2,780 ^a	5	,556	210,787	,000
BB	1,071E-03	1	1,071E-03	,406	,535
UMR	2,519E-03	1	2,519E-03	,955	,346
KEL	5,418E-02	3	1,806E-02	6,847	,005
Error	3,429E-02	13	2,638E-03		
Total	2,814	18			

a. R Squared = ,988 (Adjusted R Squared = ,983)

**Estimated Marginal Means
KELOMPOK****Estimates**

Dependent Variable: MDA

KELOMPOK	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
PARASETAMOL	,476 ^a	,024	,424	,528
PARASETAMOL+VIT C+E	,328 ^a	,029	,264	,391
KONTROL	,360 ^a	,024	,309	,412

a. Evaluated at covariates appeared in the model: BERAT BADAN = 175,61, UMUR = 96,56.

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: MDA

(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a
PARASETAMOL	PARASETAMOL+VIT C+E	,148*	,043	,005
	KONTROL	,115*	,031	,003
PARASETAMOL+VIT C+E	PARASETAMOL	-,148*	,043	,005
	KONTROL	-3,288E-02	,043	,455
KONTROL	PARASETAMOL	-,115*	,031	,003
	PARASETAMOL+VIT C+E	3,288E-02	,043	,455

Based on estimated marginal means

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

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Univariate Tests

Dependent Variable: MDA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	4,812E-02	2	2,406E-02	9,122	,003
Error	3,429E-02	13	2,638E-03		

The F tests the effect of KELOMPOK. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Correlations KELOMPOK = PARASETAMOL

Correlations^a

		MDA	BERAT BADAN AWAL	BERAT BADAN AKHIR	UMUR
MDA	Pearson Correlation	1,000	,180	,158	,189
	Sig. (2-tailed)	,	,733	,765	,720
	N	6	6	6	6
BERAT BADAN AWAL	Pearson Correlation	,180	1,000	,061	-,753
	Sig. (2-tailed)	,733	,	,909	,084
	N	6	6	6	6
BERAT BADAN AKHIR	Pearson Correlation	,158	,061	1,000	,476
	Sig. (2-tailed)	,765	,909	,	,340
	N	6	6	6	6
UMUR	Pearson Correlation	,189	-,753	,476	1,000
	Sig. (2-tailed)	,720	,084	,340	,
	N	6	6	6	6

a. KELOMPOK = PARASETAMOL

KELOMPOK = PARASETAMOL+VIT C+E

Correlations^a

		MDA	BERAT BADAN AWAL	BERAT BADAN AKHIR	UMUR
MDA	Pearson Correlation	1,000	,687	,189	,363
	Sig. (2-tailed)	,	,132	,720	,480
	N	6	6	6	6
BERAT BADAN AWAL	Pearson Correlation	,687	1,000	,573	,790
	Sig. (2-tailed)	,132	,	,235	,062
	N	6	6	6	6
BERAT BADAN AKHIR	Pearson Correlation	,189	,573	1,000	,737
	Sig. (2-tailed)	,720	,235	,	,095
	N	6	6	6	6
UMUR	Pearson Correlation	,363	,790	,737	1,000
	Sig. (2-tailed)	,480	,062	,095	,
	N	6	6	6	6

a. KELOMPOK = PARASETAMOL+VIT C+E

KELOMPOK = KONTROL**Correlations^a**

		MDA	BERAT BADAN AWAL	BERAT BADAN AKHIR	UMUR
MDA	Pearson Correlation	1,000	,488	,520	,472
	Sig. (2-tailed)	,	,326	,291	,344
	N	6	6	6	6
BERAT BADAN AWAL	Pearson Correlation	,488	1,000	,814*	-,017
	Sig. (2-tailed)	,326	,	,048	,974
	N	6	6	6	6
BERAT BADAN AKHIR	Pearson Correlation	,520	,814*	1,000	,315
	Sig. (2-tailed)	,291	,048	,	,543
	N	6	6	6	6
UMUR	Pearson Correlation	,472	-,017	,315	1,000
	Sig. (2-tailed)	,344	,974	,543	,
	N	6	6	6	6

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

a. KELOMPOK = KONTROL.

LAMPIRAN 4

Foto-Foto

