

ACCIDENTAL
UNIVERSITY
SURABAYA

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI VITAMIN C DAN E
TERHADAP AKTIVITAS *Superoxide dismutase* (SOD) DAN
KADAR *Malondialdehyde* (MDA) PADA ERITROSIT
Rattus norvegicus GALUR *Wistar*
YANG DIINDUKSI L-TIROKSIN**

760 55/03
edy
P

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



EDYSON

**MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

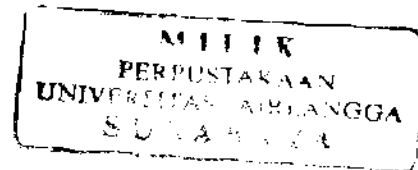
2002

**PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI VITAMIN C DAN E
TERHADAP AKTIVITAS *Superoxide dismutase* (SOD) DAN
KADAR *Malondialdehyde* (MDA) PADA ERITROSIT
Rattus norvegicus GALUR *Wistar*
YANG DIINDUKSI L-TIROKSIN**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TESIS

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



Oleh :

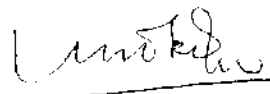
EDYSON
NIM 090014138/M

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
Tanggal 30 September 2002

**TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL, 30 SEPTEMBER 2002**

Oleh

Pembimbing Ketua



Dr. dr. Indri Safitri, M.S.
NIP 130 933 211

Pembimbing



dr. Tri Martini, Sp. B.K.
NIP 130 517 176

Mengetahui
Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Program Pascasarjana Universitas Airlangga



dr. Soehipto, M.S., Ph.D.
NIP 130 687 606

Telah diuji pada

Tanggal 30 September 2002

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Sri Utari Purnomo, dr, Sp. B.K.

Anggota : 1. Dr. Indri Safitri, dr, M.S.

2. Tri Martini, dr, Sp. B.K.

3. Muhammad Cholil Munif, dr, AIF

4. Soetjipto, dr, M.S., Ph. D.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kehadirat Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Kami ucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada Pemerintah Republik Indonesia cq Menteri Pendidikan Nasional melalui Tim Manajemen Program Magister yang telah memberikan bantuan finansial, sehingga meringankan beban saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankan kami mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr Med Puruhito, dr, Sp.BT dan mantan Rektor Universitas Airlangga Prof. H Soedarto, dr, DTMH, Ph.D, atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program Magister.

Rektor Universitas Lambung Mangkurat Prof. H Alfian Noor, Ir dan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat Hasni Hasan Basri, dr, Sp.A yang telah mengijinkan untuk menempuh dan menyelesaikan studi di Program Magister ini.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang dijabat oleh Prof. Dr H Muhammad Amin, dr atas kesempatan untuk menjadi mahasiswa Program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Soetjipto, dr, MS, Ph.D dan Ketua Minat Ilmu Biokimia Prof. Sri Utari Purnomo, dr, Sp.BK atas kesempatan yang diberikan pada saya untuk mengikuti pendidikan program Magister.

Dr Indri Safitri, dr, MS, Pembimbing Ketua yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran.

Tri Martini, dr, Sp.BK, Pembimbing yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran.

Kepala Laboratorium Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Kepala Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, dan Direktur Akademi Analis Kesehatan Departemen Kesehatan RI Surabaya, yang telah memberikan ijin kepada kami untuk menggunakan fasilitas di laboratorium dalam rangka pelaksanaan penelitian kami.

Seluruh staf pengajar dan karyawan Laboratorium Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah membantu dengan tulus ikhlas memberi ilmu dan pengalamannya selama studi kami.

Ayahnda dan ibunda tercinta yang selalu berkorban dan mendoakan keberhasilan kami dalam menempuh cita-cita.

Kakaknda yang telah memberikan dukungan dan mendoakan keberhasilan kami dalam menempuh cita-cita.

Solichul Hadi, dr, (dari Laboratorium Patologi Klinik RSUD dr. Soetomo Surabaya) yang telah banyak membantu dalam pemeriksaan methemoglobin.

Juliana Christyaningsih, Ir, dan suami, serta Heri Soemantoro yang telah banyak membantu dalam penelitian kami.

Toto Harjanto, SSi sebagai teman sejawat yang telah membantu selama pendidikan kami.

Serta semua pihak yang telah membantu dan mendukung selama masa pendidikan yang tidak dapat kami sebut namanya satu per satu.

Akhirnya dengan segenap kerendahan hati kami mohon maaf atas segala kesalahan dan kekurangan. Terima kasih.

Surabaya, 30 September 2002

**PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI VITAMIN C DAN E
TERHADAP AKTIVITAS *Superoxide dismutase* (SOD) DAN
KADAR *Malondialdehyde* (MDA) PADA ERITROSIT
Rattus norvegicus GALUR *Wistar*
YANG DIINDUKSI L-TIROKSIN**

RINGKASAN

Hormon tiroid yang berlebihan dapat menyebabkan hipermetabolisme. Pada hipermetabolisme terjadi peningkatan ambilan O_2 dan peningkatan metabolisme protein, glukosa, trigliserida, dan kolesterol, selanjutnya dapat meningkatkan fosforilasi oksidatif yang mereduksi O_2 menjadi H_2O . Proses reduksi ini kurang sempurna sehingga terbentuk senyawa oksigen reaktif (ROS) yang berlebihan. Di samping itu hipermetabolisme dapat meningkatkan panas yang berakibat jejas pada sel sehingga terbentuk juga ROS. ROS merupakan oksidan kuat dan yang berbentuk radikal bebas, terutama radikal hidroksil sangat berbahaya, karena dapat merusak membran sel yang ditandai antara lain dengan peningkatan kadar *malondialdehyde* (MDA) dan merusak struktur protein pembentuk enzim yang ditandai antara lain penurunan aktivitas *superoxide dismutase* (SOD).

Anti-oksidan dari luar tubuh diperlukan untuk meredam aktivitas radikal bebas yang berlebihan, seperti vitamin C dan E. Vitamin C bekerja pada sitoplasma dan vitamin E bekerja pada membran sel serta pada tekanan O_2 yang tinggi. Dengan demikian pemberian kombinasi vitamin C dan E diharapkan memberikan efek yang optimal dalam meredam aktivitas radikal bebas dan ROS.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh pemberian kombinasi vitamin C dan E terhadap aktivitas SOD dan kadar MDA pada eritrosit tikus yang mengalami hipermetabolisme. Hipermetabolisme dibuat melalui induksi dengan l-tiroksin. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas

Brawijaya Malang. Pada penelitian pendahuluan dengan menggunakan *Rattus norvegicus* hari ke-4 induksi l-tiroksin (1 mg/kg BB per oral) terjadi hipermetabolisme. Pada penelitian digunakan 25 ekor *Rattus norvegicus* galur *Wistar* yang dibagi dalam 5 kelompok dan setiap kelompok 5 ekor tikus. Kelompok I adalah kelompok kontrol pretest dan kelompok II adalah kelompok kontrol posttest. Kelompok III diberikan l-tiroksin (1 mg/kg BB) per oral perhari selama 14 hari bersama pemberian vitamin C (20 mg/kg BB) dan E (400 mg/kg BB) per oral per hari yang dimulai sejak hari ke-1 dan kelompok IV diberikan sama seperti kelompok III, namun pemberian vitamin C dan E sejak hari ke-4. Kelompok V hanya diberikan l-tiroksin (1 mg/kg BB) per oral perhari selama 14 hari. Aktivitas SOD eritrosit diukur menggunakan protokol Wong. Kadar MDA eritrosit diukur menggunakan metode *thiobarbituric acid* (TBA) dari Uchiyama dan Mihara. Data dianalisis menggunakan statistik deskriptif dan *Anova* ($\alpha = 0,05$).

Hasil penelitian menunjukkan rata-rata perubahan kadar MDA eritrosit pada kelompok V (0,0648 $\mu\text{g/ml}$) lebih tinggi dibandingkan kelompok III (-0,006 $\mu\text{g/ml}$) atau IV (-0,043 $\mu\text{g/ml}$). Rata-rata perubahan aktivitas SOD eritrosit pada kelompok V (-1,784 unit/ml) lebih rendah daripada kelompok III (-1,9576 unit/ml) dan lebih tinggi daripada kelompok IV (-1,6312 unit/ml) namun tidak ada perbedaan yang bermakna.

Kesimpulan penelitian ini adalah :

1. Pada *Rattus norvegicus* galur *Wistar* yang diinduksi l-tiroksin selama 14 hari pemberian kombinasi vitamin C dan E sejak hari ke-1 dapat menghambat peningkatan kadar MDA eritrosit.
2. Pada *Rattus norvegicus* galur *Wistar* yang diinduksi l-tiroksin selama 14 hari pemberian kombinasi vitamin C dan E sejak hari ke-4 dapat menghambat peningkatan kadar MDA eritrosit.
3. Pada *Rattus norvegicus* galur *Wistar* yang diinduksi l-tiroksin selama 14 hari pemberian kombinasi vitamin C dan E sejak hari ke-1 tidak terbukti menghambat penurunan aktivitas SOD eritrosit.
4. Pada *Rattus norvegicus* galur *Wistar* yang diinduksi l-tiroksin selama 14 hari pemberian kombinasi vitamin C dan E sejak hari ke-4 tidak terbukti menghambat penurunan aktivitas SOD eritrosit.

ABSTRACT

THE EFFECT OF COMBINED VITAMIN C AND E SUPPLEMENTATION ON SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD) ACTIVITIES AND MALONDIALDEHYDE (MDA) LEVELS OF THE *Wistar Rattus norvegicus* ERYTHROCYTES IN L-THYROXINE ADMINISTRATION

Vitamin C and E are antioxidants act cellularly to defend against the damaging effect of free radicals and reactive oxygen species (ROS). It is expected when they are given together they will demonstrate an optimum effectiveness in reducing free radicals and ROS toxicities.

This research aimed to study the effect of combined vitamin C and E supplementation on SOD activities and MDA levels of rat erythrocytes in hypermetabolic state induced by l-thyroxine administration. This research was done in Laboratory of Biochemistry, Faculty of Medicine, Airlangga University, Surabaya and Biomedical Laboratory, Faculty of Medicine, Brawijaya University, Malang. In the experimental design we used 25 rats (the *Wistar Rattus norvegicus*) divided in 5 groups, 5 rats each. The first group was the control pretest group and the second group was the control posttest group. The rats in the third group were given l-thyroxine (1 mg/kg bw) per oral daily for 14 days together with vitamin C (20 mg/kg bw) and E (400 mg/kg bw) supplementation per oral daily starting at the 1st day, while the rats in the fourth group were treated in the same way except that the vitamin C and E supplementatio were started at the 4th day. The fifth group were given l-thyroxine (1 mg/kg bw) per oral daily for 14 days without vitamin C and E. SOD activities of erythrocytes were assayed using Wong's protocols, while MDA levels of erythrocytes were assayed using thiobarbituric acid (TBA) metode (Uchiyama and Mihara). Data were analyzed using descriptive statistic and Anova ($\alpha = 0,05$).

Results of the research showed the mean increased in MDA levels of the fifth group (0,0648 $\mu\text{g/ml}$) was higher than the thirth (-0,006 $\mu\text{g/ml}$) or fourth group (-0,043 $\mu\text{g/ml}$). The mean increased in SOD activities of the fifth group (-1,784 unit/ml) was less than the thirth group (-1,9576 unit/ml) and higher than than fourth group (-1,6312 unit/ml), but the differences were not significant.

The conclusion of the study is that combined vitamin C and E supplementation has benefit in preventing increasing MDA levels in l-thyroxine induced rats, but it is not proved to increase SOD activities in red blood cells.

Key words : *free radicals, ROS, MDA, SOD, vitamin C, vitamin E, hypermetabolic*

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Persetujuan	iv
Penetapan Panitia	v
Ucapan terima kasih	vi
Ringkasan	viii
Abstrak	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR SINGKATAN	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.3.1 Tujuan umum	7
1.3.2 Tujuan khusus	7
1.4 Manfaat Penelitian	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Radikal Bebas	8
2.1.1 Fisiologi dan patologi radikal bebas	8
2.1.2 Asal dan macam radikal bebas	10
2.2 Dampak ROS bagi Tubuh	16
2.2.1 Dampak negatif	16
2.2.2 Dampak positif	18

	Halaman
2.3 Pertahanan Terhadap Oksidan (Anti-oksidan)	19
2.3.1 Anti-oksidan pencegah	19
2.3.2 Anti-oksidan pemutus reaksi rantai	21
2.4 Vitamin C dan E	22
2.4.1 Vitamin C	22
2.4.2 Vitamin E	24
2.4.3 Interaksi vitamin C dan E	26
2.5 Eritrosit	27
2.5.1 Histologi dan fisiologi eritrosit	27
2.5.2 Metabolisme eritrosit	28
2.6 Kelenjar Tiroid	30
2.6.1 Anatomi, fisiologi, dan biokimia kelenjar tiroid	30
2.6.2 Hipermetabolisme akibat hormon tiroid	34
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	
3.1 Kerangka Konseptual	36
3.2 Hipotesis	40
BAB 4 METODE PENELITIAN	
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	41
4.2 Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Sampling	42
4.3 Variabel Penelitian	42
4.3.1 Klasifikasi variabel	42
4.3.2 Definisi operasional variabel	42

	Halaman
4.4 Bahan Penelitian	43
4.5 Instrumen Penelitian	45
4.6 Prosedur Penelitian	46
4.7 Lokasi dan Waktu Penelitian	48
4.8 Analisis Data	49
BAB 5 HASIL PENELITIAN	
5.1 Hasil Uji Statistik Deskriptif	50
5.2 Hasil Uji Normalitas	53
5.3 Hasil Uji <i>Univariate Test</i> Variabel Tergantung	54
5.4 Hasil Uji <i>Pairwise Comparisons</i> Perubahan Variabel Tergantung	55
BAB 6 PEMBAHASAN	
6.1 Hipermetabolisme	56
6.2 Kadar MDA Eritrosit	57
6.3 Aktivitas SOD Eritrosit	59
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1 Kesimpulan	63
7.2 Saran	63
DAFTAR PUSTAKA	65
Lampiran	70

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 : Hasil uji normalitas distribusi (uji <i>Kolmogorov-Smirnov</i>) variabel kadar MDA dan aktivitas SOD eritrosit	53
Tabel 5.2 : Hasil uji <i>univariate test</i> kadar MDA dan aktivitas SOD eritrosit antara kelompok.....	54
Tabel 5.3 : Hasil uji <i>pairwise comparisons</i> perubahan kadar MDA dan aktivitas SOD eritrosit	55

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 : Univalensi reduksi oksigen	11
Gambar 2.2 : Proses pembentukan radikal bebas dan sistem proteksinya	21
Gambar 2.3 : Sintesis asam askorbat	22
Gambar 2.4 : Formula senyawa-senyawa vitamin E	24
Gambar 2.5 : Interaksi dan sinergis antara vitamin C dan E dalam meredam radikal bebas	27
Gambar 2.6 : (a) Struktur hormon tiroid	31
(b) Sintesis dan pengeluaran hormon tiroid	31
Gambar 2.7 : Mekanisme aksi hormon tiroid	32
Gambar 2.8 : Sistem pengaturan hormon tiroid	34
Gambar 5.1 : Rata-rata kadar MDA eritrosit menurut kelompok	50
Gambar 5.2 : Rata-rata aktivitas SOD eritrosit menurut kelompok	51
Gambar 5.3 : Rata-rata perubahan kadar MDA eritrosit menurut kelompok ...	51
Gambar 5.4 : Rata-rata perubahan aktivitas SOD eritrosit menurut kelompok .	52

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Penentuan Jumlah Sampel	70
Lampiran 2 : Prosedur Pemeriksaan Aktivitas SOD Eritrosit	71
Lampiran 3 : Prosedur Pemeriksaan Kadar MDA Eritrosit	73
Lampiran 4 : Prosedur Pemeriksaan Methemoglobin	75
Lampiran 5 : Hasil Pemeriksaan T ₃ , T ₄ , TSH dan Methemoglobin pada Sampel	76
Lampiran 6 : Kandungan Minyak Kelapa	77
Lampiran 7 : Kandungan Makanan Hewan Coba	78
Lampiran 8 : Hasil Penimbangan Berat Badan Hewan Coba	79
Lampiran 9 : Hasil Pemeriksaan Aktivitas SOD dan Kadar MDA Eritrosit ..	80
Lampiran 10 : Perhitungan Uji Statistik	82

DAFTAR SINGKATAN

ADP	:	<i>Adenosin Diphosphate</i>
ATP	:	<i>Adenosin Triphosphate</i>
BMR	:	<i>Basal Metabolic Rate</i>
DHAA	:	<i>Dehydroascorbic Acid</i>
DMF	:	<i>Dimethyl Formamide</i>
DNA	:	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
Cys-SH	:	<i>Cystein</i>
EDTA	:	<i>Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid</i>
GSHPx	:	<i>Glutation Peroxidase</i>
GSH	:	<i>Glutation (reduced)</i>
GSSG	:	<i>Glutation (oxidized)</i>
Hb	:	<i>Hemoglobine</i>
HCl	:	<i>Hydrogen Chloride</i>
MDA	:	<i>Malondialdehyde</i>
NAD ⁺	:	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide (oxidized)</i>
NADH	:	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide (reduced)</i>
NADPH	:	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (reduced)</i>
NBT	:	<i>Nitroblue Tetrazolium</i>
ROS	:	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SOD	:	<i>Superoxide dismutase</i>
T ₃	:	<i>Triiodothyronine</i>
T ₄	:	<i>Tetraiodothyronine = Thyroxine</i>
TCA	:	<i>Trichloroacetic Acid</i>
TSH	:	<i>Thyroid Stimulating Hormone</i>
XO	:	<i>Xanthine oxidase</i>
XH	:	<i>Xanthine dehydrogenase</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Akhir-akhir ini perhatian dunia kedokteran terhadap oksidan makin meningkat, karena oksidan dapat menimbulkan kerusakan sel (Suryohudoyo, 2000). Oksidan adalah senyawa yang dapat mengoksidasi senyawa lain, dalam pengertian kimia, oksidan adalah akseptor (penerima) elektron. Oksidan yang sangat berbahaya adalah bentuk radikal bebas (Suryohudoyo, 1997), yaitu molekul kimia yang memiliki elektron tak berpasangan (Noguchi & Niki, 1999). Secara umum, suatu molekul memiliki elektron yang berpasangan, namun pada kondisi tertentu elektron tak berpasangan. Elektron yang tak berpasangan tersebut cenderung mencari elektron molekul lain untuk pasangannya, sehingga radikal bebas sangat reaktif, artinya dapat menyebabkan terjadinya reaksi berantai yang menghasilkan radikal bebas baru (Yueniwati, 2000). Dampak negatif radikal bebas antara lain mengganggu integritas sel dan dapat bereaksi dengan komponen-komponen sel, yaitu : (1) komponen struktural, antara lain molekul penyusun membran sel yang dikenal dengan peroksidasi lipid yang menghasilkan senyawa toksik terhadap sel, seperti *malondialdehyde* (MDA), (2) komponen fungsional, antara lain enzim dan DNA, yang pada akhirnya terjadi kerusakan sel (Widjaja, 1999).

Di dalam tubuh radikal bebas dapat dihasilkan oleh aktivitas biokimia, seperti stres oksidatif. Dalam keadaan fisiologis radikal bebas akibat stres oksidatif dapat diredam oleh anti-oksidan tubuh, namun pada keadaan patologis anti-oksidan yang ada pada tubuh tidak cukup untuk meredam radikal bebas yang berlebihan (Seymen dkk., 1997).



Dalam arti biologis, pengertian anti-oksidan lebih luas, yaitu merupakan senyawa-senyawa yang dapat meredam dampak negatif oksidan, tercakup di sini enzim dan protein pengikat logam. Berdasarkan mekanisme pencegahan dampak negatif oksidan, anti-oksidan dapat dibagi menjadi dua golongan, yaitu :

- a. anti-oksidan pencegah (*preventive anti-oxidants*), pada dasarnya merupakan anti-oksidan yang dapat mencegah terjadinya radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$), yaitu radikal yang paling berbahaya. Anti-oksidan jenis ini, antara lain transferin, feritin, seruloplasmin, albumin, *superoxide dismutase* (SOD), glutathion peroksidase, glutathion, dan sistein.
- b. anti-oksidan pemutus rantai (*chain-breaking anti-oxidants*), pada dasarnya merupakan anti-oksidan yang dapat memutus reaksi rantai menjadi senyawa non radikal atau radikal yang lebih stabil, termasuk anti-oksidan pemutus rantai antara lain tokoferol (vitamin E), asam askorbat (vitamin C), β karoten, glutathion, dan sistein (Suryohudoyo, 1997).

Vitamin E merupakan anti-oksidan yang bekerja pada membran sel dan memerlukan tekanan O_2 yang tinggi, sedangkan vitamin C bekerja pada sitosol (Suryohudoyo, 2000). Di samping itu, menurut Widjaja (1999) vitamin C sebagai anti-oksidan dapat pula bekerja di ekstrasel. Karena mekanisme kerja vitamin C dan E yang berbeda, dapat ditarik hipotesis bahwa bila kedua anti-oksidan tersebut digunakan secara bersamaan akan memberikan efek yang optimal. Untuk membuktikan hipotesis tersebut, maka perlu diamati kerja kombinasi anti-oksidan tersebut.

Keadaan patologis yang dapat menimbulkan kerusakan sel antara lain adalah hipermetabolisme (Seymen dkk., 1997). Hipermetabolisme dapat diakibatkan oleh

hormon tiroid yang berlebihan (Larsen, 1998). Hormon tiroid berfungsi untuk mengatur ekspresi sejumlah gen tertentu, diferensiasi jaringan dan perkembangan umum, serta metabolisme umum (Granner, 2000), dan jika kadarnya berlebihan dapat meningkatkan metabolisme tubuh yang dikenal dengan hipermetabolisme. Hipermetabolisme yang terjadi memerlukan oksigen yang lebih banyak untuk proses oksidasi terutama pada siklus Krebs (Stryer, 1988; Mayes, 2000). Pada proses reduksi O_2 menjadi H_2O pada siklus Krebs terjadi pengalihan empat elektron. Dalam keadaan tertentu pengalihan elektron tersebut kurang sempurna, sehingga terbentuk senyawa oksigen reaktif (*reactive oxygen species* ROS) yang merupakan oksidan kuat (Suryohudoyo, 2000) dan dapat berbentuk radikal bebas (Noguchi & Niki, 1999). Di samping itu, hipermetabolisme dapat menghasilkan panas (Larsen dkk., 1998) dan panas ini dapat mengakibatkan jejas sel (Halliwell, 1991). Jejas sel dapat menghasilkan ROS (Halliwell & Gutteridge, 1999). Jadi ROS dapat terbentuk dari hipermetabolisme dan jejas sel, sehingga ROS yang terbentuk berlebihan (Greenspan, 1994), yang berakibat anti-oksidan tubuh tidak cukup meredamnya. Oleh karena itu dibutuhkan anti-oksidan yang lebih banyak untuk meredamnya.

Pada saat ini pengobatan kasus hipermetabolisme akibat tirotoksikosis antara lain dengan menghambat produksi hormon tiroid dengan pemberian preparat antitiroid, atau melalui pengangkatan kelenjar tiroid melalui pembedahan. Tindakan medis lain, yang juga dilakukan misalnya : pemberian agen penghambat beta adrenergik, nutrisi yang mencukupi (termasuk suplemen multivitamin) (Greenspan, 1994). Walaupun pada kasus tersebut terjadi kerusakan sel karena terbentuknya oksidan, belum ditemukan anjuran para ahli untuk pemberian anti-oksidan sebagai pencegahan dan pengobatan tambahan.

Oleh karena itu perlu dipelajari hubungan antara pemberian anti-oksidan dengan aktivitas radikal bebas pada keadaan sebelum terjadi hipermetabolisme, maupun pada saat hipermetabolisme. Hipermetabolisme dapat diketahui melalui rasio kenaikan kadar T_3 /kenaikan kadar $T_4 > 20$ (Greenspan, 1994), kadar TSH $< 50\%$ dari kadar normal (Oppenheimer & Volve, 1990) dan kenaikan methemoglobin (Murray, 2000).

Hipermetabolisme dapat meningkatkan aktivitas ROS, aktivitas ini dapat diketahui antara lain dengan pemeriksaan aktivitas SOD (Setiati, 2001) atau kadar MDA (Tavazzi, 2000). SOD merupakan salah satu anti-oksidan enzimatik, yang aktivitasnya dapat hilang jika terjadi kerusakan struktur protein enzim tersebut akibat aktivitas radikal bebas (Suryohudoyo, 2000). Aktivitas SOD dapat diukur dari sampel eritrosit tikus putih, plasma mamalia (Harjanto, 2002), plasma seminal manusia (Mostafa dkk., 2001), sel jantung marmut (Ozturk dkk., 1997) atau sel hati tikus putih (Yueniwati, 2000). Eritrosit merupakan sel yang tidak memiliki inti (Murray, 2000), sehingga bila aktivitas SOD menurun akibat pengaruh radikal bebas, tidak akan terjadi pembentukan SOD baru akibat ekspresi gen penyandi SOD. Oleh karena itu pengukuran aktivitas SOD di eritrosit lebih akurat dibandingkan di sel atau tempat lain. Di samping itu, hipermetabolisme pada eritrosit menyebabkan kenaikan methemoglobin sehingga pembentukan radikal superoksida meningkat dan akan diredam oleh SOD. Karena itu penelitian ini lebih memfokuskan pada pemeriksaan aktivitas SOD dibandingkan enzim lain. Petanda aktivitas radikal bebas lain adalah kadar MDA (Tavazzi, 2000). MDA adalah salah satu senyawa aldehida sebagai akibat akhir terputusnya rantai asam lemak pembentuk membran sel karena aktivitas radikal bebas (Suryohudoyo, 2000). MDA merupakan senyawa aldehid toksik yang utama terbentuk, karena itu penelitian ini juga

memfokuskan pada pemeriksaan kadar MDA dibandingkan senyawa aldehida lain. Kadar MDA yang tinggi merupakan indikasi kerusakan membran sel yang tinggi (Prasetyo, 2002). Kadar MDA dapat diukur dari sampel eritrosit tikus putih, plasma mamalia (Harjanto, 2002), plasma seminal manusia (Mostafa dkk., 2001), atau sel jantung marmut (Ozturk dkk., 1997). Eritrosit memiliki membran sel dan bertekanan O_2 tinggi, sehingga di dalam eritrosit vitamin E dapat bekerja dengan optimal. Oleh karena itu pengukuran kadar MDA eritrosit akibat pemberian vitamin E lebih akurat dibandingkan tempat lain. Kadar MDA dapat dideteksi dengan metode *thiobarbituric acid* (TBA) (Uchiyama & Mihara, 1978) dan aktivitas SOD dapat dideteksi dengan metode Wong dkk. (1989).

Atas dasar hal tersebut, maka dilakukan penelitian untuk mempelajari pengaruh pemberian kombinasi vitamin C dan E (anti-oksidan) terhadap aktivitas SOD dan kadar MDA eritrosit sebelum terjadi hipermetabolisme dan selama hipermetabolisme. Pada penelitian ini dipakai tikus putih (*Rattus norvegicus* galur *Wistar*) sebagai hewan coba yang diinduksi l-tiroksin, karena dengan hewan ini diharapkan sebagai penelitian awal dan uji pra-klinik. Hipermetabolisme terjadi bila rasio kenaikan kadar T_3 /kenaikan kadar $T_4 > 20$, kadar TSH $< 50\%$ dari kadar normal serta kenaikan methemoglobin, dan dari hasil pemeriksaan pada penelitian pendahuluan hipermetabolisme telah terjadi pada hari ke-4. Karena itu maka penelitian ini dilakukan pemberian anti-oksidan pada hari ke-1 (sebelum hipermetabolisme) dan hari ke-4 (pada hipermetabolisme).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang bahwa pada hipermetabolisme terbentuk radikal bebas yang berlebihan berupa ROS yang merupakan oksidan kuat dan berdampak negatif terhadap integritas serta komponen sel (kerusakan sel), sehingga anti-oksidan tubuh diperkirakan tidak cukup untuk meredamnya, serta belum ditemukannya peneliti yang menganjurkan pemberian anti-oksidan sebagai pencegah dan pengobatan pada kasus hipermetabolisme, maka rumusan permasalahan pada penelitian ini adalah :

1. Apakah pada *Rattus norvegicus* galur *Wistar* yang diinduksi l-tiroksin selama 14 hari pemberian kombinasi vitamin C dan E sejak hari ke-1 dapat menghambat peningkatan kadar MDA eritrosit.
2. Apakah pada *Rattus norvegicus* galur *Wistar* yang diinduksi l-tiroksin selama 14 hari pemberian kombinasi vitamin C dan E sejak hari ke-4 dapat menghambat peningkatan kadar MDA eritrosit.
3. Apakah pada *Rattus norvegicus* galur *Wistar* yang diinduksi l-tiroksin selama 14 hari pemberian kombinasi vitamin C dan E sejak hari ke-1 dapat menghambat penurunan aktivitas SOD eritrosit.
4. Apakah pada *Rattus norvegicus* galur *Wistar* yang diinduksi l-tiroksin selama 14 hari pemberian kombinasi vitamin C dan E sejak hari ke-4 dapat menghambat penurunan aktivitas SOD eritrosit.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Mempelajari pengaruh pemberian anti-oksidan terhadap aktivitas radikal bebas sebelum terjadi hipermetabolisme dan selama hipermetabolisme pada *Rattus norvegicus*.

1.3.2 Tujuan khusus

- a. Mempelajari pengaruh pemberian kombinasi vitamin C dan E terhadap aktivitas SOD eritrosit sejak hari ke-1 (sebelum terjadi hipermetabolisme) pada *Rattus norvegicus* yang diinduksi l-tiroksin selama 14 hari.
- b. Mempelajari pengaruh pemberian kombinasi vitamin C dan E terhadap aktivitas SOD eritrosit sejak hari ke-4 (hipermetabolisme) pada *Rattus norvegicus* yang diinduksi l-tiroksin selama 14 hari.
- c. Mempelajari pengaruh pemberian kombinasi vitamin C dan E terhadap kadar MDA eritrosit sejak hari ke-1 (sebelum terjadi hipermetabolisme) pada *Rattus norvegicus* yang diinduksi l-tiroksin selama 14 hari.
- d. Mempelajari pengaruh pemberian kombinasi vitamin C dan E terhadap kadar MDA eritrosit sejak hari ke-4 (hipermetabolisme) pada *Rattus norvegicus* yang diinduksi l-tiroksin selama 14 hari.

1.4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan sebagai penelitian pendahuluan untuk mengembangkan pengobatan tambahan berupa pemberian anti-oksidan pada kasus hipermetabolisme di klinik sesuai dengan pendekatan ilmu kedokteran molekuler.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Radikal Bebas

2.1.1 Fisiologi dan patologi radikal bebas

Radikal bebas adalah suatu senyawa kimia yang berasal dari hasil reaksi kimia dalam tubuh, senyawa kimia ini sangat reaktif (Halliwell, 1991; Yueniwati, 2000). Menurut Suryohudoyo (1997) radikal bebas merupakan suatu atom atau molekul yang memiliki elektron tak berpasangan. Elektron yang tak berpasangan cenderung untuk membentuk pasangan, dan hal ini terjadi dengan menarik elektron dari senyawa lain (Noguchi & Niki, 1999). Radikal bebas memiliki dua sifat, yaitu :

1. Reaktifitas tinggi, karena kecenderungan menarik elektron,
2. Dapat mengubah suatu molekul menjadi suatu radikal.

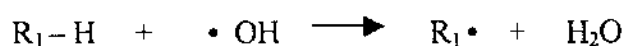
Sifat radikal bebas seperti halnya dengan oksidan terletak pada kecenderungannya untuk menarik elektron. Jadi seperti oksidan, radikal bebas adalah penerima (akseptor) elektron, karena itu dalam kepustakaan kedokteran radikal bebas digolongkan dalam oksidan. Perlu diingat bahwa radikal bebas adalah oksidan, tetapi tidak semua oksidan adalah radikal bebas (Suryohudoyo, 2000). Dijelaskan pula bahwa radikal bebas ini bersifat menarik kuat elektron dan sangat reaktif, serta dapat merusak sel tubuh dengan akibat yang menyertainya (Cochrane, 1991).

Radikal bebas lebih berbahaya dibandingkan dengan oksidan yang bukan radikal.

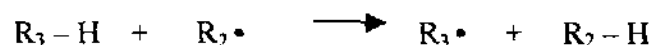
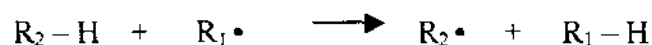
Hal ini disebabkan oleh sifat radikal bebas, yaitu reaktivitasnya yang tinggi dan

kecenderungannya untuk membentuk radikal baru, yang bila menjumpai molekul lain akan membentuk radikal bebas baru lagi, sehingga terjadi reaksi rantai (*chain reaction*). Reaksi rantai tersebut baru berhenti apabila radikal bebas itu dapat diredam (*quenched*) (Patellongi, 1999). Salah satu contoh reaksi radikal bebas adalah reaksi-reaksi yang menyangkut reaksi radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$) sebagai berikut :

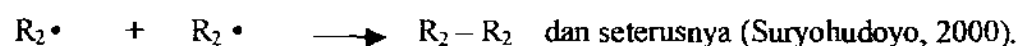
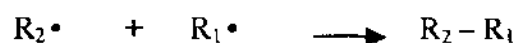
1. tahap inisiasi :



2. tahap propagasi :



3. tahap terminasi :

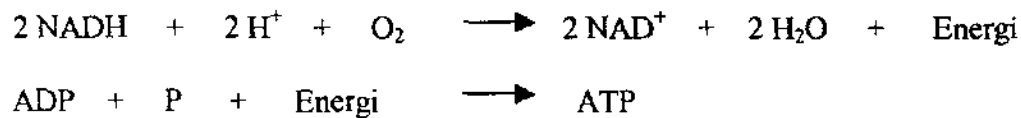


Jadi daya perusak radikal bebas jauh lebih besar dibandingkan dengan oksidan. Karena reaktifitasnya yang tinggi, radikal bebas tak stabil dan berumur sangat pendek, walaupun ada beberapa jenis radikal bebas yang relatif stabil (Suryohudoyo, 2000). Contoh radikal bebas yang stabil antara lain radikal : nitrik oksida ($\bullet\text{NO}$), tokoferol (vitamin E), dan dehidro askorbat (vitamin C) (Noguchi & Niki, 1999).

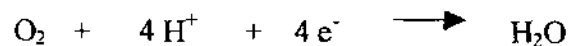
2.1.2 Asal dan macam radikal bebas

Radikal bebas yang terbentuk dan mempengaruhi tubuh kita dapat berasal dari luar tubuh (eksogen) atau dari dalam tubuh (endogen) (Suryohudoyo, 1997). Terbentuknya radikal bebas yang berasal dari luar tubuh dipengaruhi oleh bahan eksogen, antara lain : asap rokok, ozon, nitrogen oksida, asap kendaraan bermotor, substansi kimia, makanan, alkohol, *food additive/preservatives*, substrat anti kanker (Yueniwati, 2000). Radikal bebas yang berasal dari dalam tubuh sebagian besar adalah senyawa oksigen dan merupakan senyawa oksigen reaktif (*reactive oxygen species* = ROS), seperti : radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$), radikal peroksil ($\bullet\text{OOH}$), dan ion superoksida ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (Patellongi, 1999; Halliwell & Gutteridge, 1999).

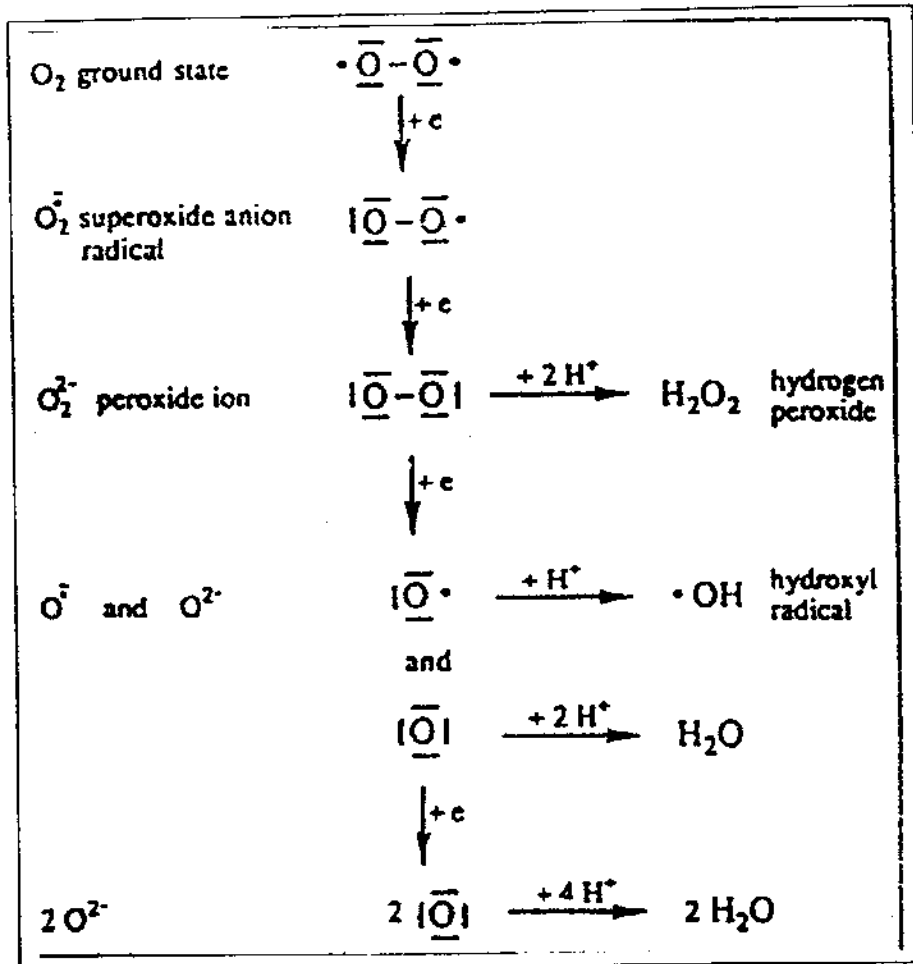
ROS berasal dari oksigen (O_2), suatu senyawa yang diperlukan oleh semua organisme aerobik, termasuk manusia (Suryohudoyo, 2000). Organisme aerobik memerlukan oksigen untuk menghasilkan ATP, suatu senyawa yang merupakan sumber energi bagi sebagian besar makhluk hidup melalui fosforilasi oksidatif yang terjadi di mitokondria (Stryer, 1988; Brownie & Kernohan, 1999; Gilbert, 2000). Selanjutnya menurut Suryohudoyo (1997) proses tersebut digambarkan sebagai berikut :



Pada proses tersebut terjadi reduksi O_2 menjadi H_2O yang secara sederhana ditulis sebagai berikut :



Reduksi oksigen menjadi H_2O merupakan pengalihan empat elektron seperti pada gambar 2.1 berikut.



Gambar 2.1 Univalensi reduksi oksigen (Bast A, Haenen GRMM, Doelman CJA, 1991; Siregar, 1992)

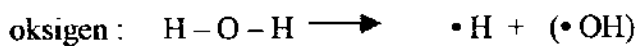
Dalam keadaan tertentu pengalihan elektron tersebut berjalan kurang sempurna, sehingga terjadi ROS yang sangat berbahaya, dan dapat merusak sel apabila tidak diredam. Hal seperti itu terjadi dalam keadaan yang disebut stres oksidatif (*oxidative stress*) (Suryohudoyo, 2000).

ROS dapat berupa :

a. Radikal hidroksil ($\cdot OH$)

Radikal hidroksil ($\cdot OH$) dapat terbentuk melalui :

1. Radiasi sel yang dapat menyebabkan pecahnya ikatan kovalen antara hidrogen dan



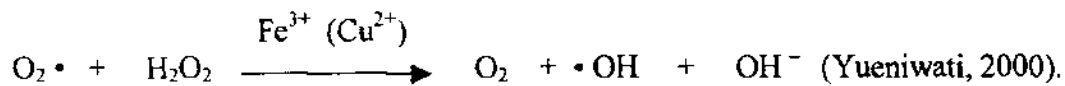
2. Radiasi pada (H_2O_2) sehingga terjadi :



3. Reaksi H_2O_2 dengan logam transisi Fe^{2+} atau Cu^{2+} , maka terbentuk radikal hidroksil melalui reaksi fenton :



4. Reaksi superoksida dengan H_2O_2 menghasilkan radikal hidroksil yang memerlukan Fe^{3+} atau Cu^{2+} melalui reaksi Haber Weiss:



Tiga komponen penting membran sel adalah : fosfolipid, glikolipid (keduanya mengandung asam lemak tak jenuh), serta kolesterol. Asam lemak tak jenuh (asam linoleat, linolenat dan arakidonat) sangat peka terhadap radikal hidroksil. Kemampuan yang khas dari radikal hidroksil ini adalah membentuk reaksi rantai melalui terjadinya abstraksi satu atom hidrogen dari membran sel sehingga terjadi peroksidasi lemak (Yueniwati, 2000).

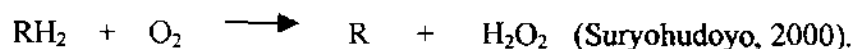
b. Radikal peroksil ($\cdot\text{OOH}$)

Reaksi ion superoksida bereaksi dengan ion hidrogen membentuk radikal peroksil

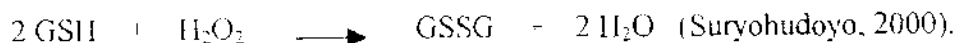


c. Hidrogen peroksida (H_2O_2)

Hidrogen peroksida terutama terbentuk karena aktifitas enzim-enzim oksidase yang terdapat dalam retikulum endoplasmik (mikrosom) dan perosisom. Enzim-enzim tersebut mengkatalisis reaksi berikut :

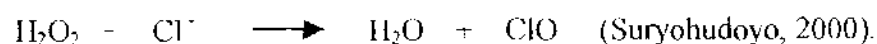


Hidrogen peroksida merupakan oksidan yang kuat dan dapat mengoksidasi berbagai senyawa yang terdapat di dalam sel, misalnya glutathion :



Daya rusak H_2O_2 bertambah besar, karena dapat menghasilkan radikal hidroksil jika bereaksi dengan logam transisi (*transitional metals*), seperti : Fe^{2+} atau Cu^+ (dapat dilihat pada reaksi fenton).

Hidrogen peroksida juga dapat menghasilkan oksidan kuat yang lain, yaitu ion hipoklorit (ClO^-) melalui reaksi yang dikatalisis oleh mieloperoksidase yang terdapat dalam sel-sel radang, seperti : granulosit, monosit dan makrofag :



d. Ion superoksida ($\text{O}_2^{\bullet -}$)

Ion superoksida terbentuk melalui beberapa cara, antara lain :

Sebagai reaksi sampingan yang melibatkan Fe^{2+} seperti :

1. fosforilasi oksidatif
2. oksigenasi hemoglobin
3. hidroksilasi oleh mono-oksigenase (sitokrom P 450 dan sitokrom b_4)
4. ion Fe^{2+}

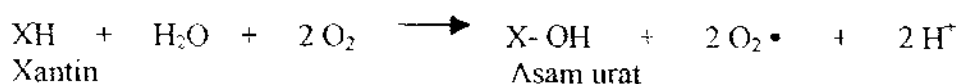
reaksi tersebut dapat ditulis sebagai berikut :



Reaksi yang dikatalisis oleh NADH atau NADPH oksidase yang terdapat dalam mitokondria dan granulosit :



Reaksi yang dikatalisis oleh xantin oksidase :



Xantin oksidase (XO) dalam keadaan normal tak terdapat dalam sel mamalia, enzim ini

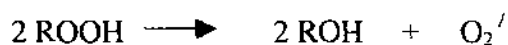
tetapi berasal dari $O_2^{\bullet-}$ dan H_2O_2 (Suryohudoyo, 2000).

e. Singlet oksigen (O_2^1)

Menurut Suryohudoyo (2000) bahwa singlet oksigen merupakan bentuk oksigen yang jauh lebih reaktif dibandingkan oksigen “biasa” (oksigen dalam bentuk *ground state* atau disebut juga “triplet oksigen”). Singlet oksigen ini terbentuk dari reaksi yang dikatalisis oleh enzim-enzim tertentu, antara lain :

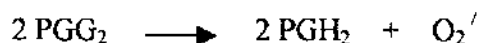
1. mono-oksigenase yang menggunakan sitokrom P 450, apabila enzim tersebut

menggunakan suatu peroksida sebagai substrat :

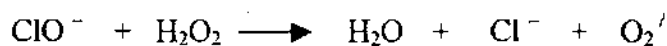


2. prostagladin endoperoksida sintetase, suatu enzim yang berperan dalam pembentukan

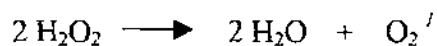
prostaglandin dari asam arakidonat :



3. mieloperoksidase, apabila ion hipoklorit yang terjadi bereaksi dengan H_2O_2 yang kedua



atau apabila kedua reaksi tersebut dijumlahkan :



singlet oksigen dapat mengoksidasi berbagai senyawa :





dan seterusnya (Suryohudoyo, 2000).

Akibat akhir dari rantai ini adalah terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa yang bersifat toksik terhadap sel, antara lain berbagai macam senyawa aldehida, seperti : *malondialdehyde* (MDA), 9-hidroksi-nonenal dan berbagai macam hidrokarbon, seperti : etana (C₂H₆) dan pentana (C₅H₁₂) (Prasetyo, 2001). MDA dapat dipakai sebagai petanda adanya aktivitas radikal bebas (Soeatmadji, 1998; Tavazzi, 2000; Setiati, 2001) dan MDA dapat dideteksi dengan metode TBA (Uchiyama & Mihara, 1978).

Dapat pula terjadi ikatan silang (*cross-linking*) antara dua rantai asam lemak atau antara asam lemak dengan rantai peptida (protein) yang timbul karena reaksi dua radikal sebagai berikut :



Semuanya dapat menyebabkan kerusakan parah membran sel, sehingga membahayakan kehidupan sel (Yunus, 2001).

b. Dampak negatif terhadap DNA

Radikal bebas dapat menimbulkan berbagai perubahan pada DNA (Cochrane, 1991).

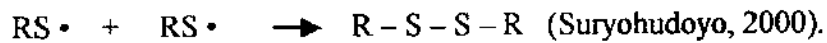
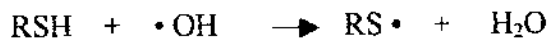
Menurut Suryohudoyo (2000) perubahan tersebut antara lain berupa hidroksilasi basa timin dan sitosin, pembukaan inti purin dan pirimidin, serta terputusnya rantai fosfodiester DNA.

Bila kerusakan tak terlalu parah, masih bisa diperbaiki oleh sistem perbaikan DNA (*DNA repair system*). Apabila kerusakan terlalu parah, misalnya rantai DNA terputus-putus di berbagai tempat, maka kerusakan tersebut tak dapat diperbaiki sehingga mengganggu replikasi sel. Perbaikan DNA ini sering menimbulkan mutasi, karena dalam memperbaiki DNA sistem perbaikan DNA cenderung membuat kesalahan (*error prone*) dan apabila mutasi

ini mengenai gen tertentu, maka mutasi tersebut dapat menimbulkan kanker (Suryohudoyo, 2000).

c. Dampak negatif terhadap protein

Oksidan dapat merusak protein karena dapat bereaksi dengan asam amino penyusun protein. Asam amino penyusun protein yang paling rawan adalah sistein. Sistein mengandung gugusan sulfhidril (SH) yang peka terhadap serangan radikal bebas seperti radikal hidroksil :



Pembentukan ikatan disulfida (- S - S -) menimbulkan ikatan intra atau antar molekul, sehingga protein kehilangan fungsi biologisnya (misalnya enzim kehilangan aktivitasnya) (Suryohudoyo, 2000).

2.2.2 Dampak positif

Dampak negatif oksidan sering dimanfaatkan oleh tubuh untuk melawan serangan organisme patogen. Untuk menghadapi “serangan dari luar”, alam (Sang Pencipta) telah menyediakan sel-sel khusus yang disebut sel-sel radang (*inflammatory cells*) seperti : granulosit, monosit dan makrofag, yang dapat menghasilkan oksidan, seperti : H_2O_2 , $\text{O}_2\cdot^-$, $\cdot\text{OH}$, ClO^- dan O_2^{\prime} . Namun perlu diingat bahwa oksidan selain dapat menghancurkan mikroorganisme dapat pula merusak sel-sel tubuh, sehingga apabila terjadi peradangan hebat yang melibatkan banyak sel radang, kerusakan jaringan tak dapat dihindarkan (Suryohudoyo, 2000).

2.3 Pertahanan Terhadap Oksidan (Anti-oksidan)

ROS terjadi akibat proses biologis normal, namun apabila aktifitas senyawa tersebut tak diredam, oksigen pembawa kehidupan organisme aerobik akan berbalik menjadi racun yang mematikan. Pada kenyataannya organisme tetap bertahan terhadap oksidan, termasuk manusia. Organisme aerobik dapat bertahan, karena alam menyediakan sarana untuk meredam dampak negatif oksidan, yaitu senyawa anti-oksidan (Sies, 1991).

Dalam pengertian kimia, senyawa anti-oksidan adalah senyawa pemberi elektron (*electron donors*). Namun dalam arti biologis, pengertian anti-oksidan lebih luas, yaitu merupakan senyawa yang dapat meredam dampak negatif oksidan. Dalam meredam dampak negatif oksidan diterapkan strategi dua lapis, yaitu :

- a. mencegah terhimpunnya senyawa oksidan secara berlebihan
- b. mencegah reaksi rantai berlanjut (Suryohudoyo, 2000).

Berdasarkan mekanisme pencegahan terhadap dampak negatif, oksidan dapat dibagi menjadi dua golongan, yaitu :

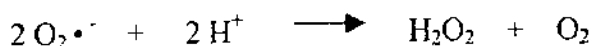
1. Anti-oksidan pencegah (*preventive anti-oxydants*)
2. Anti-oksidan pemutus rantai (*chain-breaking anti-oxydants*) (Soeatmadji, 1998).

2.3.1 Anti-oksidan pencegah

Pada dasarnya tujuan anti-oksidan jenis ini adalah mencegah terjadinya radikal hidroksil (radikal yang paling berbahaya). Pembentuk radikal hidroksil memerlukan tiga komponen yaitu logam transisi Fe atau Cu, H_2O_2 dan $O_2^{\bullet -}$. Agar reaksi fenton tidak terjadi, harus dicegah keberadaan ion Fe^{2+} atau Cu^+ bebas. Untuk itu diperlukan protein yaitu :

1. transferin atau feritin (untuk Fe)
2. seruloplasmin atau albumin (untuk Cu).

Penimbunan $O_2^{\bullet -}$ dicegah oleh superoksida dismutase (SOD) yang mengkatalisis reaksi dismutasi $O_2^{\bullet -}$:

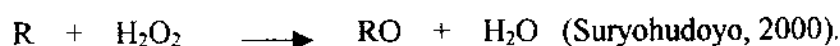


Penimbunan H_2O_2 dicegah melalui aktifitas dua jenis enzim, yaitu :

a. katalase, yang mengkatalisis reaksi dismutasi H_2O_2 :



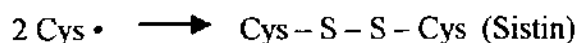
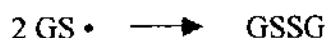
b. peroksidase, yang mengkatalisis reaksi :



Di antara berbagai peroksidase, yang paling penting adalah glutathion peroksidase (GSPx) yang mengkatalisis reaksi :



Apabila radikal hidroksil masih saja terbentuk, masih ada sarana lain untuk meredamnya, tanpa memberi kesempatan untuk memulai reaksi rantai dengan melibatkan senyawa-senyawa yang mengandung gugusan sulfhidril, seperti : glutathion tereduksi (GSH) dan sistein (Cys-SH).



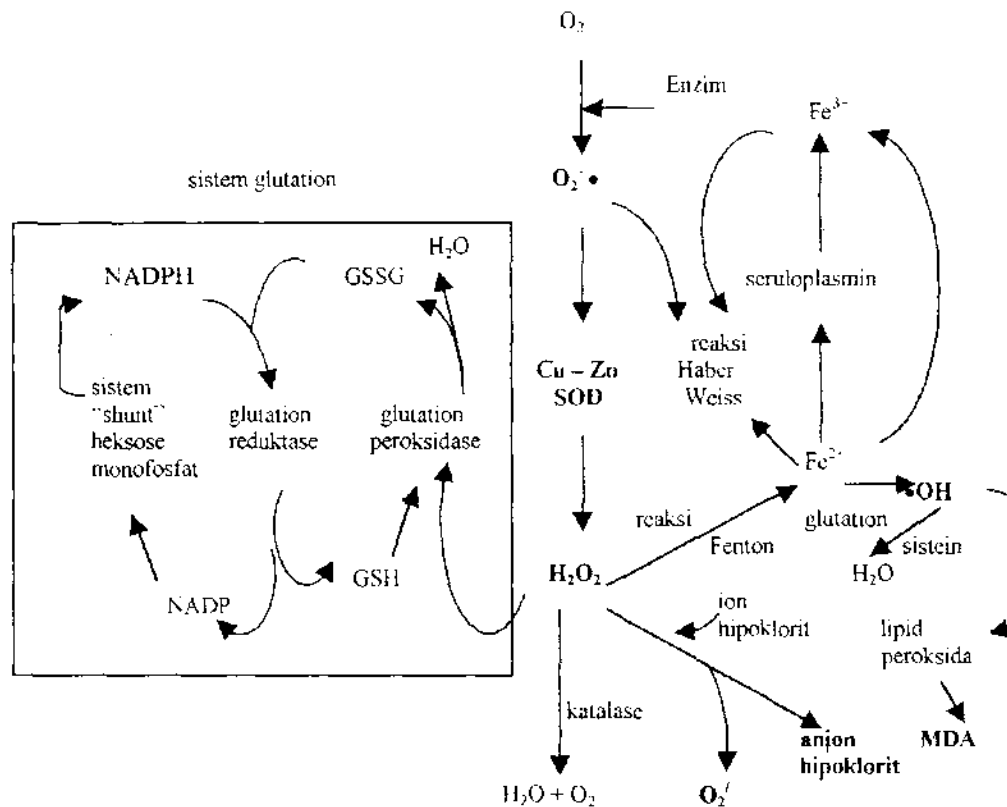
(Suryohudoyo, 2000).

Aktivitas anti-oksidan yang menggambarkan derajat stres oksidatif, antara lain dapat dilihat pada pengukuran aktivitas SOD (Halliwell & Gutteridge, 1999; Setiati, 2001). Aktivitas SOD dapat diperiksa pada eritrosit, plasma (Harjanto, 2002), plasma seminal (Mostafa dkk., 2001), sel jantung (Ozturk dkk. 1997) atau sel hati (Yueniwati, 2000).

2.3.2 Anti-oksidan pemutus reaksi rantai

Termasuk anti-oksidan pemutus reaksi rantai adalah vitamin E (tokoferol), vitamin C (asam askorbat), β -karoten, dan dua senyawa yang juga berperan sebagai antioksidan pencegah, yaitu : glutathion tereduksi dan sistein. Vitamin E dan β -karoten bersifat lipofilik, sehingga dapat berperan pada membran sel untuk mencegah peroksidasi lipid. Sebaliknya, vitamin C, glutathion dan sistein bersifat hidrofilik, berperan dalam sitosol (Suryohudoyo, 2000)

Sebagai ringkasan sumber radikal bebas dan proteksi oleh tubuh dapat dilihat pada gambar 2.2 berikut.

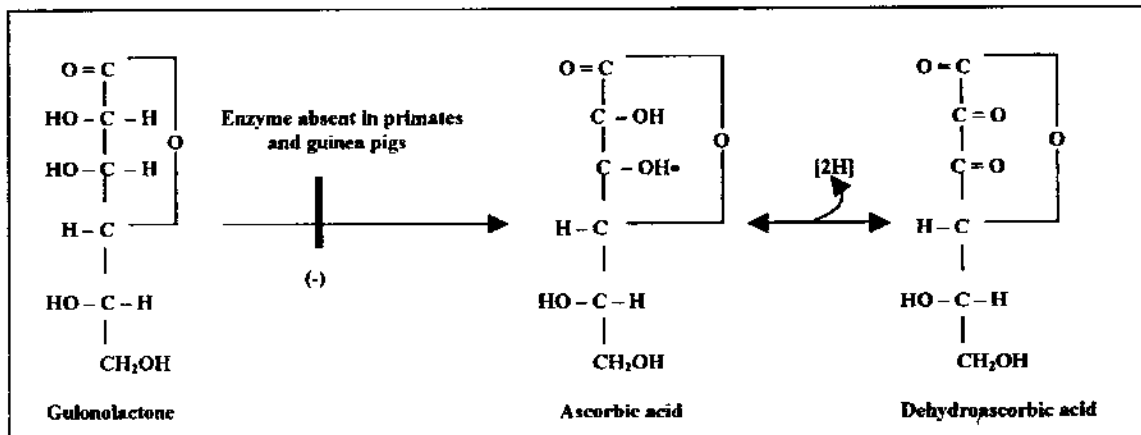


Gambar 2.2 Sumber radikal bebas dan proteksinya (Yueniwati, 1999)

2.4 Vitamin C dan E

2.4.1 Vitamin C

Struktur vitamin C (asam askorbat) sangat mirip dengan glukosa. Pada sebagian besar mamalia, asam askorbat berasal dari glukosa (gambar 2.3), namun manusia tidak dapat mensintesis vitamin ini karena tidak mempunyai enzim L-gulonolakton oksidase. Bentuk vitamin C yang aktif adalah asam askorbat yang merupakan donor ekuivalen pereduksi. Asam askorbat dapat dioksidasi menjadi asam dehidroaskorbat.



Gambar 3. Sintesis asam askorbat (Mayes, 2000)

Asam askorbat larut dalam air dan mekanisme kerjanya masih belum jelas. Beberapa proses di dalam tubuh yang memerlukan asam askorbat, antara lain sintesis kolagen, penguraian tirosin, sintesis epinefrin dari tirosin, pembentukan asam empedu, komponen korteks adrenal, penyerapan besi, dan anti-oksidan (Mayes, 2000).

Telah banyak bukti yang menunjukkan asam askorbat berperan sebagai anti-oksidan. (Moran dkk., 1997 ; Kanter, 1998; Rumsey, 1999; Mostafa dkk, 2001; Wirya, 2002). Sebagai contoh potensi asam askorbat sebagai anti-oksidan telah dibuktikan oleh Kunert dan Tappel, mereka menyuntikkan karbon tetraklorida pada kelompok babi yang mempunyai

kadar asam askorbat yang rendah dan kelompok dengan kadar yang tinggi. Pada kelompok babi yang kadar asam askorbat rendah menghasilkan pentana dan etana yang tinggi dan signifikan, sedangkan pada kelompok yang kadar asam askorbatnya tinggi tidak demikian, kadar pentana dan etananya lebih rendah. Pentana dan etana merupakan indikator peroksidasi lipid (Yunus, 2001).

Asam askorbat merupakan anti-oksidan yang dapat menangkal $\bullet\text{OH}$ dan bertindak sebagai donor hidrogen untuk mengubah radikal tokoferol menjadi alfa-tokoferol. Asam askorbat yang teroksidasi menjadi radikal dehidroaskorbat, dapat menjadi asam askorbat kembali setelah mendapat ion H^+ dari NADH atau pembawa hidrogen lain. Asam askorbat cukup efektif untuk menghentikan peroksidasi lipid (Koentjahja, 2001).

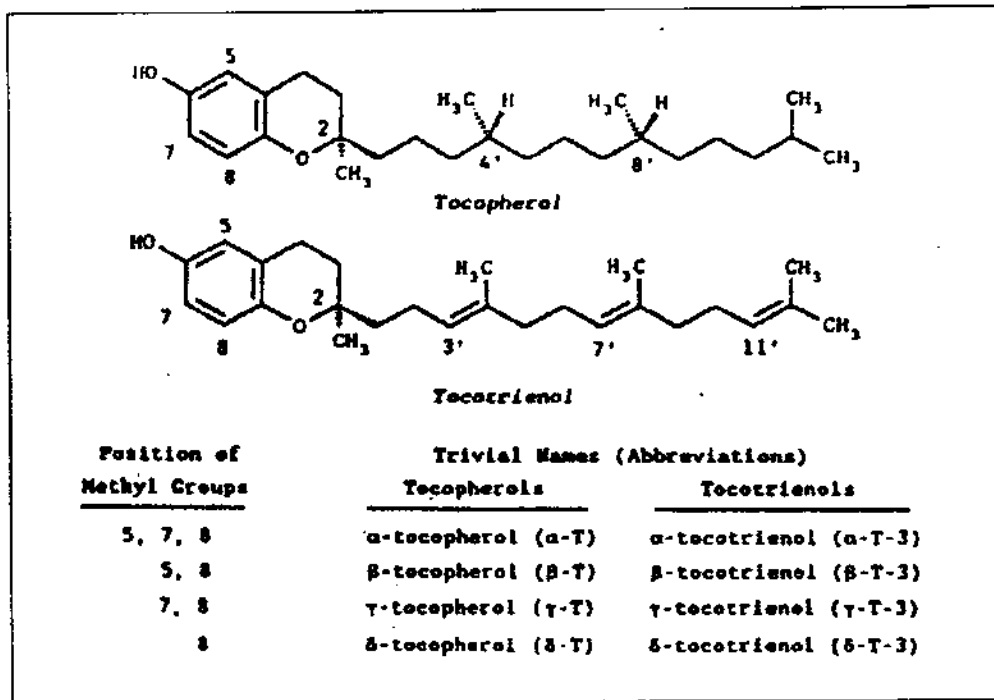
Tubuh manusia tidak mampu memproduksi asam askorbat, sehingga kebutuhan terhadap vitamin C perlu dipasok dari luar tubuh. Banyak perbedaan pendapat mengenai kebutuhan vitamin C per hari. Bagi para perokok dianjurkan 100 mg per hari, sedangkan bukan perokok 60 mg per hari. Tubuh menyimpan asam askorbat secara fluktuatif untuk sistem imunitas, mengikat radikal bebas, mengatur metabolisme kolesterol, dan karbohidrat. Pada orang dengan gizi baik secara normal menyimpan sekitar 5.000 mg, namun sebagian besar orang tidak mencapai nilai tersebut dan kurang mendapat masukan asam askorbat dari luar tubuh, sehingga mudah terjangkit penyakit (Goodman, 2000).

Pemberian vitamin C pada hewan coba dengan dosis 0,2 mg/kg berat badan/hari dapat mencegah kerusakan membran eritrosit akibat latihan aerobik (Yunus, 2001). Menurut Laurence dan Bachran tahun 1964 dosis fisiologis vitamin C pada tikus putih (berat badan 200 g) dapat dihitung dengan konversi terhadap dosis fisiologis manusia (berat badan 70 kg), yaitu dosis normal manusia $\times 0,018$, kemudian menurut Ritchel tahun 1974 pada pemberian

per oral hasilnya dikalikan 5 (Khotib, 1998). Vitamin C per oral mempunyai efek samping yang rendah (Diplock, 1997).

2.4.2 Vitamin E

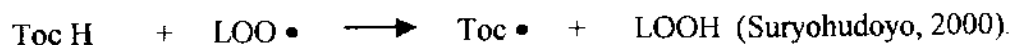
Vitamin E terdiri dari 8 senyawa penting, yaitu alfa, beta, gamma dan delta tokoferol atau tokotrienol (gambar 2.4).



Gambar 2.4 Formula senyawa-senyawa vitamin E (Machlin, 1991)

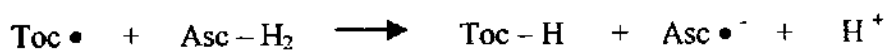
D- α -tokoferol mempunyai distribusi alami yang luas dan memiliki aktivitas biologik yang paling besar. Vitamin ini larut dalam lemak, sehingga penyerapannya tergantung pencernaan lemak. Di dalam darah vitamin E diangkut oleh lipoprotein dan dapat disimpan dalam jaringan adiposa (Mayes, 2000). Vitamin E merupakan anti-oksidan yang sangat penting (Kanter, 1998; Papas, 1999; Tavazzi, 2000; Mostafa, 2001; Wirya, 2002).

Keberadaan dalam membran, memungkinkan vitamin E (Toc H) dapat bereaksi dengan radikal lipid (L•) dan radikal peroksilipid (LOO•)



Walaupun radikal vitamin E (Toc•) tak terlalu reaktif karena terjadinya resonansi, tetapi radikal vitamin E juga harus dihilangkan. Ada tiga cara untuk menghilangkan Toc• :

- a. melalui reaksi intramolekul menghasilkan senyawa non-radikal
- b. setelah bergeser ke arah permukaan molekul, radikal vitamin E bereaksi dengan vitamin C (Asc-H) dan menghasilkan radikal vitamin C (Asc•⁻) :



- c. radikal vitamin C kemudian dihilangkan melalui reaksi dismutasi yang menghasilkan vitamin C dan dehidro-asam askorbat (DHAA), radikal vitamin E dapat bereaksi dengan glutathion atau sistein yang juga terdapat dalam sitosol :



Vitamin E hanya dapat berperan bila tekanan oksigen ($p\text{O}_2$) tinggi, karena vitamin ini cenderung terkonsentrasi dalam struktur lipid yang terkena tekanan parsial O_2 yang paling tinggi, seperti membran eritrosit, membran saluran pernapasan, dan retina (Mayes, 2000).. Pada tekanan oksigen rendah, peranan vitamin E digantikan oleh β -karoten. Seperti halnya radikal vitamin E, radikal β -karoten agak stabil karena adanya resonansi dalam molekulnya (Suryohudoyo, 2000).

Penelitian pada hewan coba yang diberi vitamin E dosis 400 mg/kg berat badan/hari membuktikan adanya pengaruh gentamisin terhadap aktivitas *glutathion peroxidase*, SOD, dan kadar MDA pada jantung babi (Ozturk dkk.,1997). Vitamin E per oral memiliki keamanan yang cukup tinggi dengan efek samping dan toksisitas yang rendah (Diplock, 1997).

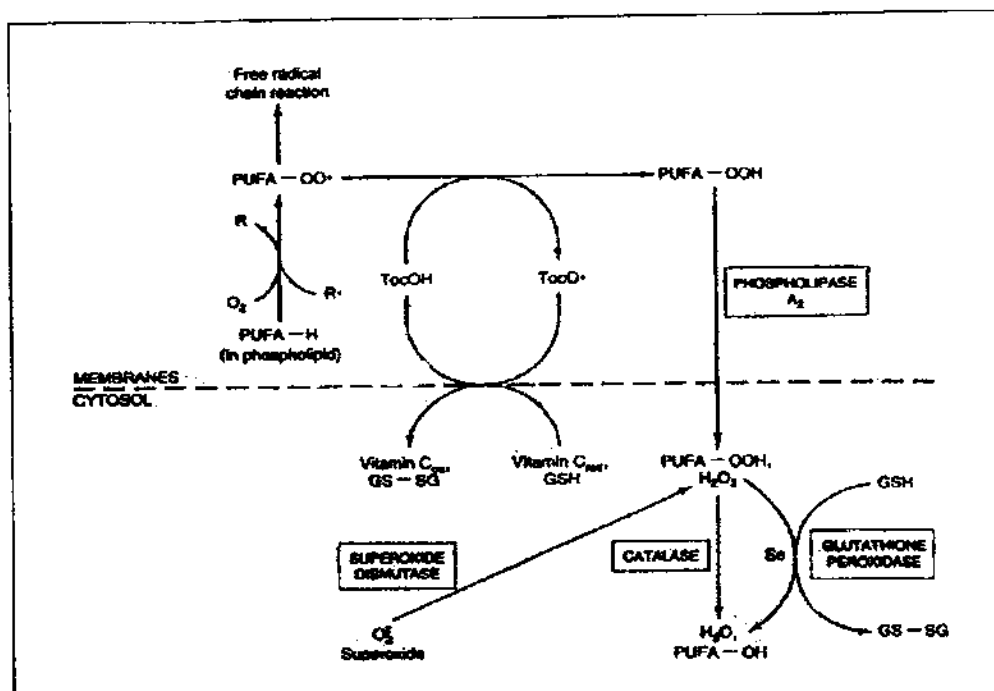
2.4.3 Interaksi vitamin C dan E

Meskipun vitamin C larut dalam air, tetapi vitamin ini dapat pula memecah radikal bebas dalam kompartemen lemak. Terjadi sinergis antara vitamin C dan E sebagai pemecah radikal bebas sebab :

- a. pada kondisi kadar vitamin E yang rendah, penambahan vitamin C dapat menjaga kadar vitamin E agar tetap tinggi
- b. pada kondisi kadar vitamin E yang adekuat, penambahan vitamin C dalam dosis besar justru akan menurunkan potensi anti-oksidan, karena kadar vitamin E akan cepat berkurang, sehingga kebutuhan vitamin E meningkat dengan penambahan vitamin C dalam dosis besar.

Penelitian pada marmut yang telah dilakukan Chen pada tahun 1989, menunjukkan bahwa penambahan vitamin C dengan dosis 2 mg/100 g berat badan per hari pada hewan dengan kadar vitamin C dan E yang rendah dapat meningkatkan kadar vitamin E dalam darah, sedangkan kadar asam tiobarbiturat yang menunjukkan adanya peroksidasi lipid menurun (Yunus, 2001).

Interaksi dan sinergis antara vitamin C dan E dalam meredam radikal bebas dapat dilihat pada gambar 2.5 berikut.



Gambar 2.5 Interaksi dan sinergis antara vitamin C dan E dalam meredam radikal bebas (Mayes, 2000)

(Interaksi dan sinergisme antara sistem antioksidan yang bekerja dalam fase lipid (membran) dan fase aquoues (sitosol). (R•), radikal bebas; PUFA-OO•, radikal bebas peroksil dari asam lemak tidak jenuh ganda dalam membran fosfolipid; PUFA-OOH, asam lemak tak jenuh ganda hidroperoksi dalam membran fosfolipid dilepaskan sebagai asam lemak bebas hidroperoksi ke dalam sitosol melalui kerja fosfolipase A₂; PUFA-OH, asam lemak tak jenuh ganda hidroksi; TocOH, vitamin E (α tokoferol); TocO•, radikal bebas vitamin E; Se, selenium; GSH, glutation tereduksi; GS-SG, glutation teroksidasi, yang kembali ke keadaan tereduksi setelah reaksi dengan NADPH, yang dikatalisis oleh glutation tereduksi; PUFA-H, asam lemak tak jenuh ganda)

2.5 Eritrosit

2.5.1 Histologi dan fisiologi eritrosit

Eritrosit normal berbentuk lempeng bikonkaf, dengan diameter 7,8 μm , dan tebal 2,5 μm pada bagian tepi dan 1 μm pada bagian tengah, volumenya sekitar 90 – 95 μm^3 , serta

bentuknya dapat berubah-ubah jika melewati kapiler (Ganong, 1999). Jumlah eritrosit normal pada laki-laki adalah 4,6 – 6,2 juta/ μ L dengan kadar Hb 14 – 18 g Hb/dl; pada perempuan 4,2 – 5,4 juta/ μ L dengan kadar normal Hb 12 – 16 g Hb/dl dan lama hidupnya 120 hari (Murray, 2000).

Fungsi utama eritrosit adalah mengangkut O_2 dari paru ke jaringan. Eritrosit mampu mengkonsentrasikan Hb dalam cairan sel dan setiap g Hb mampu berikatan dengan 1,39 mL O_2 (Ganong, 1999).

Eritrosit memiliki membran yang sangat fleksibel dan kuat menahan tekanan. Struktur membran eritrosit terdiri dari :

- a. lipid bilayer, yang terdiri dari fosfolipid dan kolesterol tidak teresterifikasi
- b. protein integral atau transmembran yang tersebar di membran dan berada di antara lipid bilayer
- c. membran skeleton, merupakan jaring protein yang melapisi bagian dalam membran (Palek, 1996).

2.5.2 Metabolisme eritrosit

Eritrosit matur tidak memiliki inti, mitokondria, dan retikulum endoplasmik. Eritrosit mempunyai metabolisme yang unik dan relatif sederhana, aspek-aspek penting dalam metabolisme eritrosit, antara lain sumber energi utama adalah glukosa dan membran eritrosit sangat tinggi afinitasnya terhadap transporter glukosa, glikolisis untuk pembentukan ATP dan menghasilkan laktat, ATP bukan berasal dari fosforilasi oksidatif (karena tidak memiliki mitokondria), memiliki bermacam-macam transporter yang mempertahankan ion dan H_2O ,

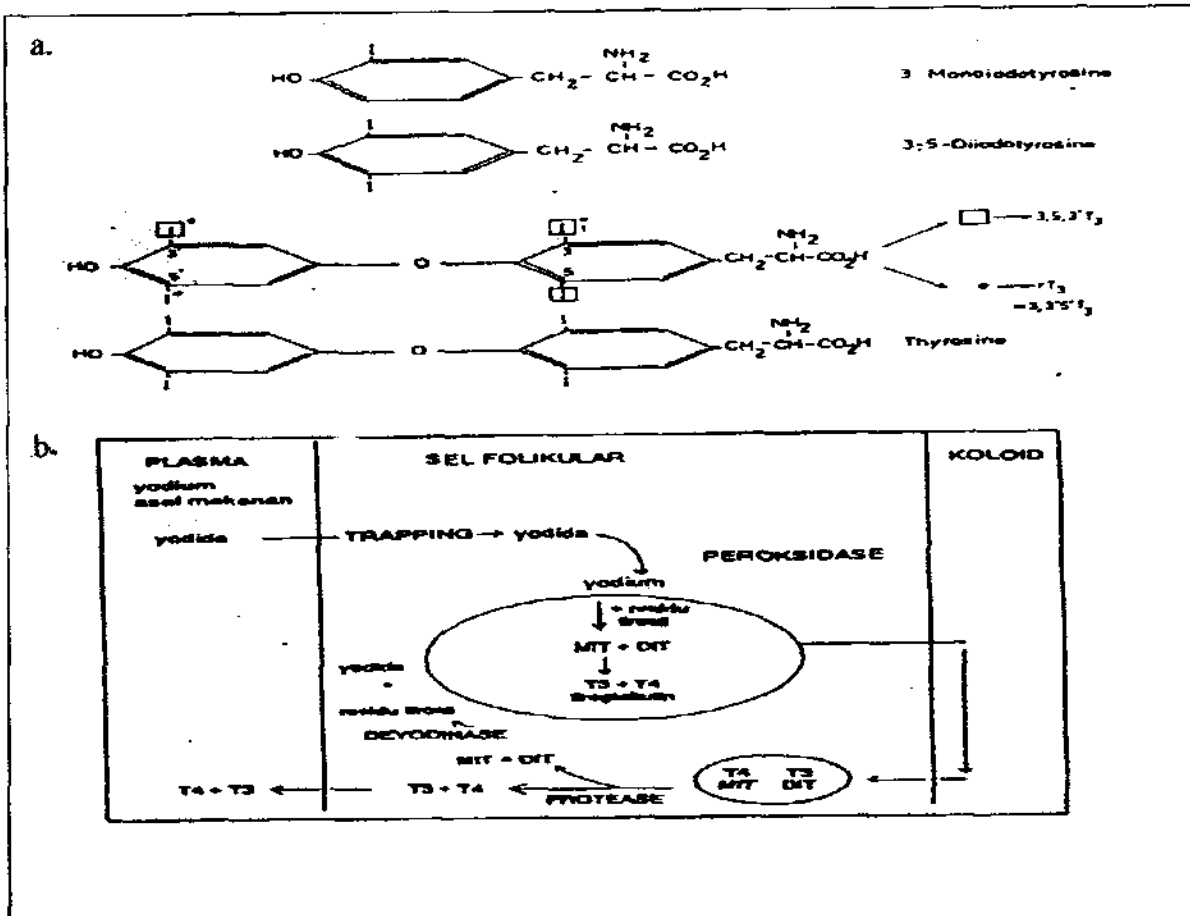
pengendalian kemampuan Hb mengangkut O_2 antara lain oleh pembentukan 2,3 bifosfoglisarat pada glikolisis. Lintasan pentosa fosfat memetabolisme 5 – 10% dari total glukosa yang masuk dan mensintesis NADPH. Eritrosit juga dapat mensintesis GSH, GSH untuk meniadakan peroksida, memerlukan NADPH untuk mengembalikan ke GSSG dan kembali ke keadaan tereduksi. Besi Hb dipertahankan dalam keadaan ferro oleh methemoglobin reduktase bergantung NADH yang mencakup sitokrom b_5 reduktase dan sitokrom b_5 . Pada eritrosit sintesis glikogen, asam lemak, protein, dan asam nukleat tidak terjadi, namun mengandung enzim metabolisme nukleotida tertentu (misalnya adenosin deaminase, pirimidin nukleotidase, dan adenilat kinase). Pada akhir usia hidup eritrosit, globin akan dipecah menjadi asam amino (resintesis tubuh) dan besi dilepaskan dari heme (resintesis tubuh), dan tetrapirrol hem diubah menjadi bilirubin yang diekskresikan ke usus melalui empedu. Sintesis protein oleh retikulosit, namun jika retikulosit memasuki sirkulasi dalam waktu sekitar 24 jam akan kehilangan organel intraselnya (seperti mitokondria, ribosom, dan lain-lain) berubah menjadi eritrosit muda dan bersamaan dengan itu, kehilangan kemampuannya untuk mensintesis protein (Murray, 2000).

Beberapa oksidan kuat akan dihasilkan selama metabolisme eritrosit. O_2^- terbentuk melalui oto-oksidasi Hb menjadi methemoglobin (sekitar 3% eritrosit setiap hari mengalami oto-oksidasi), dan O_2^- secara spontan mengalami dismutasi membentuk $H_2O_2 + O_2$, namun kecepatan reaksi akan bertambah akibat kerja SOD. $\bullet OH$ dan OH^- dapat terbentuk dari H_2O_2 dalam sebuah reaksi nonenzimatik yang dikatalisis oleh Fe^{2+} (reaksi Fenton) (Murray, 2000).

2.6 Kelenjar Tiroid

2.6.1 Anatomi, fisiologi, dan biokimia kelenjar tiroid

Kelenjar tiroid yang mulai terbentuk pada akhir bulan pertama kehamilan, berasal dari lekukan faring antara *branchial pouch* I, II, dan IV dengan ukuran 3,4 - 4 cm. Kelenjar ini terletak di bagian bawah leher, terdiri dari 2 lobus yang dihubungkan oleh istmus dan menutupi cincin trakea 2 dan 3. Pada usia dewasa berat kelenjar ini sekitar 20 g, dan secara mikroskopis terdiri atas banyak folikel yang berkelompok (sekitar 40 buah) membentuk lobulus yang mendapat darah dari *end artery*. Setiap folikel berisi cairan pekat, yaitu koloid yang sebagian besar terdiri dari protein (gliko-protein tiroglobulin). Hormon utama yaitu tiroksin (T_4) dan triiodotironin (T_3) tersimpan juga dalam koloid sebagai bagian dari molekul tiroglobulin (gambar 2.6 a) (Vassart, 1995). Sintesis dan pengeluaran hormon melalui 7 tahap, yaitu tahap : (1) trapping, (2) oksidasi, (3) coupling, (4) penimbunan storage, (5) deidonasi, (6) proteolisis, dan (7) pengeluaran hormon dari kelenjar tiroid (gambar 2.6 b) (Djokomoeljanto, 1996).



Gambar 2.6 (a) Struktur hormon tiroid (keterangan rT_3 = reverse T_3) (Vassart, 1995)

(b) Sintesis dan pengeluaran hormon tiroid (Djokomoeljanto, 1996)

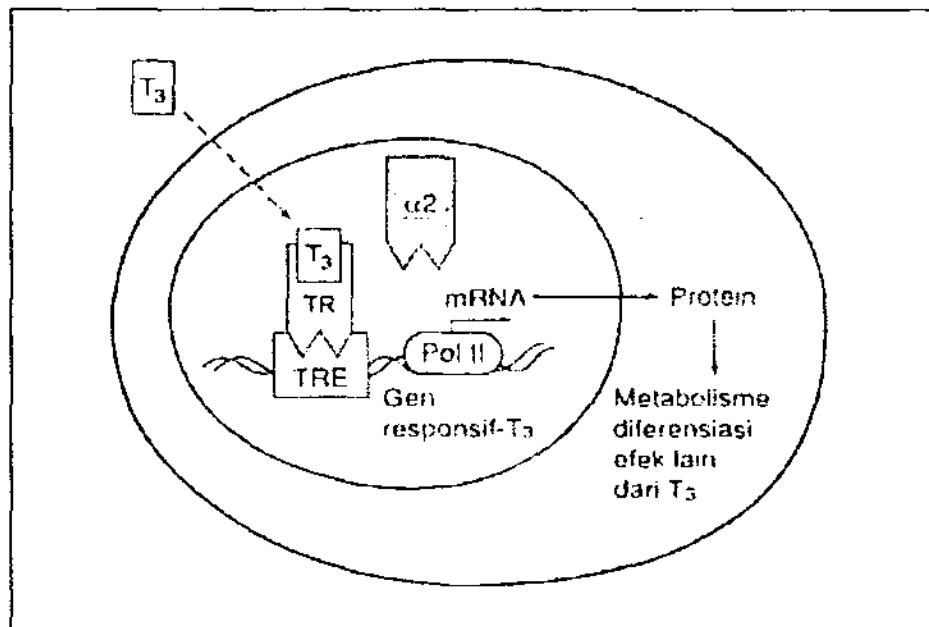
Menurut Djokomoeljanto (1996) efek metabolisme hormon tiroid antara lain :

- metabolisme protein; dalam kadar fisiologis kerja hormon tiroid bersifat anabolisme namun bila dalam kadar lebih dari normal bersifat katabolisme
- metabolisme karbohidrat; bersifat diabetogenik, karena resorpsi intestinal meningkat, cadangan glikogen hati menipis, demikian pula glikogen otot menipis pada kadar tinggi, dan degradasi insulin meningkat

- c. metabolisme lipid; T_4 mempercepat sintesis kolesterol, namun degradasi kolesterol dan ekskresinya melalui empedu jauh lebih cepat, sehingga hiperfungsi hormon tiroid menyebabkan kadar kolesterol rendah, sebaliknya pada hipotiroidisme kolesterol total, ester kolesterol, dan fosfolipid meningkat.

Secara umum, pengaruh metabolik hormon tiroid adalah (1) meningkatkan laju metabolisme dan konsumsi oksigen di jaringan, (2) efek anabolik yang melibatkan sintesis protein (Montgomery dkk., 1983). Dijelaskan pula bahwa hormon tiroid meningkatkan konsumsi O_2 , menimbulkan peningkatan radikal bebas anion superoksida dan menurunkan aktivitas SOD (Greenspan, 1994).

Mekanisme aksi hormon tiroid tingkat seluler melibatkan gen (gambar 2.7)



Gambar 2.7 Mekanisme aksi hormon tiroid (Greenspan, 1994)

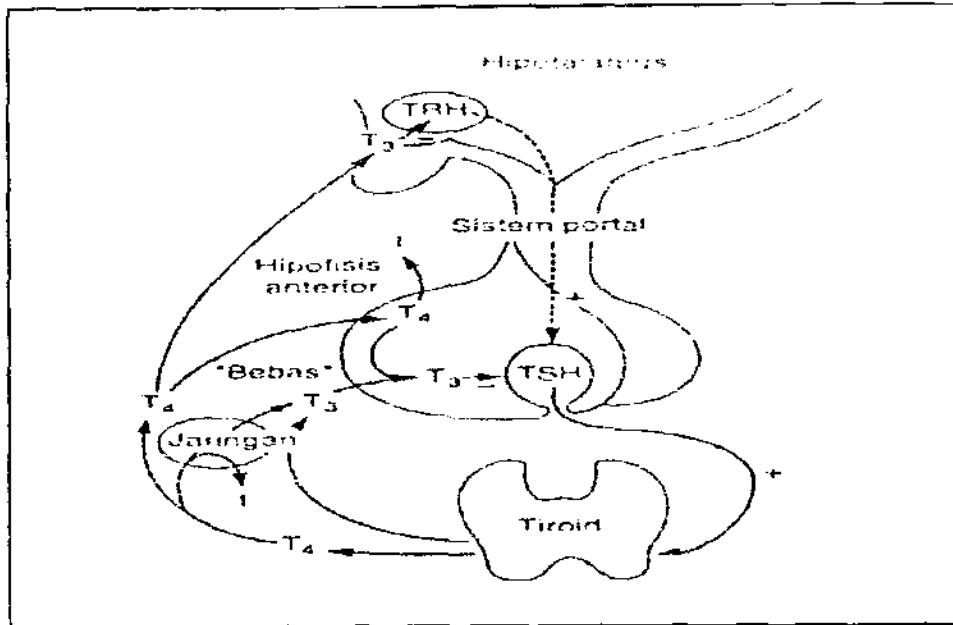
(Model perantara aksi T_3 oleh reseptor nuklear hormon tiroid. T_3 juga masuk sel (seperti digambarkan) atau diturunkan dari deiodinasi T_4 intraselular.

Interaksi nuklear antara T_3 -bound TR dan elemen responsif hormon tiroid (TRE) berakibat pada peningkatan atau penurunan aktivitas polimerase II RNA (pol II) pada gen responsif T_3 . TRE diindikasikan karena mengandung dua tempat setengah, dan TR dapat terikat sebagai dimer. Efek pada kadar mRNA diterjemahkan dalam peningkatan atau penurunan konsentrasi protein selular sehingga mempromosikan diferensiasi, proses metabolisme, dan efek sel spesifik lain dari T_3 . Tidak adanya T_3 , TR terikat TRE dapat menekan transkripsi basal. *c-erbA_{α2}* ("a2"), *non-T₃-binding splice variant*, dapat menghambat efek pengikatan- T_3 TRs oleh mekanisme yang belum diketahui, mungkin melibatkan pembentukan heterodimer atau bersaing untuk TRE. Mekanisme serupa mungkin untuk menjelaskan efek domain negatif dari onkoprotein v-erbA dan TRs termutasi)

Sistem pengendalian hormon tiroid adalah :

- a. *thyrotrophin releasing hormone* (TRH); hormon ini merupakan tripeptida dan disintesis oleh hipotalamus. TRH dikeluarkan melalui sistem hipotalamohipofiseal ke sel tiotrop hipofisis. TRH merangsang sekresi *thyroid stimulating hormone* (TSH).
- b. *thyroid stimulating hormone* (TSH); hormon ini merupakan glikoprotein yang terbentuk oleh dua subunit (alfa dan beta). TSH disekresi oleh sel tiotrop hipofisis, kemudian masuk sistem sirkulasi. Dalam sistem sirkulasi TSH mengikat reseptor di permukaan sel tiroid dan terjadilah efek hormonal.
- c. umpan balik sekresi hormon; hormon dalam bentuk bebas yang berefek umpan balik, seperti T_3 berefek pada tingkat hipotalamus dan hipofisis, sedangkan T_4 pada tingkat hipofisis.
- d. pengaturan di tingkat kelenjar tiroid sendiri; produksi hormon diatur oleh kadar yodium intra tiroid (Djokomoeljanto, 1996).

Pengaturan hormon tiroid ini dapat dilihat pada gambar 2.8 berikut .



Gambar 2.8 Sistem pengaturan hormon tiroid (Greenspan, 1994)

(Sumbu hipotalamus-hipofisis-tiroid. TRH dihasilkan di hipotalamus mencapai tirotrop di hipofisis anterior melalui sistem portal hipotalamus-hipofisis dan merangsang sintesis dan pelepasan TSH. Baik hipotalamus dan hipofisis, T_3 terutama menghambat sekresi TRH dan TSH. T_4 mengalami monodeiodinasi menjadi T_3 di neural dan hipofisis sebagaimana di jaringan perifer)

2.6.2 Hipermetabolisme akibat hormon tiroid

Hormon tiroid yang berlebihan dapat menyebabkan hipermetabolisme, sebagai contoh kasus tirotoksikosis yang dapat disertai hipertiroidisme atau tanpa hipertiroidisme. Hipertiroidisme dapat terjadi akibat fungsi kelenjar tiroid yang berlebihan. Sebagian besar kasus hipertiroidisme di Amerika Serikat disebabkan oleh penyakit Graves. Hipertiroidisme dapat menyebabkan pembesaran difus kelenjar tiroid dan produksi T_3 dan T_4 yang berlebihan (Granner, 2000).

Manifestasi hipermetabolisme melibatkan banyak sistem, dan pada pemeriksaan ditemukan gejala seperti penurunan berat badan meskipun selera makan meningkat, produksi keringat yang berlebihan, dan sensitivitas terhadap panas (Jameson & Weetman, 2001).

Pada sistem pernapasan (*respiratory system*) terjadi peningkatan proporsi ventilasi paru, sehingga meningkatkan ambilan oksigen. Di samping itu dihasilkan rangsangan energi metabolisme dan panas yang diwujudkan antara lain melalui peningkatan BMR, dan terjadi peningkatan sintesis dan degradasi protein, glukosa, trigliserida dan kolesterol tubuh (Larsen dkk., 1998). Panas yang dihasilkan dapat menyebabkan jejas sel, kerusakan membran, bahkan dapat pula terjadi peningkatan transisi katalitik ion logam, yang akan meningkatkan peroksidasi lipid pada sel di sekitarnya (Halliwell, 1991; Halliwell & Gutteridge, 1999).

Pada pemeriksaan laboratorium umumnya ditemukan peningkatan kadar T_3 dan T_4 dan penurunan kadar TSH (Jameson & Weetman, 2001). Tirotoksikosis yang disertai hipertiroidisme ditemukan kadar T_3 , T_4 lebih dari normal dengan rasio umumnya $T_3/T_4 < 20$ (Greenspan, 1994), dan kadar TSH sekitar $< 0,5$ dari kadar normal (pada manusia $< 0,2$ $\mu\text{U/ml}$) (Oppenheimer & Volpe, 1990).

Pemberian l-tiroksin dosis 1 mg/kg berat badan/hari selama 14 hari per oral (Kim dkk., 2001) pada *Rats* galur *Sprague-Dawley* atau 0,4 mg/100 g makanan selama 24 hari pada *Rats* galur *Wistar* dapat menyebabkan terjadinya hipermetabolisme (Seymen, 1997).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konseptual

Induksi l-tiroksin dapat menyebabkan terjadinya hipermetabolisme (Seymen dkk., 1997; Kim dkk., 2001) yang ditandai dengan peningkatan ambilan O_2 dan peningkatan metabolisme protein, glukosa, trigliserida dan kolesterol (Montgomery, 1983; Larsen dkk., 1998). Organisme aerobik memerlukan O_2 untuk menghasilkan ATP melalui fosforilasi oksidatif di mitokondria dan selanjutnya terjadi reduksi O_2 menjadi H_2O yang merupakan pengalihan empat elektron. Dalam keadaan tertentu pengalihan elektron tersebut kurang sempurna, sehingga terbentuk ROS (Suryohudoyo, 2000). Di samping itu, hipermetabolisme dapat menghasilkan panas, panas ini dapat mengakibatkan jejas sel yang selanjutnya menghasilkan ROS (Halliwell, 1991; Halliwell & Gutteridge, 1999).

ROS yang dapat berperan sebagai oksidan adalah hidrogen peroksida (H_2O_2), ion superoksida ($O_2^{\bullet-}$), radikal peroksil ($\bullet OOH$), radikal hidroksil ($\bullet OH$) dan singlet oksigen (O_2^1) (Suryohudoyo, 2000). ROS terbagi dua golongan, yaitu : (1) yang berbentuk radikal bebas dan (2) non radikal bebas. ROS yang berbentuk radikal bebas ini yang sangat berbahaya (Patellongi, 1999), karena memiliki elektron tak berpasangan yang mengakibatkan reaktivitasnya tinggi dan dapat mengubah suatu molekul menjadi suatu radikal (Suryohudoyo, 2000). ROS yang tergolong radikal bebas adalah $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OOH$ dan $\bullet OH$ (Pattelonggi, 1999; Halliwell & Gutteridge, 1999). Di antara radikal bebas tersebut $\bullet OH$ merupakan senyawa yang paling berbahaya, karena reaktivitasnya yang sangat

tinggi dan jika berlebihan dapat merusak asam lemak (asam lemak tak jenuh komponen membran sel), DNA (perangkat genetik sel) dan protein (enzim, reseptor, antibodi, matriks serta sitoskeleton) (Suryohudoyo, 2000).

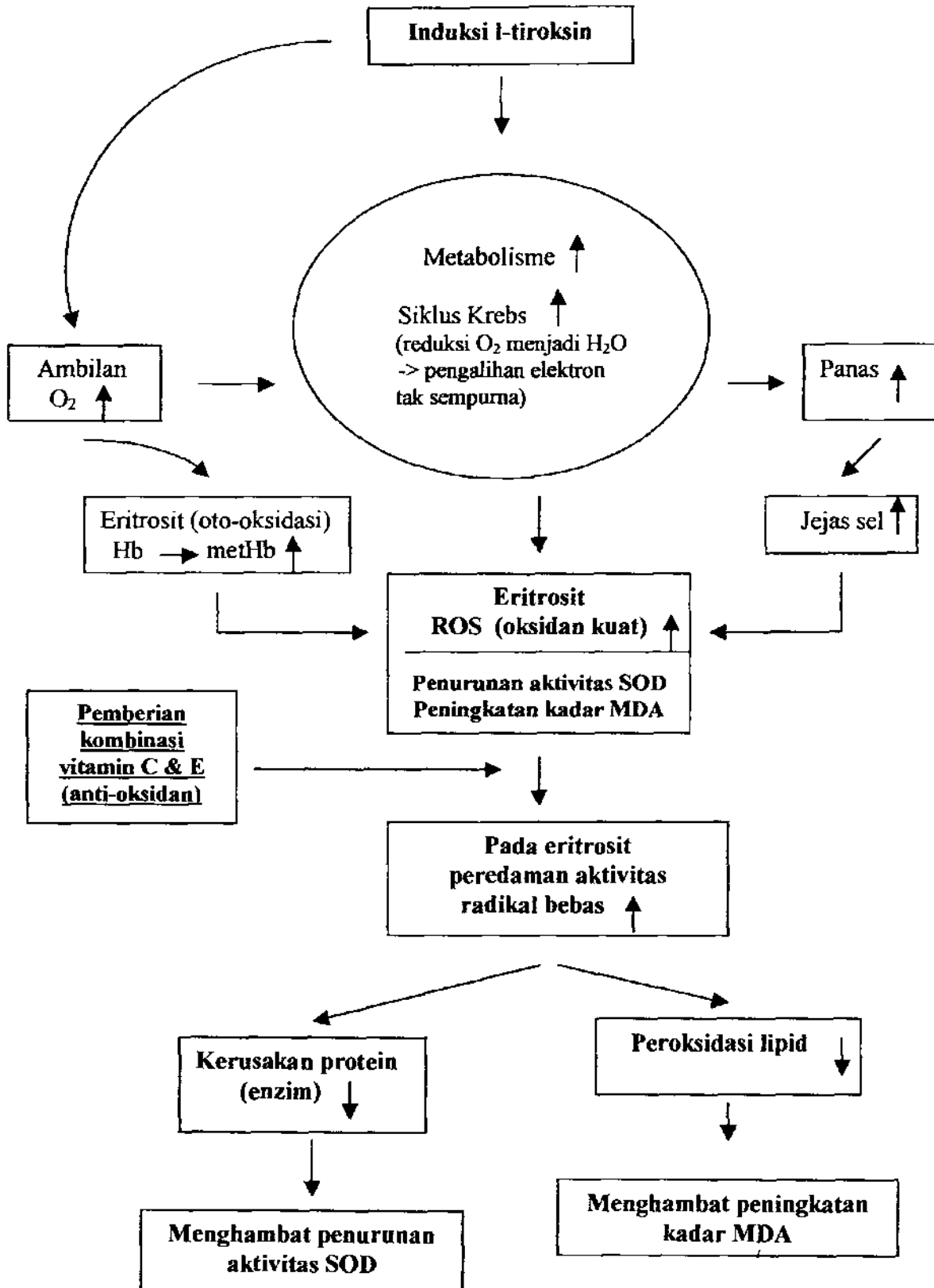
Komponen terpenting membran sel adalah fosfolipid, glikolipid dan kolesterol. Dua komponen pertama mengandung asam lemak tak jenuh (asam linoleat, linolenat, dan arakidonat) yang sangat rawan terhadap serangan radikal bebas, terutama $\bullet\text{OH}$ yang menimbulkan reaksi rantai yang dikenal dengan peroksidasi lipid (Suryohudoyo, 2000). Akibat akhir dari peroksidasi lipid adalah terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa toksik terhadap sel, antara lain *malondialdehyde* (MDA) (Prasetyo, 2001), sehingga MDA dapat dipakai sebagai petanda adanya aktivitas radikal bebas (Soeatmadji, 1998; Tavazzi, 2000; Setiati, 2001) yang kadarnya dapat dideteksi dari eritrosit (Harjanto, 2002) dengan metode TBA (Uchiyama & Mihara, 1978).

Anti-oksidan merupakan senyawa yang dapat meredam dampak negatif oksidan, dan berdasarkan mekanisme kerjanya anti-oksidan dapat dibagi menjadi dua yaitu : (1) anti-oksidan pencegah dan (2) anti-oksidan pemutus rantai (Soeatmadji, 1998). Anti-oksidan pencegah (*preventive anti-oxidants*), pada dasarnya merupakan anti-oksidan yang mencegah terjadinya radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$), yaitu radikal yang paling berbahaya. Anti-oksidan jenis ini, antara lain *superoxide dismutase* (SOD) (Suryohudoyo, 1997), yang aktivitasnya dapat hilang karena kerusakan struktur protein pembentuknya akibat aktivitas radikal bebas (Suryohudoyo, 2000). Aktivitas SOD dapat diukur dari eritrosit (Harjanto, 2002) dengan metode Wong dkk. (1989). Anti-oksidan pemutus rantai (*chain-breaking anti-oxidants*), pada dasarnya merupakan anti-oksidan yang dapat memutus reaksi rantai menjadi senyawa non radikal atau radikal yang lebih stabil,

termasuk anti-oksidan pemutus rantai antara lain tokoferol (vitamin E) dan asam askorbat (vitamin C) (Suryohudoyo, 1997). Vitamin C bekerja pada sitosol dan ekstrasel, sedangkan vitamin E bekerja pada membran sel dan tekanan O_2 yang tinggi (Suryohudoyo, 2000). Interaksi dan sinergis antara vitamin C dan E yang terjadi di tubuh diharapkan dapat meredam aktivitas radikal bebas (Mayes, 2000), sehingga kerusakan yang terjadi akibat aktivitas radikal bebas dapat dicegah.

Atas dasar tersebut, pada penelitian ini akan dilakukan pengaruh pemberian kombinasi vitamin C dan E hari ke-1 dan ke-4 terhadap aktivitas SOD dan kadar MDA eritrosit pada hipermetabolisme. Pada penelitian ini digunakan hewan coba yang dibuat menjadi hipermetabolisme dengan pemberian l-tiroksin selama 14 hari, hipermetabolisme diketahui dengan pemeriksaan kadar T_3 dan $T_4 >$ nilai normal, kadar TSH $< 0,5$ nilai normal, rasio kenaikan T_3 /kenaikan $T_4 < 20$, serta ambilan O_2 yang meningkat melalui pemeriksaan methemoglobin.

Bagan kerangka konseptual :



3.2 Hipotesis

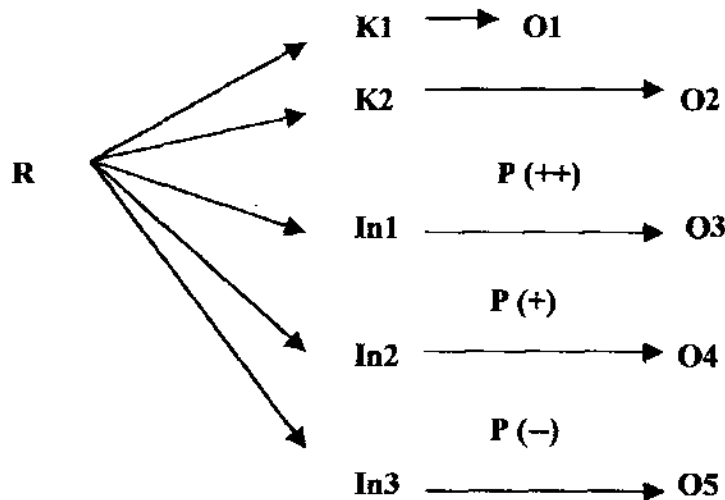
1. Pada *Rattus norvegicus* galur *Wistar* yang diinduksi l-tiroksin selama 14 hari pemberian kombinasi vitamin C dan E sejak hari ke-1 dapat menghambat peningkatan kadar MDA eritrosit.
2. Pada *Rattus norvegicus* galur *Wistar* yang diinduksi l-tiroksin selama 14 hari pemberian kombinasi vitamin C dan E sejak hari ke-4 dapat menghambat peningkatan kadar MDA eritrosit.
3. Pada *Rattus norvegicus* galur *Wistar* yang diinduksi l-tiroksin selama 14 hari pemberian kombinasi vitamin C dan E sejak hari ke-1 dapat menghambat penurunan aktivitas SOD eritrosit.
4. Pada *Rattus norvegicus* galur *Wistar* yang diinduksi l-tiroksin selama 14 hari pemberian kombinasi vitamin C dan E sejak hari ke-4 dapat menghambat penurunan aktivitas SOD eritrosit.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini tergolong jenis penelitian *eksperimental laboratorius* dengan menggunakan rancangan *The Separate Sample Pretest Posttest Control Group Design* (Campbell & Stanley, 1963). Secara skematis rancangan penelitian tersebut dapat digambarkan sebagai berikut.



Keterangan :

R	=	Randomisasi
K1	=	Kelompok kontrol pretest
K2	=	Kelompok kontrol posttest
In1	=	Kelompok pemberian vitamin C dan E selama 14 hari + diinduksi l-tiroksin
In2	=	Kelompok pemberian vitamin C dan E selama 10 hari + diinduksi l-tiroksin
In3	=	Kelompok tanpa pemberian vitamin C dan E (pemberian minyak kelapa dan aquadest) selama 14 hari + diinduksi l-tiroksin
O1	=	Aktivitas SOD atau kadar MDA pada kelompok pretest
O2	=	Aktivitas SOD atau kadar MDA pada kelompok posttest
O3	=	Aktivitas SOD atau kadar MDA pada kelompok In 1
O4	=	Aktivitas SOD atau kadar MDA pada kelompok In 2
O5	=	Aktivitas SOD atau kadar MDA pada kelompok In 3
P (++)	=	Pemberian vitamin C dan E sejak hari ke-1 s/d 14
P (+)	=	Pemberian vitamin C dan E sejak hari ke-4 s/d 14
P (-)	=	Pemberian minyak kelapa + aquadest sejak hari ke-1 s/d 14

4.2 Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

Populasi diambil dari tikus putih (*Rattus norvegicus*).

Sampel menggunakan *Rattus norvegicus* galur *Wistar* jenis kelamin jantan dewasa, umur 2,5 – 3,5 bulan, berat badan 125 – 225 gram dengan kondisi sehat fisik dari laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.

Besar sampel minimal ditentukan berdasarkan rumus Higgins dan Klinbaum (1985) yang dapat dilihat pada lampiran 1.

Teknik pengambilan sampel adalah secara random sampling dengan cara undian.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Klasifikasi variabel

a. Variabel bebas (independen)

1. Pemberian kombinasi vitamin C dan E
2. Induksi dengan l-tiroksin

b. Variabel tergantung (dependen)

1. Aktivitas SOD
2. Kadar MDA

c. Variabel terkontrol

1. Hewan coba : jenis, jenis kelamin, umur, berat badan, dan kesehatan fisik
2. Faktor lingkungan laboratorium untuk pemeriksaan.

4.3.2 Definisi operasional variabel

1. Pemberian kombinasi vitamin C dan E selama 14 hari pada kelompok tikus perlakuan (In 1) atau selama 10 pada kelompok tikus perlakuan (In 2) adalah

pemberian vitamin C yang diberikan adalah asam askorbat (vitamin C kadar 99,5% dari Fluka AG, Chemische Fabrik CH-9470 Buchs SG) dengan dosis 20 mg/kg berat badan/hari (Yunus, 2001) dan vitamin E yang diberikan adalah α -tokoferol (vitamin E kadar 98,0 - 102,0 % 8283 dari Merck) dengan dosis 400 mg/kg berat badan/hari (Ozturk dkk., 1997) melalui sonde.

2. Induksi dengan l-tiroksin selama 14 hari adalah induksi dengan dengan Euthyrox (l-tiroksin 100 μ g/tablet dari Merck) dengan dosis 1 mg/kg berat badan/hari (Kim dkk., 2001) melalui sonde pada kelompok tikus perlakuan dan tanpa perlakuan.
3. Kadar SOD adalah kadar SOD dari eritrosit yang ditentukan dengan protokol Wong dkk. (1989) dengan satuan unit/ml. Satu unit SOD dalam penelitian ini adalah aktivitas SOD yang menghambat reduksi NBT sebanyak 50 % pada kondisi percobaan.
4. Kadar MDA adalah kadar MDA dari eritrosit yang ditentukan dengan metode *thiobarbituric acid* (TBA) dari Uchiyama dan Mihara (1978) dengan satuan μ g/ml.
5. Keadaan fisik hewan coba : berbadan sehat yang ditandai dengan ciri-ciri : bermata jernih, kulit rambut putih bersih mengkilat, gerakan lincah/aktif, dan feses baik/tidak lembek (Sujari, 1996).
6. Faktor lingkungan laboratorium untuk pemeriksaan : selama penelitian hewan coba ditempatkan pada kandang dengan ukuran 20 cm x 30 cm x 40 cm, tiap kandang berisi 5 hewan coba, penyinaran cukup, dan udara keluar-masuk bebas.

4.4 Bahan Penelitian

a. Hewan coba

Rattus norvegicus galur *Wistar* dari Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, jenis kelamin jantan, umur 2,5 – 3,5 bulan, berat badan 125 - 225 g, dan dalam kondisi sehat fisik.

b. Bahan untuk perlakuan

1. Asam askorbat (kadar 99,5 % dari Fluka AG, Chemische Fabrik CII-9470 Buchs SG)
2. α -tokoferol (kadar 98,0 - 102,0 % 8283 dari Merck)
3. *Aquadest*
4. Minyak kelapa yang memiliki kandungan seperti yang terlihat pada lampiran 4. (Nio, 1992; Ketaren, 1986)

c. Bahan untuk induksi

Euthyrox (l-tiroksin 100 μ g/tablet dari Merck)

d. Bahan untuk pemeriksaan

d.1 Pemeriksaan aktivitas SOD

1. Larutan *xanthine* [10^{-7} M]
2. Larutan *xanthine oxidase* [0,1 U]
3. Larutan *buffer phosphate* [0,05 M dan pH = 7,4]
4. Larutan EDTA [0,05 M dan pH = 7,9]
5. Larutan *nitroblue tetrazolium* (NBT) [30 mg dalam 70 % *dimethyl formamide* (DMF)]
6. *Aquabidest*
7. Sampel : *whole blood*

d.2 Pemeriksaan kadar MDA :

1. *Trichloroacetic acid* (TCA) 100 %

2. *Hydrogen Chloride (HCl) 1 N*
3. *Natrium thiobarbituric 1 g%*
4. *Aquabidest*
5. *Sampel : whole blood*

4.5 Instrumen Penelitian

- a. Alat untuk pemberian aquadest, Asam askorbat, α -tokoferol, dan Euthyrox
Masing-masing dengan sonde terpisah
- b. Alat untuk menimbang berat badan hewan coba dan bahan
 1. *Neraca Ohaus*
 2. *Neraca Torbal*
- c. Alat pemeriksaan aktivitas SOD
 1. *Tabung reaksi*
 2. *Ependorf*
 3. *Waterbath*
 4. *Mikrosentrifugasi*
 5. *Transpipet*
 6. *Tip*
 7. *Kertas saring whatman 42*
 8. *Spektrofotometer*
- d. Alat pemeriksaan kadar MDA
 1. *Tabung reaksi*
 2. *Ependorf*
 3. *Waterbath*
 4. *Mikrosentrifugasi*
 5. *Vortex*
 5. *Transpipet*
 6. *Tip*
 7. *Kertas saring whatman 42*
 8. *Spektrofotometer*
 9. *Glass wool*

4.6 Prosedur Penelitian

a. Aklimatisasi hewan coba

Aklimatisasi hewan coba selama tujuh hari dalam kondisi laboratorium.

b. Hewan coba

Hewan coba dibagi lima kelompok, yaitu kelompok kontrol pretest (**K 1**), kelompok kontrol posttest (**K 2**), kelompok **In 1**, kelompok **In 2**, dan kelompok **In 3**.

Jumlah minimal hewan coba setiap kelompok ditentukan dengan rumus Higgins dan Klinbaum (1985), dapat dilihat pada lampiran 1.

Setiap hewan coba ditimbang berat badannya pada hari ke-1 dan 15.

Hewan coba kelompok **K 1** : setiap hewan coba pada kelompok ini hari pertama langsung dilakukan pengambilan sampel darah kemudian dilakukan pemeriksaan aktivitas SOD dan kadar MDA.

Hewan coba kelompok **K 2**, **In 1** dan **In 3**, serta **In 3** : setiap hewan coba pada kelompok masing-masing dilakukan pengambilan sampel darah kemudian dilakukan pemeriksaan aktivitas SOD dan kadar MDA pada hari ke-15.

Hewan coba kelompok **In 1** dan **In 2** :

1. Pemberian vitamin C : pemberian dilakukan dengan cara mengambil 30 mg vitamin C dilarutkan dengan 10 ml aquadest (3 mg Asam askorbat \approx 1 ml aquadest), kemudian setiap hewan coba dimasukkan vitamin C sesuai dosisnya ke saluran cerna melalui sonde. Kelompok **In 1** pemberian dimulai pada hari ke-1, sedangkan kelompok **In 2** hari ke-4.
2. Pemberian vitamin E : pemberian dilakukan dengan cara mengambil 1 g vitamin E dilarutkan dengan 5 ml minyak kelapa (100 mg α -tokoferol \approx 0,5 ml minyak

kelapa), kemudian setiap hewan coba dimasukkan vitamin E sesuai dosisnya ke saluran cerna melalui sonde. Kelompok **In 1** pemberian dimulai pada hari ke-1, sedangkan kelompok **In 2** hari ke-4.

2. Induksi l-tiroksin : pemberian dilakukan dengan cara menghancurkan tablet Euthyrox 100 μg , kemudian diambil sesuai dosis dilarutkan dalam 1,5 ml aquadest, lalu dimasukkan ke saluran cerna melalui sonde selama 14 hari. Pemberian dilakukan 2 jam sebelum pemberian kombinasi vitamin C dan E.

Hewan coba kelompok tanpa perlakuan : pemberian induksi l-tiroksin dilakukan dengan cara menghancurkan tablet, kemudian diambil sesuai dosis dilarutkan dalam 1,5 ml aquadest, lalu dimasukkan ke saluran cerna melalui sonde. Setelah 2 jam dilakukan pemberian aquadest 1,5 ml dan 0,5 ml minyak kelapa setiap hari ke saluran cerna melalui sonde selama 14 hari.

c. Preparasi sediaan eritrosit

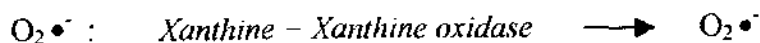
Sampel darah diambil dari jantung masing-masing hewan coba dengan spuit yang dibasahi heparin dan dimasukkan ke dalam botol yang berisi EDTA, kemudian diambil 1 ml untuk MDA dan 0,5 ml untuk SOD, kemudian disentrifugasi pada 3.000 rpm selama 10 menit pada temperatur ruangan, setelah itu eritrosit dibersihkan 4x dalam 3 ml larutan 0,9 % NaCl dan ditempatkan dalam pendingin (10-15 °C) sampai digunakan.

d. Pemeriksaan aktivitas SOD

Penentuan aktivitas SOD dengan cara mengukur aktivitas SOD menurut protokol yang dilakukan Wong dkk. (1989). Prinsip metode ini adalah :

1. bila *xanthine* direaksikan dengan *xanthine oxidase* akan membentuk radikal

bebas



2. superoksida ini dapat mereduksi NBT membentuk warna *formazan* yang mempunyai panjang gelombang 580 nm
3. SOD mampu menghambat $O_2 \bullet^-$ untuk mereduksi NBT, berdasarkan reaksi ini dapat ditentukan aktivitas SOD yang besarnya sesuai dengan kemampuannya menghambat reduksi NBT melalui kurva baku hambatan SOD terhadap $O_2 \bullet^-$ dalam mereduksi NBT.

e. Pemeriksaan kadar MDA

Konsentrasi MDA ditentukan dengan menggunakan metode TBA dari Uchiyama dan Mihara (1978). Prinsip metode ini adalah (1) pengaruh asam dan panas mempercepat dekomposisi lipid peroksida untuk membentuk MDA, (2) MDA direaksikan dengan TBA membentuk warna, perubahan warna ini diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 529 nm. Cara kerjanya sebagai berikut : penentuan λ maksimum, pembuatan kurva baku, lalu pengukuran MDA dari sampel.

4.7 Lokasi dan Waktu Penelitian

a. Lokasi penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya dan Laboratorium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

b. Waktu penelitian

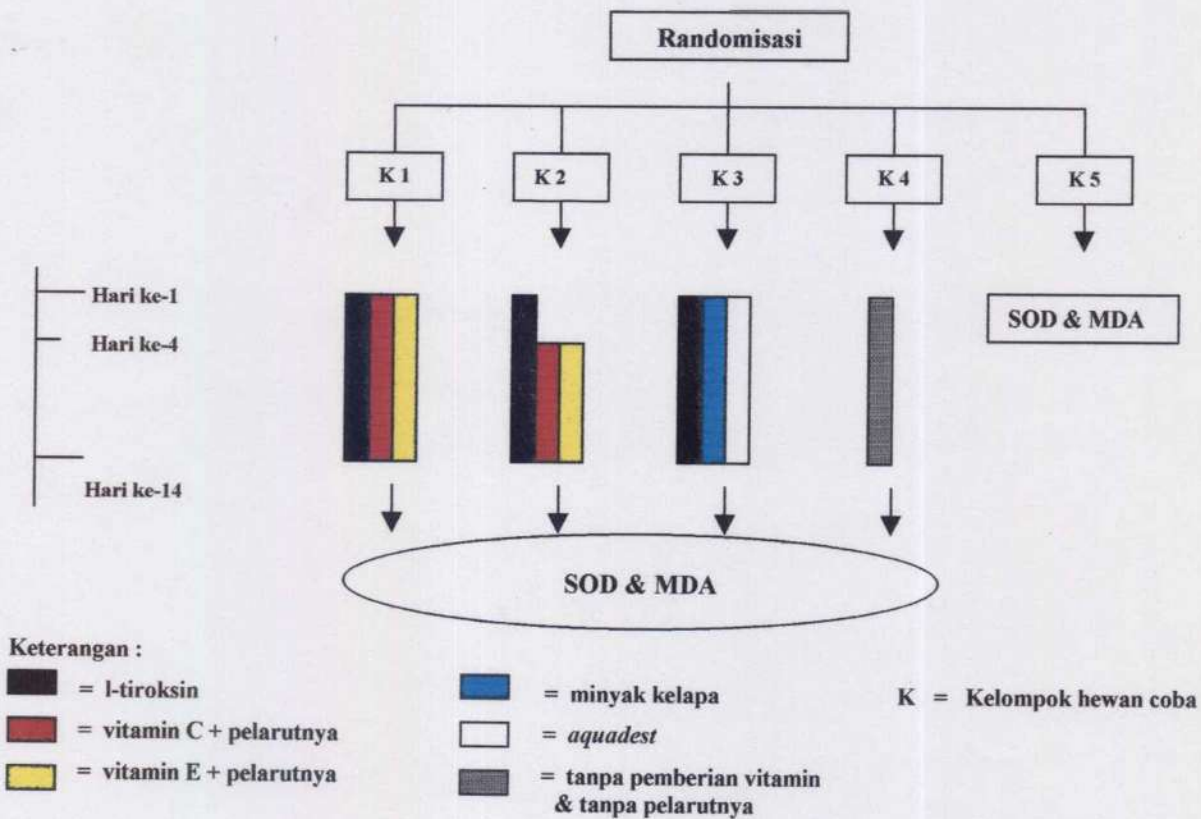
Penelitian dilaksanakan mulai dari Juni sampai dengan Agustus 2002.

4.8 Analisis Data

Data dipresentasikan dengan menghitung rata-rata \pm SD. Analisis statistik antara kelompok pada $\alpha = 0,05$ ditentukan dengan :

1. Deskriptif
2. Normalitas
3. Manova antara **K1** dengan **K2** untuk melihat maturitas
4. Menghitung ΔK antara **K1** dengan **K2**
5. Menghitung $\Delta P1$ antara **O3** dengan ΔK
6. Menghitung $\Delta P2$ antara **O4** dengan ΔK
7. Menghitung $\Delta P3$ antara **O5** dengan ΔK
8. Manova $\Delta P1$ ($\Delta P2$) antara **P1** dengan **P2**
9. Manova $\Delta P1$ ($\Delta P3$) antara **P1** dengan **P3**
10. Manova $\Delta P2$ ($\Delta P3$) antara **P2** dengan **P3**

Alur penelitian :



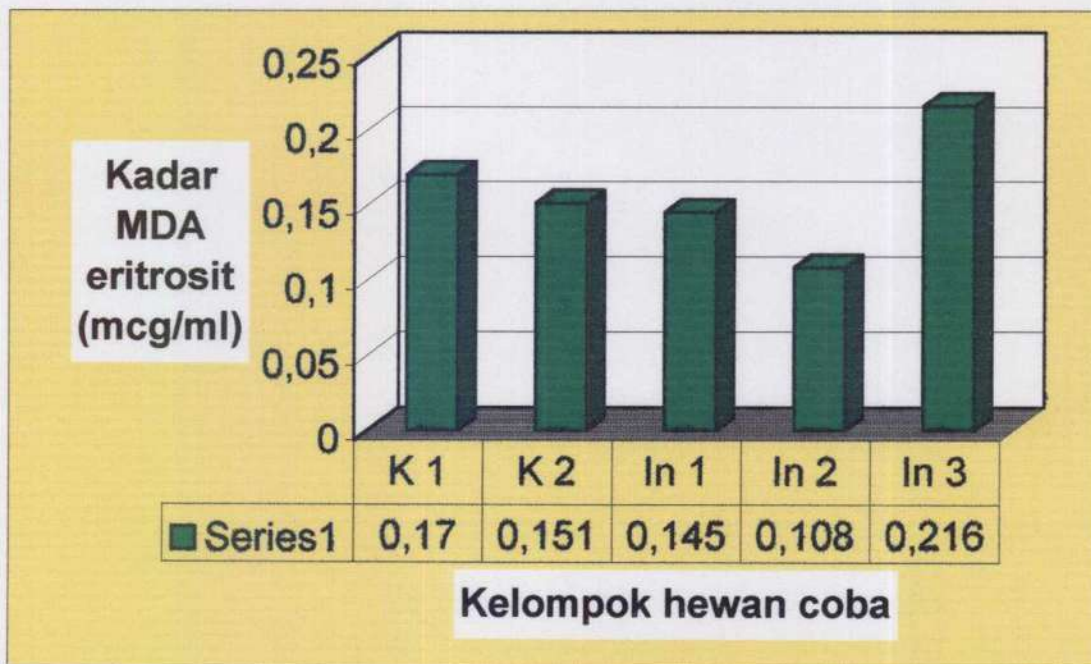
BAB 5

HASIL PENELITIAN

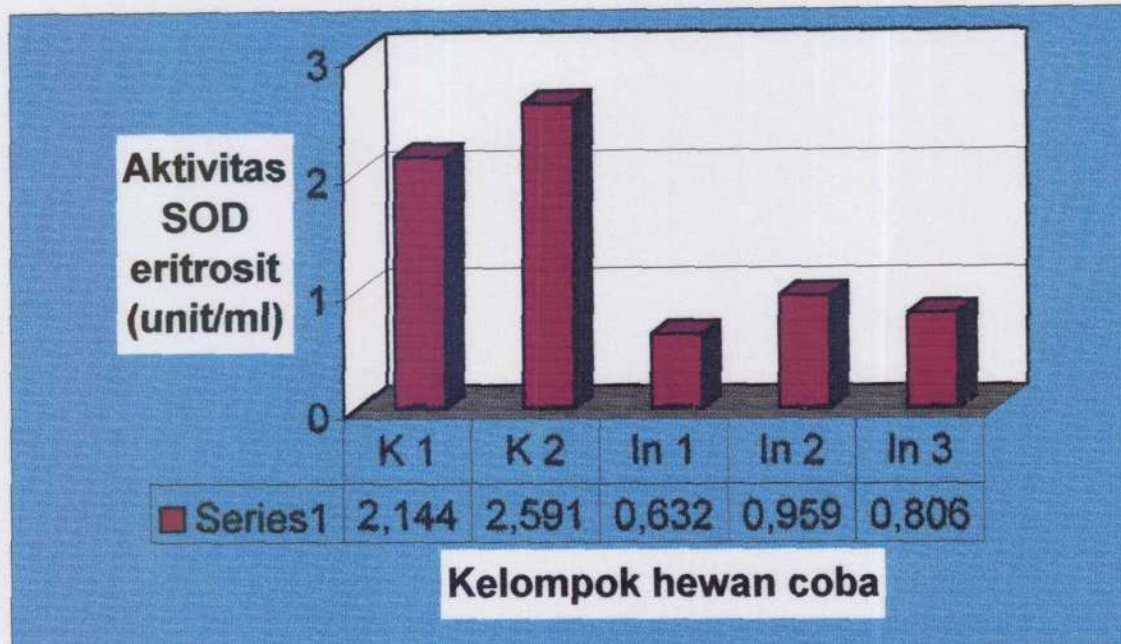
Data yang didapat dari hasil penelitian adalah aktivitas SOD eritrosit dan kadar MDA eritrosit yang dideskripsikan dan diuji dengan taraf signifikansi 5 % yang diolah dengan program SPSS V 10.

5.1 Hasil Uji Statistik Deskriptif

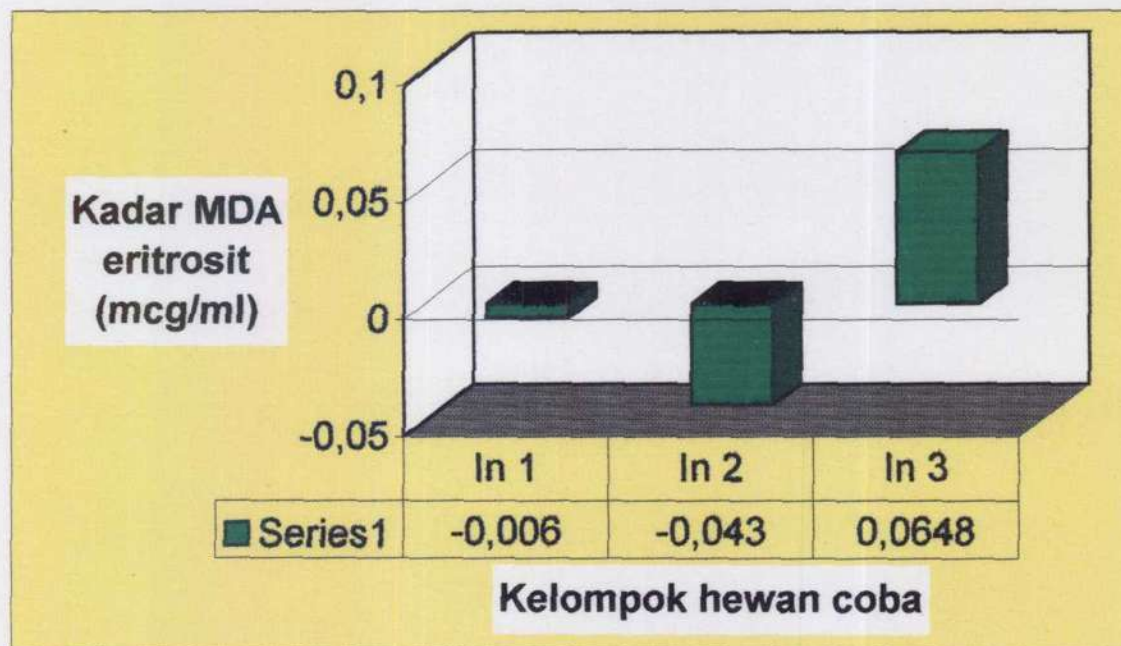
Data penelitian dianalisis secara deskriptif bertujuan untuk memperoleh gambaran distribusi dan memperjelas penyajian.



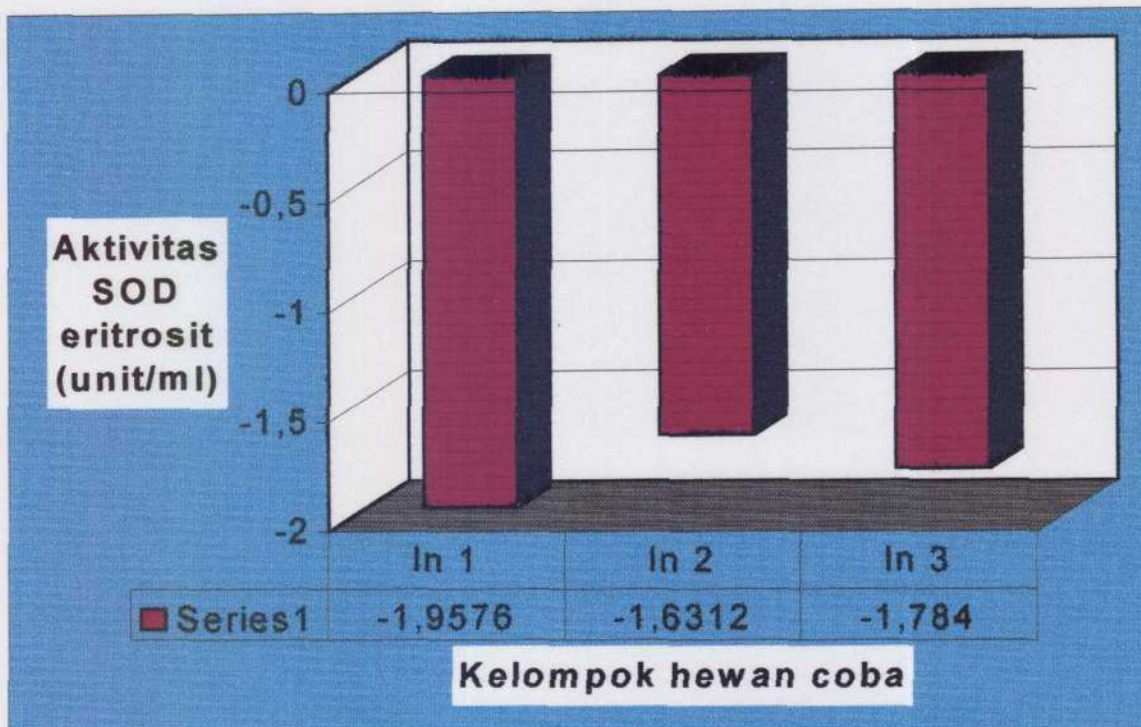
Gambar 5.1 Rata-rata kadar MDA eritrosit menurut kelompok



Gambar 5.2 Rata-rata aktivitas SOD eritrosit menurut kelompok



Gambar 5.3 Rata-rata perubahan kadar MDA eritrosit menurut kelompok



Gambar 5.4 Rata-rata perubahan aktivitas SOD eritrosit menurut kelompok

5.2 Hasil Uji Normalitas

Sebelum melakukan analisis hasil penelitian maka dilakukan uji persyaratan, yaitu uji normalitas distribusi.

Tabel 5.1 Hasil uji normalitas distribusi (uji *Kolmogorov-Smirnov*) variabel kadar MDA dan aktivitas SOD eritrosit

Kelompok	Variabel	K-S (Z)	Sig (2-tailed)
K 1	Kadar MDA	0,505	0,960
	Aktivitas SOD	0,525	0,946
K 2	Kadar MDA	0,532	0,940
	Aktivitas SOD	0,610	0,851
In 1	Kadar MDA	0,482	0,974
	Aktivitas SOD	0,495	0,967
In 2	Kadar MDA	0,728	0,664
	Aktivitas SOD	0,568	0,904
In 3	Kadar MDA	0,527	0,944
	Aktivitas SOD	0,516	0,953

Berdasarkan tabel 5.1 hasil uji didapatkan bahwa variabel kadar MDA dan aktivitas SOD berdistribusi normal pada semua kelompok ($p > 0,05$).

5.3 Hasil Uji *Univariate Test* Variabel Tergantung

Tabel 5.2 Hasil uji *univariate test* kadar MDA dan aktivitas SOD eritrosit antara kelompok

Variabel	F	P
Kadar MDA	1,128	0,372
Aktivitas SOD	45,114	0,000

Berdasarkan tabel 5.2 didapatkan bahwa antara kelompok pada kadar MDA tidak terdapat perbedaan yang bermakna $p = 0,372$ ($p < 0,05$), sedangkan pada aktivitas SOD terdapat perbedaan yang bermakna $p = 0,000$ ($p < 0,05$).

5.4 Hasil Uji *Pairwise Comparisons* Perubahan Variabel Tergantung

Tabel 5.3 Hasil uji *pairwise comparisons* perubahan kadar MDA dan aktivitas SOD eritrosit

Variabel	Kelompok	P
Kadar MDA	In 1 vs In 2	0,215
	In 2 vs In 3	0,003
	In 1 vs In 3	0,028
Aktivitas SOD	In 1 vs In 2	0,140
	In 2 vs In 3	0,474
	In 1 vs In 3	0,417

Berdasarkan tabel 5.4 diketahui bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada perubahan kadar MDA antara kelompok : In 2 dengan In 3 $p = 0,003$ ($p < 0,05$) dan In 1 dengan In 3 $p = 0,028$ ($p < 0,05$), sedangkan In 1 dengan In 2 tidak terdapat perbedaan yang bermakna $p = 0,215$ ($p < 0,05$). Pada perubahan aktivitas SOD antara kelompok tidak ada yang bermakna ($p < 0,05$).

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Hipermetabolisme

Pada penelitian ini dilakukan induksi dengan l-tiroksin yang bertujuan untuk membuat hewan coba menjadi hipermetabolisme. Hipermetabolisme dapat diketahui terjadi pada hari ke-4 melalui pemeriksaan T_3 , T_4 , TSH dan methemoglobin. Pada hasil pemeriksaan sampel tampak T_3 meningkat 37 ng/dl dan T_4 meningkat 10,8 $\mu\text{g/dl}$ serta TSH menurun 0,005 $\mu\text{IU/ml}$ (lampiran 5.), hal ini sesuai dengan pendapat Jameson & Weetman (2001). Jika dilakukan perhitungan maka diperoleh rasio kenaikan T_3 /kenaikkan $T_4 < 20$ dan TSH $< 0,5$ dari kadar normal (Greenspan, 1994). Hasil pemeriksaan methemoglobin terjadi peningkatan $1,1 \cdot 10^{-2} \%$ (lampiran 5) sesuai dengan pendapat Murray (2000) bahwa hipermetabolisme disertai peningkatan methemoglobin.

Gejala lain dari hipermetabolisme antara lain dapat ditunjukkan dengan terjadinya penurunan berat badan (Jameson & Weetman, 2001), dan pada hasil penelitian tampak terjadinya penurunan berat badan pada semua kelompok yang diinduksi-tiroksin. Penurunan berat badan diuji statistik pada taraf signikansi 5 % terlihat berbeda bermakna (lampiran 10) dan penurunan yang tertinggi ditemukan pada kelompok tanpa pemberian kombinasi vitamin C dan E. Antara kelompok pemberian kombinasi vitamin C dan E sejak hari ke-1 dengan ke-4 terlihat berbeda bermakna.

6.2 Kadar MDA Eritrosit

Pada penelitian ini diperiksa kadar MDA eritrosit sebagai indikator aktivitas radikal bebas (Soeatmadji, 1998; Tavazzi, 2000; Setiati, 2001). Pengukuran kadar MDA eritrosit merupakan cara pengukuran aktivitas radikal bebas secara tidak langsung, sebab yang diukur adalah produk dari reaksi radikal bebas, bukan pengukuran radikal bebas secara langsung (Yueniwati, 2000). MDA terbentuk dari peroksidasi lipid (*lipid peroxidation*) pada membran sel, yaitu reaksi radikal bebas (radikal hidroksil) dengan *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) (Suryohudoyo, 2000). Reaksi tersebut terjadi secara berantai, dan akibat akhir dari reaksi rantai tersebut akan terbentuk hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida tersebut dapat menyebabkan dekomposisi beberapa produk aldehyd yang bersifat toksik terhadap sel dan berbeda panjang rantainya, antara lain MDA, yang merupakan salah satu aldehyd utama yang terbentuk (Yueniwati, 2000).

Sampel pengukuran MDA pada penelitian ini adalah eritrosit, hal ini sesuai pendapat Harjanto (2002). Metodenya menggunakan metode *thiobarbituric acid* (TBA). Prinsip dari metode ini adalah terbentuknya kromogen yang diukur dengan spektrofotometer (Uchiyama & Mihara, 1978). Hasil yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan kurva baku MDA. Kurva baku tersebut telah diuji sehingga mempunyai sensitivitas dan *recovery* yang tinggi. Dengan demikian hasil pengukuran yang didapatkan valid dan dapat dipercaya (Yueniwati, 2000).

Hasil pengukuran MDA eritrosit pada penelitian ini memiliki data distribusi normal, dengan uji normalitas ($p > 0,05$). Karena itu, data-data tersebut dapat diolah lebih lanjut untuk menjawab hipotesis. Rata-rata kadar MDA eritrosit pada K 1 adalah $0,170 \mu\text{g/ml}$ dan K 2 adalah $0,151 \mu\text{g/ml}$. Kedua kadar tersebut membuktikan adanya efek maturasi

selama perlakuan (14 hari). Nilai standar deviasi **K 2** lebih tinggi dari rata-ratanya, hal ini menunjukkan masih terdapat presisi yang tinggi, sehingga perlu pengulangan pemeriksaan sampel untuk memperoleh presisi yang rendah (baik).

Hasil uji statistik deskriptif menghasilkan kadar rata-rata yang selanjutnya diuji dengan *Anova* menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna antara kelompok hewan coba $p = 0,372$ ($p < 0,05$), namun kelompok hewan coba yang memiliki kadar MDA tertinggi adalah **In 3** (kelompok tanpa pemberian vitamin C dan E).

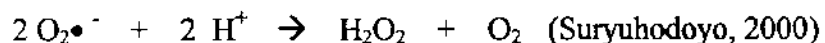
Untuk menjawab hipotesis digunakan uji *Anova* pada perubahan kadar MDA eritrosit. Perubahan ini diperoleh dari pengurangan rata-rata kadar MDA kelompok perlakuan atau tanpa perlakuan terhadap kelompok **K 2** (*control-post*). Hasil yang diperoleh terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok $p = 0,008$ ($p < 0,05$). Perubahan kadar MDA eritrosit kelompok **In 3** (kelompok tanpa perlakuan) adalah perubahan kadar MDA yang tertinggi, dan lebih tinggi dibandingkan kelompok **K 2**, sedangkan kelompok **In 1** (dengan pemberian vitamin C dan E sejak hari ke-1) dan **In 2** (dengan pemberian vitamin C dan E sejak hari ke-4) perubahan kadar MDA lebih rendah dibandingkan kelompok **K 2**. Dengan demikian pemberian vitamin C dan E dapat menghambat penurunan kadar MDA eritrosit.

Perbandingan hambatan penurunan rata-rata kadar MDA eritrosit untuk kelompok **In 2** lebih tinggi dibandingkan **In 1**, namun tidak berbeda bermakna $p = 0,215$ ($p < 0,05$). Dengan demikian pemberian vitamin C dan E sejak hari ke-4 lebih tinggi hambatan penurunan kadar MDA eritrosit dibandingkan sejak hari ke-1, walaupun tidak ada perbedaan yang bermakna.

6.3 Aktivitas SOD Eritrosit

Jaringan mengandung beberapa komponen antioksidan yang merupakan sistem pertahanan fisiologis terhadap stres oksidatif. Komponen antioksidan tersebut antara lain antioksidan enzimatik dan non enzimatik. Mekanisme kerja antioksidan enzimatik adalah merusak oksidan secara katalitik (enzim intraselular), menghambat reaksi rantai radikal bebas, dan menghasilkan produk yang menghambat autoksidasi (Yueniwati, 2000). Contoh antioksidan enzimatik antara lain SOD, katalase dan glutathion peroksidase (Halliwell & Gutteridge, 1999; Suryohudoyo, 2000).

SOD pada sitoplasma merupakan Cu-Zn-SOD (Halliwell, 1991). SOD dapat meredam terhimpunnya senyawa oksidan secara berlebihan, sehingga mekanisme kerjanya sebagai antioksidan pencegah (*preventive anti-oxidants*). Penimbunan $O_2^{\bullet -}$ dicegah oleh SOD yang mengkatalisis reaksi dismutasi $O_2^{\bullet -}$:



Pengukuran aktivitas SOD dapat dilakukan menurut protokol Wong dkk. (1989). Dasar teorinya adalah xantin direaksikan dengan xantin oksidase akan terbentuk radikal bebas superoksida ($O_2^{\bullet -}$). Superoksida ini dapat mereduksi NBT membentuk warna *formazan* yang mempunyai panjang gelombang 580 nm. SOD mampu menghambat $O_2^{\bullet -}$ dalam mereduksi NBT. Berdasarkan reaksi penghambatan tersebut ditentukan aktivitas SOD yang besarnya sebanding dengan kemampuan menghambat reduksi NBT dengan cara membandingkan terhadap kurva baku hambatan SOD terhadap $O_2^{\bullet -}$ dalam

mereduksi NBT. Metode yang digunakan ini mempunyai sensitivitas dan *recovery* yang tinggi sehingga hasil yang diperoleh valid dan dapat dipercaya.

Hasil pengukuran aktivitas SOD eritrosit pada penelitian ini menunjukkan data distribusi yang normal, sesuai dengan uji normalitas distribusi ($p > 0,05$). Karena itu, data tersebut dapat diolah lebih lanjut untuk menjawab hipotesis. Rata-rata aktivitas SOD eritrosit pada **K 1** adalah **2,1440 unit/ml** dan **K 2** adalah **2,5908 unit/ml**. Kedua kadar tersebut membuktikan adanya efek maturasi selama perlakuan (14 hari).

Hasil uji statistik deskriptif menghasilkan aktivitas rata-rata yang selanjutnya diuji dengan *Anova* menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna antara kelompok hewan coba $p = 0,000$ ($p < 0,05$). Kelompok yang memiliki aktivitas tertinggi adalah **K 2**.

Untuk menjawab hipotesis digunakan uji *Anova* pada perubahan aktivitas SOD eritrosit. Perubahan ini diperoleh dari pengurangan rata-rata aktivitas SOD kelompok **K 2** terhadap **In 1**, **In 2** atau **In 3**. Hasil yang diperoleh tidak ada perbedaan yang bermakna antara kelompok $p = 0,321$ ($p < 0,05$).

Perubahan aktivitas SOD eritrosit kelompok **In 3** (kelompok tanpa perlakuan) lebih tinggi dibandingkan perubahan aktivitas SOD kelompok **In 2** (kelompok dengan pemberian vitamin C dan E sejak hari ke-4), berarti ada pengaruh pemberian vitamin C dan E terhadap aktivitas SOD eritrosit dalam menghambat penurunan aktivitasnya, namun antara kelompok **In 3** dengan **In 2** tidak ada perbedaan yang bermakna $p = 0,474$ ($p < 0,05$), sehingga dapat dinyatakan bahwa ada kemungkinan pemberian vitamin C dan E sejak hari ke-4 menghambat penurunan aktivitas SOD eritrosit.

Perubahan aktivitas SOD eritrosit kelompok In 3 lebih rendah dibandingkan perubahan aktivitas SOD kelompok In 1 (kelompok dengan pemberian vitamin C dan E sejak hari ke-1), berarti tidak ada pengaruh pemberian vitamin C dan E terhadap aktivitas SOD eritrosit dalam menghambat penurunan aktivitasnya, bahkan mempertinggi penurunan aktivitasnya. Hal ini ada kemungkinan disebabkan antara lain :

1. tertimbunnya radikal vitamin C ($\text{Asc}\bullet^-$) secara berlebihan, ini dapat disebabkan :
 - a. pemberian vitamin E yang selanjutnya menghasilkan radikal vitamin E ($\text{Toc}\bullet$), $\text{Toc}\bullet$ akan dihilangkan secara fisiologis setelah bergeser ke arah permukaan molekul kemudian bereaksi dengan vitamin C (Asc-H) dan menghasilkan $\text{Asc}\bullet^-$:

$$\text{Toc}\bullet + \text{Asc-H}_2 \rightarrow \text{Toc-H} + \text{Asc}\bullet^- + \text{H}^+ \text{ (Suryohudoyo, 2000)}$$
 dan $\text{Asc}\bullet^-$ berlebihan akibat pemberian pada hari ke-1 dimana belum terjadi hipermetabolisme sedangkan reaksi dismutasi terhadap $\text{Asc}\bullet^-$ belum cukup meredamnya. $\text{Asc}\bullet^-$ yang berlebihan ini dapat bereaksi dengan SOD sehingga SOD dapat mengalami kerusakan.
 - b. hewan coba dapat mensintesis vitamin C (Mayes, 2000) ditambah pemberian dari luar sejak hari ke-1 dalam keadaan fisiologis, hal ini dapat meningkatkan kadar vitamin C yang berdampak peningkatan $\text{Asc}\bullet^-$ yang selanjutnya bereaksi dengan SOD, dan SOD mengalami kerusakan.
2. SOD tidak cukup kuat meredam radikal bebas yang terbentuk dari hipermetabolisme dan vitamin C karena kekurangan Cu, Zn atau kombinasinya. Menurut Halliwell (1991) SOD di sitoplasma eritrosit dapat bekerja dengan bantuan Cu dan Zn. Untuk itu, diperlukan juga suplemen Cu, Zn atau kombinasinya sehingga SOD dapat bekerja dengan optimal.

Berdasarkan analisis teori dan hasil uji statistik menunjukkan antara **In 3** dengan **In 1** tidak ada perbedaan yang bermakna $p = 0,417$ ($p < 0,05$), berarti dapat dinyatakan bahwa pemberian vitamin C dan E sejak hari ke-1 ada kemungkinan mempertinggi penurunan aktivitas SOD eritrosit.

Pemberian vitamin C dan E sejak hari ke-1 merupakan usaha preventif dan hari ke-4 merupakan usaha kuratif (pengobatan). Vitamin C dan E adalah antioksidan penting dalam usaha preventif dan kuratif (Blumberg, 2002). Menurut Traber (2002) vitamin E dapat digunakan sebagai usaha preventif terhadap penyakit kardiovaskular, kanker, katarak, dan fungsi imunitas. Vitamin C juga digunakan sebagai usaha preventif terhadap penyakit jantung, kolesterol yang tinggi, tekanan darah tinggi, infeksi saluran napas, kanker, radang tulang dan sendi, *obesitas*, katarak, penuaan, *diabetes*, *alzheimer*, *dementia*, dan sistem imunitas (Hart, 2002).

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasar data hasil penelitian ini, dapat disimpulkan :

1. Pada *Rattus norvegicus* galur *Wistar* yang diinduksi l-tiroksin selama 14 hari pemberian kombinasi vitamin C dan E sejak hari ke-1 dapat menghambat peningkatan kadar MDA eritrosit.
2. Pada *Rattus norvegicus* galur *Wistar* yang diinduksi l-tiroksin selama 14 hari pemberian kombinasi vitamin C dan E sejak hari ke-4 dapat menghambat peningkatan kadar MDA eritrosit.
3. Pada *Rattus norvegicus* galur *Wistar* yang diinduksi l-tiroksin selama 14 hari pemberian kombinasi vitamin C dan E sejak hari ke-1 tidak terbukti menghambat penurunan aktivitas SOD eritrosit.
4. Pada *Rattus norvegicus* galur *Wistar* yang diinduksi l-tiroksin selama 14 hari pemberian kombinasi vitamin C dan E sejak hari ke-4 tidak terbukti menghambat penurunan aktivitas SOD eritrosit.

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pengaruh dosis vitamin C dan E terhadap kadar MDA dan aktivitas SOD eritrosit pada kasus hipermetabolisme, karena pada penelitian ini hanya diberikan pada dosis fisiologis per hari.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pengaruh vitamin C dan E terhadap kadar glutathion tereduksi (GSH) dan aktivitas glutathion peroksidase (GSHPx) pada kasus hipermetabolisme, karena GSH merupakan salah satu senyawa penting peredam radikal hidrosil yang sangat berbahaya, dan GSHPx merupakan salah satu enzim yang

- penting dalam peredam radikal hidroksil yang sangat berbahaya.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pemberian logam tambahan (Cu ,Zn atau kombinasinya) yang diberikan bersama vitamin C dan E pada kasus hipermetabolisme, karena Cu dan Zn merupakan logam yang sangat mempengaruhi aktivitas SOD pada sitoplasma eritrosit *Rattus norvegicus* galur *Wistar*.
 4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pengaruh antioksidan alami terhadap kadar MDA dan aktivitas SOD eritrosit pada kasus hipermetabolisme, karena pada penelitian ini hanya dilakukan pemberian vitamin C dan E sintesis.

DAFTAR PUSTAKA

- Brownie AC, Kernohan JC, 1999. Churchill's mastery of medicine biochemistry. Edinburgh Churchill Livingstone, pp 70-92.
- Bast A, Haenen GRMM, Doelman CJA, 1991. Oxidants and antioxidants : state of the art. *The American Journal of Medicine* 91 (suppl 3C) : 2S-13S.
- Blumberg J, 2002. Unraveling the conflicting studies on vitamin E and heart disease. *The Linus Pauling Institute : Oregon State University*, pp 1-3.
- Campbell DT, Stanley JC, 1963. *Experimental and quasi-experimental designs for research*. Chicago : Rand McNally College Publishing Company, pp 55.
- Conhrane CG, 1991. Cellular injury by oxidants. *The American Journal of Medicine* 91 (suppl 3C) : 23S-30S.
- Diplock AT, 1997. The safety of β -carotene and the antioxidant vitamin C and E. In (Garewal HS, editor). *Antioxidants and Diseseae Prevention*. New York : CRC Press, pp 3-17.
- Djokomoeljanto R, 1996. Kelenjar tiroid embriologi, anatomi dan faalnya. Dalam (Noer S, editor). *Ilmu Penyakit Dalam, edisi III jilid 1*. Jakarta : Balai Penerbit FKUI, hlm. 725-733.
- Ganong WF, 1999. *Review of medical phisiology, 19th edition*. Connecticut : Appleton & Lange Stamford, pp 493-521.
- Gilbert HF, 2000. *Basic concepts in Biochemistry, 2nd edition*. New York : McGraw-Hill, pp 173-182.
- Goodman S, 1995. Ester-C vitamin generasi III. Jakarta : Gramedia Pustaka Utama, hlm 11-29.
- Granner DK, 2000. Thyroid hormones. In (Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, eds). *Harper's Biochemistry, 25th edition*. New York : McGraw-Hill, pp 561-566.
- Greenspan FS, 1994. Kelenjar tiroid. Dalam *Endokrinologi Dasar & Klinik, edisi 4*, Penerjemah : Wijaya C, Maulany RF, Samsudin S. EGC, Jakarta hlm 206-289.
- Halliwell B, 1991. Reactive oxygen species in living systems : source, biochemistry, and role In human disease. *The American Journal of Medicine* 91 (suppl 3C) : 14S-22S.

- Halliwell B & Gutteridge JMC, 1999. Free radicals in biology and medicine, 3rd edition. New York : Oxford University Press.
- Harjanto, 2002. Permasalahan pemeriksaan senyawa radikal di dalam tubuh. Seminar IAIF. Surabaya : IAIF Cabang Surabaya.
- Hart JA, 2002. Vitamin C (ascorbic acid). A.D.A.M. Inc, pp 1-13.
- Higgins JE, Klinbaum AP, 1985. Determinating sample size in introduction to randomized clinical trials. In (Higgins JE, editor). USA : Family Health International, pp 24-35.
- Jameson JL, Weetman AP, 2001. Disorders of the thyroid gland. In (Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, eds). Harrison's Principles of Internal Medicine, 15th edition. New York : McGraw-Hill, pp 2060-2084.
- Kanter MM, 1998. Nutritional antioxidants and physical activity. In (Wolinsky I, editor). Nutrition in Exercise and Sport, 3rd edition. New York : CRC Press, pp 245-255.
- Ketaren S, 1986. Pengantar teknologi minyak dan lemak pangan. Jakarta : UIP, hlm 303.
- Kim DS, Lee CB, Park YS, Ahn YH, Kim TW, Kee CS, Kang JS, & Om AS, 2001. Effect of thyroid hormone on the alcohol dehydrogenase activities in rat tissues. J Korean Med Sci 16 : 313-316.
- Koentjahja HC, 2001. Change of body weight and response of tracheal smooth muscle of adult guinea pigs due to chronic exposure to cigarette smoke and supplementation of vitamin C. J Respir Indo 21 (1) : 17-23.
- Larsen PR, Davies TF, Hay ID, 1998. Thyroid gland. In (Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR, eds). Williams Textbook of Endocrinology, 9th edition. Philadelphia : W.B. Saunders Company, pp 389-515.
- Machlin LJ, 1991. Vitamin E. In (Machlin LJ, editor). Handbook of Vitamins, 2nd edition. New York : Marcel Dekker, pp 99-144.
- Mayes PA, 2000. The citric acid cycle : the catabolism of acetyl-coa. In (Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, eds). Harper's Biochemistry, 25th edition. New York : McGraw-Hill, pp 182-189.
- Mayes PA, 2000. Structure and function of the water-soluble vitamins. In (Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, eds). Harper's Biochemistry, 25th edition. New York : McGraw-Hill, pp 627-641.

- Mayes PA, 2000. Structure and function of the lipid-soluble vitamins. In (Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, eds). Harper's Biochemistry, 25th edition. New York : McGraw-Hill, pp 627-641.
- Moran JP, Cohen L, Greene JM, Xu G, Feldman EB, Hames CG, Feldman DS, 1997. Plasma ascorbic acid concentrations relate inversely to blood pressure in human subject. *Am J Clin Nutr* 57 : 213-217.
- Mostafa T, Anis TH, El-Nashar A, Imam H, Othman IA, 2001. Varicocelelectomy reduces reactive oxygen species levels and increases antioxidant activity of seminal plasma from infertile men with varicocele. *International journal of andrology* 24 : 261-265.
- Murray RK, 2000. Red and white blood cells. In (Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, eds). Harper's Biochemistry, 25th edition. New York : McGraw-Hill, pp 763-779.
- Nio OK, 1992. Daftar analisis bahan makanan. Jakarta : FKUI, hlm 34.
- Noguchi N, Niki E, 1999. Chemistry of active oxygen species and antioxidants. In (Papas AM, editor). *Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health*. London : CRC Press, pp 3-20.
- Oppenheimer JH, Volpe R, 1989. Measurement of thyroid function. In (Burrow GN, Oppenheimer JH, Volpe R, eds). *Thyroid Function & Disease*. Philadelphia : WB Saunders Company, pp 124 – 139.
- Ozturk HS, Kavutcu M, Kacmaz M, Canbolat O, Durak I, 1997. The effects of gentamicin on the activities glutation peroxidase and superoxide dismutase enzymes and malondialdehyde levels in heart tissues of guinea pigs. *Current Medical Research and Opinion* 14 (1) : 47-52.
- Palek J, 1995. The red cell membran in williams hematology, 5th edition. Singapore : McGraw-Hill Inc, pp 406-417.
- Papas AM, 1999. Vitamin E : tocopherols and tocotrienols. In (Papas AM, editor). *Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health*. London : CRC Press, pp 189-210.
- Patellongi I, 1999. Pengaruh intensitas latihan fisik terhadap kerusakan jaringan. Disertasi, Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya.
- Prasetyo, A. 2002. Pengaruh pemberian stresor epinefrin terhadap fragilitas osmotik eritrosit tikus strain wistar. Tesis, Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Rumsey SC, Wang Y, Levine M, 1999. Vitamin C. In (Papas AM, editor). *Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health*. London : CRC Press, pp 159-187.

- Saunders BD, Trapp RG, 1994. *Basic & clinical biostatistics*, 2nd edition. Connecticut : Appleton & Lange, pp 99-142.
- Setiati S, Rahardjop TB, Oemardi M, Istanti R, 2001. The effect of caloric restriction during Ramadan fasting on free radical status among elderly patients. *Majalah Kedokteran Indonesia* 51 (8) : 293-298.
- Seymen O, Seven A, Candan G, Yigit G, Hatemi S, Hatemi H, 1997. The effect of iron supplementation on GSH levels, GSH-Px, and SOD activities of erythrocytes in l-thyroxine administration. *Acta Med Okayama* 51 (3) : 129-133.
- Sies H, 1991. Oxidative stress : from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine* 91 (suppl 3C) : 31S-38S.
- Siregar P, 1992. Metabolit oksigen radikal bebas dan kerusakan jaringan. *Cermin Dunia Kedokteran edisi khusus* 80 : 112-115.
- Soeatmadji DW, 1998. Free radicals and diabetes mellitus : clinical applications. In (Tjokroprawiro A, Hendromartono, Sutjahjo A, Tandra H, Pranoto A, Murtiwi S Adi S, eds). *Surabaya Diabetes Update – IV*. Surabaya : Pusat Diabetes dan Nutrisi RSUD dr. Soetomo-FK Unair, pp 23-43.
- Stryer L, 1988. *Biochemistry*, 3th edition. New York : W.H. Freeman and Company, pp 397-426.
- Sujari, 1996. Tikus wistar sebagai hewan coba untuk penelitian dengan toksoid tetanus. *Majalah Kedokteran Unibraw XII* (3).
- Suryohudoyo P, 1997. Toksisitas ozon. *Folia Medica Indonesiana XXXIII Okt – Des* : 22-28.
- Suryohudoyo P, 2000. *Kapita selekta ilmu kedokteran molekuler*. Jakarta : Sagung Seto, hlm 31-47.
- Tavazzi B, Pierro DD, Amorini AM, Fazzina G, Tuttobene M, Giardina B, Lazzarino G, 2000. Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress. *Eur J Biochem* 267 (3) : pp 684-689.
- Traber MG, 2001. *Vitamin E*. The Linus Pauling Institute : Oregon State University, pp 1-9.
- Uchiyama M, Mihara M, 1978. Determination of malondialdehyde precursor in tissues by Thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86 : 271-278.

- Vassart G, Dumont JE, Refetoff S, 1995. Thyroid disorders. In (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7th edition. New York : McGraw-Hill, pp 2883-2928.
- Widjaja K, 1999. Pemberian kombinasi anti-oksidan vitamin E dan vitamin C untuk mencegah nekrosis sel parenkim hati. *Majalah Kedokteran Berkala* 31 (4) : 213-220.
- Wijaya C, Maulany RF, Samsudin S, 1998. Kelenjar tiroid. Dalam (Kartini A, Mandera LI, Sadikin V, editors). *Endokrinologi Dasar & Klinik*, edisi 4. Jakarta : EGC, hlm 206-289.
- Wirya IW, 2002. Pemberian suplemen kompleks antioksidan pada pelari *sprint* 200 meter untuk menurunkan kadar laktat darah. *Majalah Kedokteran Indonesia* 52 (1) : 7-10.
- Wong GHW, 1989. Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* 58 : 923-931.
- Yueniwati Y, 2000. Pengaruh paparan asap rokok kretek terhadap aktivitas radikal bebas mikrosom hepar yang menginduksi *cytochrome* P450 1A1. Tesis, Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya.
- Yunus, M, 2001. Pengaruh vitamin C terhadap pencegahan kerusakan membran eritrosit tikus wistar akibat latihan aneorobik. Tesis, Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya.

Lampiran 1

Penentuan Jumlah Sampel

Penentuan jumlah sampel minimal berdasarkan rumurs Higgins & Klinbaum (1985) :

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

- dimana :
- n = Besarnya sampel
 - Xt = Nipura kelompok eksperimen
 - Xc = Nipura kelompok kontrol
 - Sc = Simpangan baku kelompok kontrol
 - f = Proporsi yang gagal (drop out)
 - Z α = 1,65 (α = 0,05)
 - Z β = 1,28 (β = 0,10)

Berdasarkan penelitian pendahuluan Edyson pada tahun 2002 untuk aktivitas SOD diperoleh data : Xc = 2,59 , Xt = 0,96 , dan Sc = 0,14

Besar sampel (n) diperoleh bila f = 0 adalah 0,13 , bila f = 0,5 (50 %) maka n = 0,25 , dibulatkan menjadi 1 ekor tikus setiap kelompok.

Besar sampel minimal setiap kelompok adalah 5 ekor tikus.

Berdasarkan penelitian pendahuluan Edyson pada tahun 2002 untuk kadar MDA diperoleh data : Xc = 0,15 , Xt = 0,11 , dan Sc = 0,16

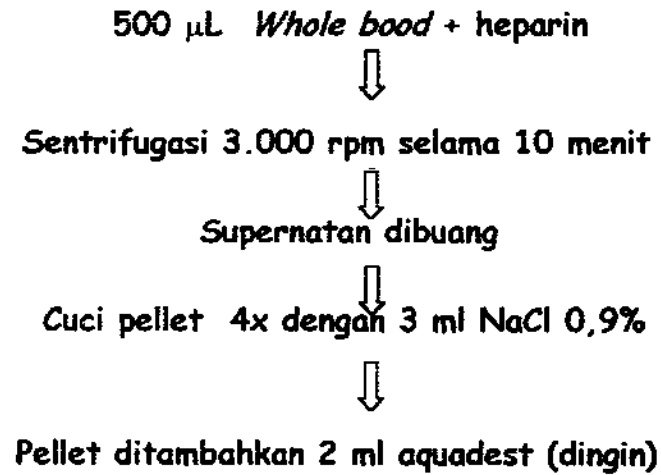
Besar sampel (n) diperoleh bila f = 0 adalah 274,72 , bila f = 0,5 (50 %) maka n = 549,43 , dibulatkan menjadi 550 ekor tikus setiap kelompok.

Dicoba dengan 5 ekor tikus sudah ditemukan perbedaan yang bermakna.

Besar sampel minimal setiap kelompok adalah 5 ekor tikus.

Lampiran 2

**Prosedur Pemeriksaan Aktivitas SOD Eritrosit
(Wong dkk., 1989)**

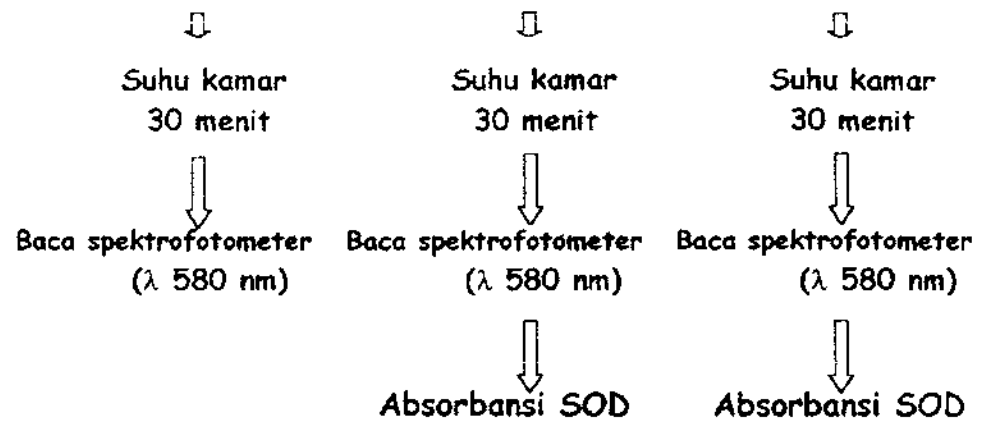


Bahan	Tabung 1 (Blanko)	Tabung 2 (Sampel mereduksi) tak	Tabung 3 (Sampel mereduksi)
EDTA	30 μ l	30 μ l	30 μ l
Buffer fosfat	1000 μ l	1000 μ l	1000 μ l
H ₂ O	2970 μ l	1770 μ l	1760 μ l
Xanthine	—	100 μ l	100 μ l
Xanthine oxidase	—	100 μ l	100 μ l
NBT	—	—	10 μ l
Sampel	—	1000 μ l	1000 μ l

↓
 Inkubasi 30 °C
 selama 10 menit

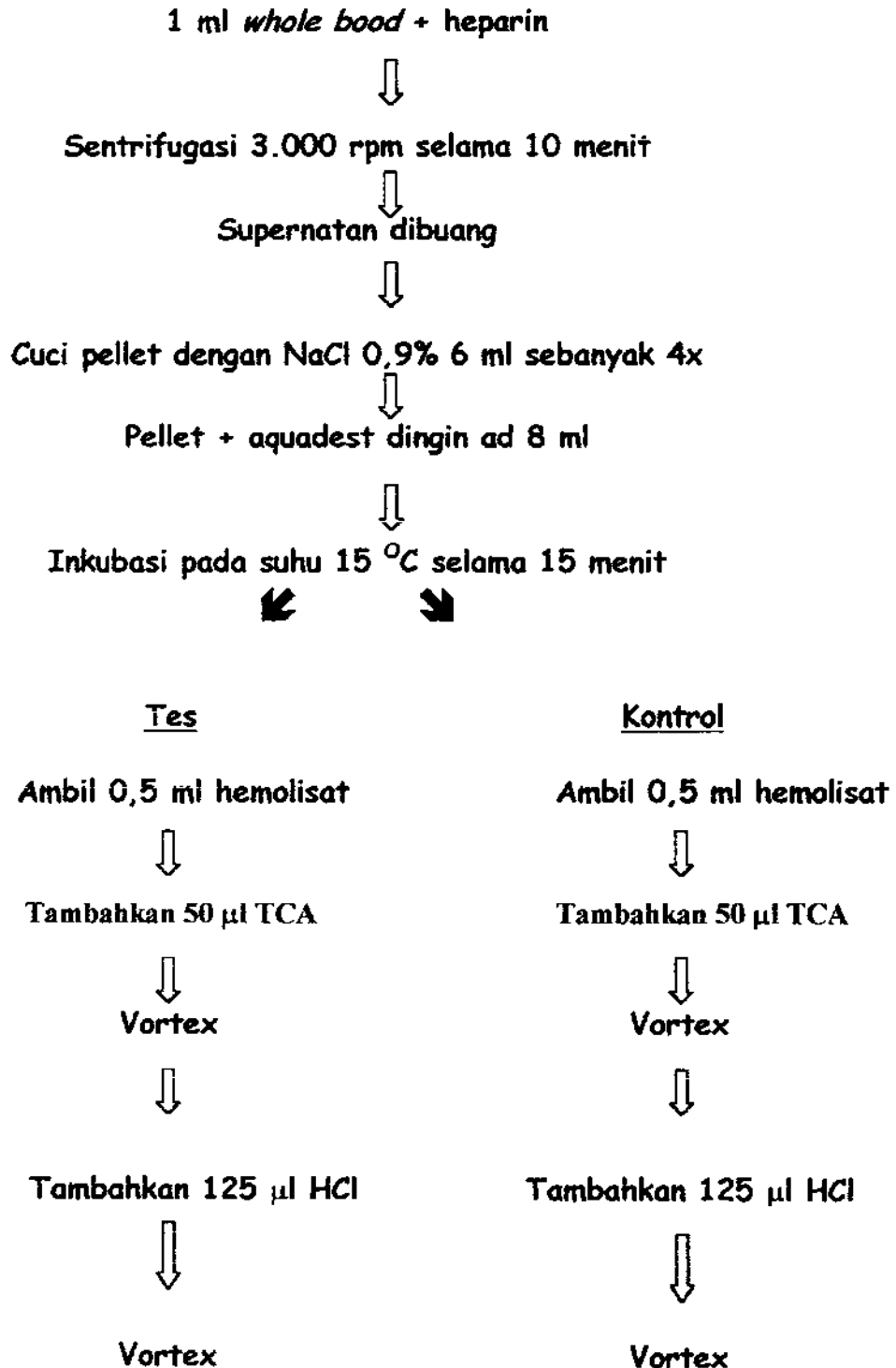
↓
 Inkubasi 30 °C
 selama 10 menit

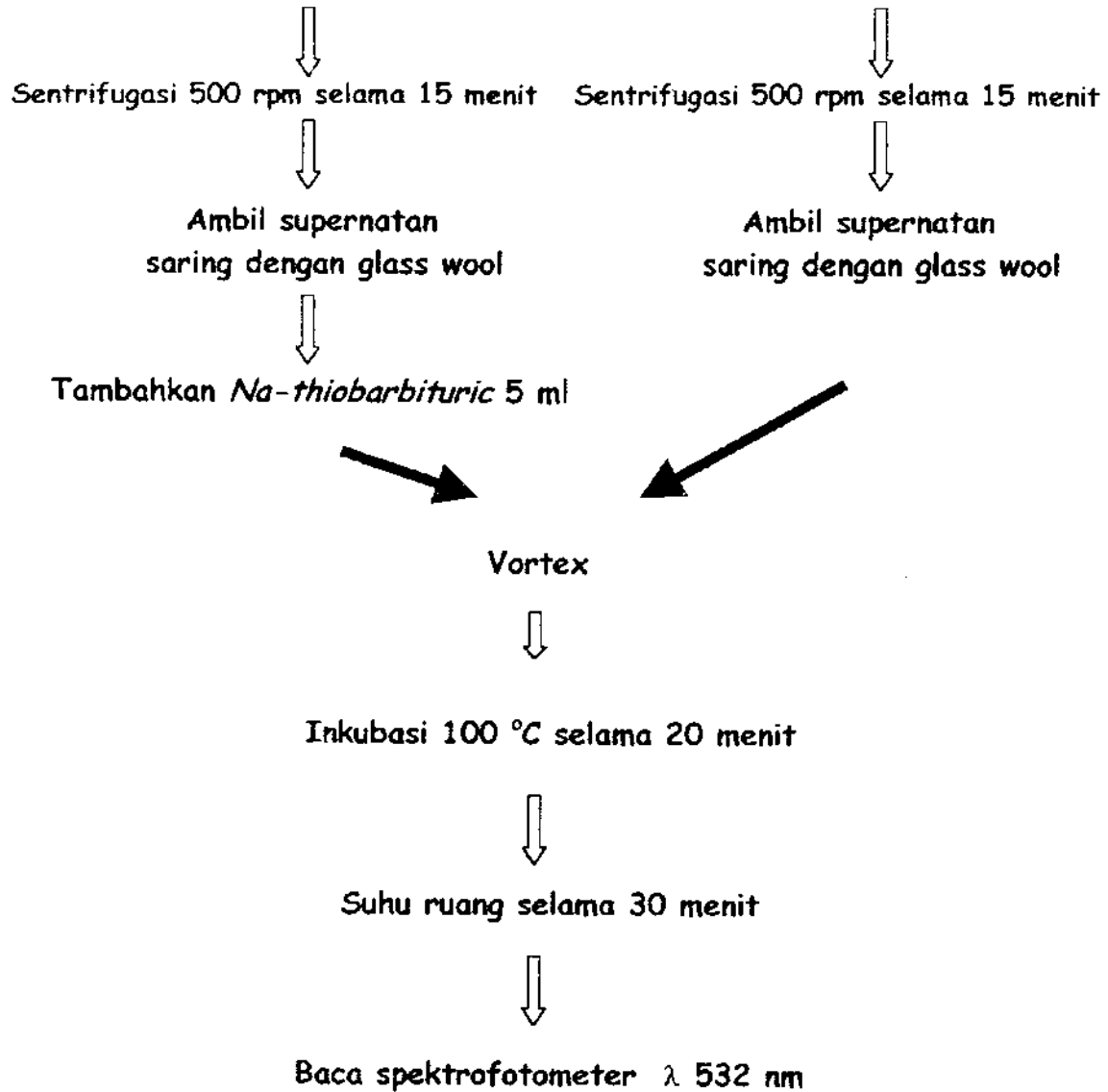
↓
 Inkubasi 30 °C
 selama 10 menit



Lampiran 3

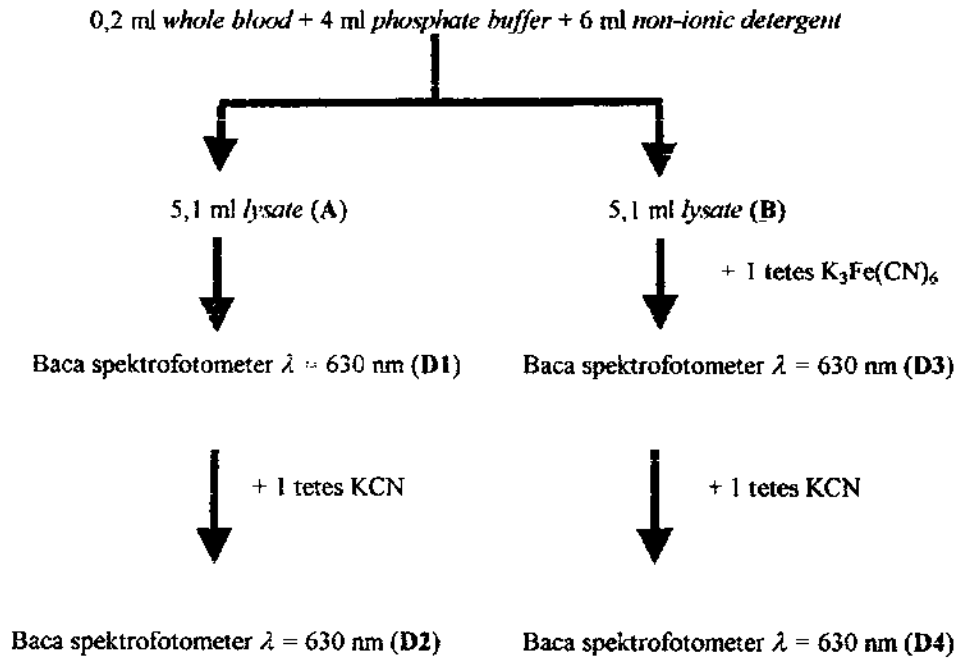
Prosedur Pemeriksaan Kadar MDA Eritrosit (Uchiyama & Mihara, 1978)





Lampiran 4

Prosedur Pemeriksaan Methemoglobin Metode Evelyn & Malloy (Dacie, J.V. & Lewis, S.M., 1991. *Practical haematology* 7th ed. Churchill Livingstone)



Blanko = 4 ml *phosphate buffer* + 6 ml *non-ionic detergent*

Perhitungan :

$$\text{Methemoglobin (\%)} = \frac{(\text{D1} - \text{D2})}{(\text{D3} - \text{D4})}$$

Lampiran 5**Hasil Pemeriksaan T₃, T₄, TSH dan Methemoglobin pada Sampel**

No.	Pemeriksaan	Hari ke-1	Hari ke-4	Selisih
1.	Methemoglobin	$6,50 \cdot 10^{-3} \%$	$1,75 \cdot 10^{-2} \%$	$+ 1,10 \cdot 10^{-2} \%$
2.	T₃	58 ng/dl	95 ng/dl	+ 37 ng/dl
3.	T₄	2,6 ug/dl	13,4 ug/dl	+ 10,8 ug/dl
4.	TSH	0,011 uIU/ml	0,006 uIU/ml	- 0,005 uIU/ml

Keterangan : + = meningkat
- = menurun

T₃, T₄ dan TSH diperiksa pada Lab. Klinik Utama "Pramita" Surabaya

Lampiran 6

Kandungan Minyak Kelapa

No.	Kandungan	Jumlah
1.	Bagian yang dapat dimakan	100 %
2.	Energi	886 Kal 3741 KJ
3.	Air	0 g
4.	Protein	1 g
5.	Lemak	98 g
6.	Karbohidrat	0 g
7.	Mineral	1,0 g
8.	Kalsium	3 mg
9.	Fosfor	0 mg
10.	Besi	0 mg
11.	Akt. retinol	0 mcg
12.	Tiamin	0 mg
13.	Asam askorbat	0 mg

Sumber : Oey Kam Nio, 1992

No.	Kandungan	Jumlah
1.	Sterol	0,06 – 0,08 %
2.	Tokoferol	0,003 %
3.	Asam lemak bebas	< 5 %

Sumber : S. Ketaren, 1986

Lampiran 7**Kandungan Makanan Hewan Coba**

No.	K a n d u n g a n	J u m l a h
1.	Kadar air	Maksimum 13,0 %
2.	Protein	21,0 – 23,0 %
3.	Lemak	Minimum 5,0 %
4.	Serat	Minimum 5,0 %
5.	Abu	Maksimum 7,0 %
6.	Kalsium	Minimum 0,9 %
7.	Fosfor	Minimum 0,6 %

Sumber : P.T. Charoen Pokphand Indonesia, Mojokerto, Jawa Timur

Lampiran 8

Hasil Penimbangan Berat Badan Hewan Coba

Kelompok induksi l-tiroksin

Hewan coba	BB (g) hari ke-1	BB (g) hari ke-15	Selisih BB (g)
In 3.1	205	176	-29
In 3.2	194	144	-50
In 3.3	200	142	-58
In 3.4	186	138	-48
In 3.8	200	137	-63

Kelompok induksi l-tiroksin + vitamin C + vitamin E hari ke-1

Hewan coba	BB (g) hari ke-1	BB (g) hari ke-15	Selisih BB (g)
In 1.1	193	150	-43
In 1.2	160	123	-37
In 1.4	165	130	-35
In 1.5	155	128	-27
In 1.6	177	156	-21

Kelompok induksi l-tiroksin + vitamin C + vitamin E hari ke-4

Hewan coba	BB (g) hari ke-1	BB (g) hari ke-15	Selisih BB (g)
In 2.1	198	152	-46
In 2.2	191	190	-1
In 2.3	182	156	-26
In 2.5	194	158	-36
In 2.7	182	155	-27

Kelompok posttest

Hewan coba	BB (g) hari ke-1	BB (g) hari ke-15	Selisih BB (g)
K 2.1	145	150	5
K 2.3	155	196	41
K 2.4	143	144	1
K 2.5	147	150	3
K 2.6	155	200	45

Lampiran 9

Hasil Pemeriksaan Aktivitas SOD dan Kadar MDA Eritrosit

UNIVERSITAS BRAWIJAYA FAKULTAS KEDOKTERAN
LABORATORIUM SENTRAL BIOMEDIK

Jl. May. Jend. Haryono 171 Malang telp. (0341) 569117 pes : 128, Fax : (0341) 564755

HASIL ANALISA KADAR MDA DAN AKTIVITAS SOD

Nama Pengirim : dr. Edyson
Bahan : Whole BloodK 1 = Kontrol pretest
K 2 = Kontrol posttest
In 1 = Tiroksin + vit. C & E sejak hari ke-1
In 2 = Tiroksin + vit. C & E sejak hari ke-4
In 3 = Tiroksin


No. sampel	Kadar MDA Konsentrasi/eritrosit ($\mu\text{g/ml/eritrosit}$)	Kadar MDA Konsentrasi total ($\mu\text{g/ml}$)	Aktivitas SOD Konsentrasi/eritrosit (unit/eritrosit)	Aktivitas SOD Konsentrasi total (unit)
In 3. 1	$6,026 \cdot 10^{-3}$	0,229	$1,368 \cdot 10^{-3}$	0,052
In 3. 2	$4,457 \cdot 10^{-3}$	0,156	0,02	0,714
In 3. 3	$6,459 \cdot 10^{-3}$	0,239	0,025	0,918
In 3. 4	0,017	0,208	0,068	0,816
In 3. 8	$2,609 \cdot 10^{-3}$	0,249	0,022	1,53
In 1. 1	$8,267 \cdot 10^{-3}$	0,124	0,034	0,51
In 1. 2	$4 \cdot 10^{-3}$	0,104	0,02	0,51
In 1. 4	$3,375 \cdot 10^{-3}$	0,135	0,018	0,714
In 1. 5	$3,766 \cdot 10^{-3}$	0,177	0,013	0,612
In 1. 6	$6,23 \cdot 10^{-3}$	0,187	0,027	0,816
In 2. 1	$2,704 \cdot 10^{-3}$	0,073	0,038	1,02
In 2. 2	$1,78 \cdot 10^{-3}$	0,073	0,017	0,714
In 2. 3	$7,2 \cdot 10^{-3}$	0,072	0,092	0,918
In 2. 5	$8,667 \cdot 10^{-3}$	0,208	0,047	1,122
In 2. 7	$4,423 \cdot 10^{-3}$	0,115	0,039	1,02
K 2. 1	$1,176 \cdot 10^{-3}$	0,02	0,162	2,754

Lanjutan

No. sampel	Kadar MDA Konsentrasi/eritrosit ($\mu\text{g/ml/eritrosit}$)	Kadar MDA Konsentrasi total ($\mu\text{g/ml}$)	Aktivitas SOD Konsentrasi/eritrosit (unit/eritrosit)	Aktivitas SOD Konsentrasi total (unit)
K 2.3	0,017	0,414	0,111	2,652
K 2.4	$7,696 \cdot 10^{-3}$	0,177	0,106	2,448
K 2.5	$4,355 \cdot 10^{-3}$	0,135	0,086	2,652
K 2.6	$2,75 \cdot 10^{-3}$	0,011	0,612	2,448
K 1.1	$7,92 \cdot 10^{-3}$	0,206	0,072	1,87
K 1.3	$4,13 \cdot 10^{-3}$	0,13	0,065	2,04
K 1.4	$4,62 \cdot 10^{-3}$	0,157	0,067	2,29
K 1.5	$5 \cdot 10^{-3}$	0,137	0,095	2,6
K 1.6	$8,84 \cdot 10^{-3}$	0,221	0,077	1,92

Malang, 16 Mei & 10 Juli 2002

Plh Lab. Biomedik



dr. Loeki Enggar Fitri, M. Kes.

Lampiran 10

Perhitungan Uji Statistik

Means

Report

GRUP		MDA (mcg/ml)	SOD (unit)
K1(Kontrol pre)	Mean	,17020	2,14400
	N	5	5
	Std. Deviation	4,11E-02	,30221
K2 (Kontrol post)	Mean	,15140	2,59080
	N	5	5
	Std. Deviation	,16345	,13685
In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	Mean	,14540	,63240
	N	5	5
	Std. Deviation	3,54E-02	,13299
In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	Mean	,10820	,95880
	N	5	5
	Std. Deviation	5,87E-02	,15469
Tiroksin	Mean	,21620	,80600
	N	5	5
	Std. Deviation	3,69E-02	,52768
Total	Mean	,15828	1,42640
	N	25	25
	Std. Deviation	8,39E-02	,84765

NPar Tests

GRUP = K 1(Kontrol pre)

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test^c

		MDA (mcg/ml)	SOD (unit)
N		5	5
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	,17020	2,14400
	Std. Deviation	4,11E-02	,30221
Most Extreme Differences	Absolute	,226	,235
	Positive	,226	,235
	Negative	-.208	-.182
Kolmogorov-Smirnov Z		,505	,525
Asymp. Sig. (2-tailed)		,960	,946

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. GRUP = K1(Kontrol pre)

GRUP = K 2 (Kontrol post)**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test^c**

		MDA (mcg/ml)	SOD (unit)
N		5	5
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.15140	2.59080
	Std. Deviation	.16345	.13685
Most Extreme Differences	Absolute	.238	.273
	Positive	.238	.252
	Negative	-.195	-.273
Kolmogorov-Smirnov Z		.532	.610
Asymp. Sig. (2-tailed)		.940	.851

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. GRUP = K2 (Kontrol post)

GRUP = In 1 (Tiroksin + vit C+E sejak hari ke-1)**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test^c**

		MDA (mcg/ml)	SOD (unit)
N		5	5
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.14540	.63240
	Std. Deviation	3.54E-02	.13299
Most Extreme Differences	Absolute	.216	.221
	Positive	.216	.221
	Negative	-.214	-.179
Kolmogorov-Smirnov Z		.482	.495
Asymp. Sig. (2-tailed)		.974	.967

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. GRUP = In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)

GRUP = In 2 (Tiroksin + vit C+E sejak hari ke-4)**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		MDA (mcg/ml)	SOD (unit)
N		5	5
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	,10820	,95880
	Std. Deviation	5,87E-02	,15469
Most Extreme Differences	Absolute	,326	,254
	Positive	,326	,146
	Negative	-,269	-,254
Kolmogorov-Smirnov Z		,728	,568
Asymp. Sig. (2-tailed)		,664	,904

- a. Test distribution is Normal.
 b. Calculated from data.
 c. GRUP = In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		MDA (mcg/ml)	SOD (unit)
N		5	5
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	,10820	,95880
	Std. Deviation	5,87E-02	,15469
Most Extreme Differences	Absolute	,326	,254
	Positive	,326	,146
	Negative	-,269	-,254
Kolmogorov-Smirnov Z		,728	,568
Asymp. Sig. (2-tailed)		,664	,904

- a. Test distribution is Normal.
 b. Calculated from data.
 c. GRUP = In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)

GRUP = In 3 (Tiroksin)**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test^c**

		MDA (mcg/ml)	SOD (unit)
N		5	5
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.21620	.80600
	Std. Deviation	3.69E-02	.52768
Most Extreme Differences	Absolute	.236	.231
	Positive	.187	.216
	Negative	-.236	-.231
Kolmogorov-Smirnov Z		.527	.516
Asymp. Sig. (2-tailed)		.944	.953

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. GRUP = Tiroksin

General Linear Model**Between-Subjects Factors**

GRUP	Value Label	N
1	K1(Kontrol pre)	5
2	K2 (Kontrol post)	5
3	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	5
4	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	5
5	Tiroksin	5

Descriptive Statistics

GRUP		Mean	Std. Deviation	N
MDA (mcg/ml)	K1(Kontrol pre)	.17020	4,109E-02	5
	K2 (Kontrol post)	.15140	.16345	5
	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	.14540	3,539E-02	5
	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	.10820	5,873E-02	5
	Tiroksin	.21620	3,691E-02	5
	Total	.15828	8,390E-02	25
SOD (unit)	K1(Kontrol pre)	2,14400	.30221	5
	K2 (Kontrol post)	2,59080	.13685	5
	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	.63240	.13299	5
	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	.95880	.15469	5
	Tiroksin	.80600	.52768	5
	Total	1,42640	.84765	25

Multivariate Tests^c

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.967	276.681 ^a	2.000	19.00	.000
	Wilks' Lambda	.033	276.681 ^a	2.000	19.00	.000
	Hotelling's Trace	29.124	276.681 ^a	2.000	19.00	.000
	Roy's Largest Root	29.124	276.681 ^a	2.000	19.00	.000
GRUP	Pillai's Trace	1.068	5.731	8.000	40.00	.000
	Wilks' Lambda	.094	10.749 ^a	8.000	38.00	.000
	Hotelling's Trace	7.922	17.825	8.000	36.00	.000
	Roy's Largest Root	7.698	38.490 ^b	4.000	20.00	.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+GRUP

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	MDA (mcg/ml)	3,109E-02 ^a	4	7,773E-03	1,128	,372
	SOD (unit)	15,524 ^b	4	3,881	45,114	,000
Intercept	MDA (mcg/ml)	,626	1	,626	90,855	,000
	SOD (unit)	50,865	1	50,865	591,289	,000
GRUP	MDA (mcg/ml)	3,109E-02	4	7,773E-03	1,128	,372
	SOD (unit)	15,524	4	3,881	45,114	,000
Error	MDA (mcg/ml)	,138	20	6,894E-03		
	SOD (unit)	1,720	20	8,602E-02		
Corrected Total	MDA (mcg/ml)	,169	24			
	SOD (unit)	17,244	24			

a. R Squared = ,184 (Adjusted R Squared = ,021)

b. R Squared = ,900 (Adjusted R Squared = ,880)

Estimated Marginal Means GRUP

Estimates

Dependent Variable	GRUP	Mean	Std. Error
MDA (mcg/ml)	K1(Kontrol pre)	,170	,037
	K2 (Kontrol post)	,151	,037
	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	,145	,037
	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	,108	,037
	Tiroksin	,216	,037
SOD (unit)	K1(Kontrol pre)	2,144	,131
	K2 (Kontrol post)	2,591	,131
	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	,632	,131
	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	,959	,131
	Tiroksin	,806	,131

Pairwise Comparisons

Dependent Variable	(I) GRUP	(J) GRUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	
MDA (mcg/ml)	K1(Kontrol pre)	K2 (Kontrol post)	1,880E-02	,053	,724	
		In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	2,480E-02	,053	,642	
		In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	6,200E-02	,053	,252	
		Tiroksin	-4,600E-02	,053	,391	
	K2 (Kontrol post)	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	6,000E-03	,053	,910	
		In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	4,320E-02	,053	,420	
		Tiroksin	-6,480E-02	,053	,231	
	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	3,720E-02	,053	,487	
		Tiroksin	-7,080E-02	,053	,193	
	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	Tiroksin	-,108	,053	,053	
		SOD (unit)	K1(Kontrol pre)	K2 (Kontrol post)	-,447	,185
	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)			1,512	,185	,000
In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	1,185			,185	,000	
Tiroksin	1,338			,185	,000	
K2 (Kontrol post)	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)		1,958	,185	,000	
	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)		1,632	,185	,000	
	Tiroksin		1,785	,185	,000	
In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)		-,326	,185	,094	
	Tiroksin		-,174	,185	,361	
In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	Tiroksin		,153	,185	,420	

Based on estimated marginal means

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

Multivariate Tests

	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Pillai's trace	1.068	5.731	8.000	40.000	.000
Wilks' lambda	.094	10.749 ^a	8.000	38.000	.000
Hotelling's trace	7.922	17.825	8.000	36.000	.000
Roy's largest root	7.698	38.490 ^b	4.000	20.000	.000

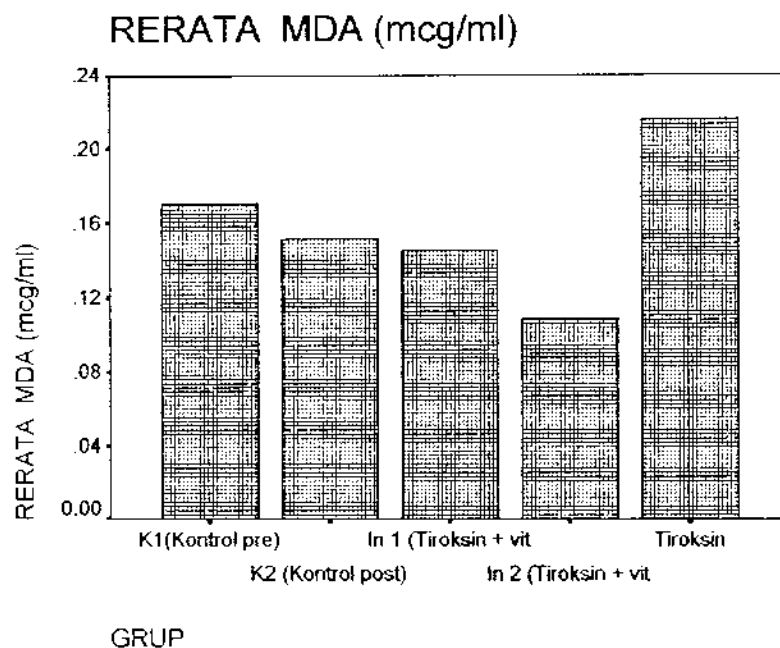
Each F tests the multivariate effect of GRUP. These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

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

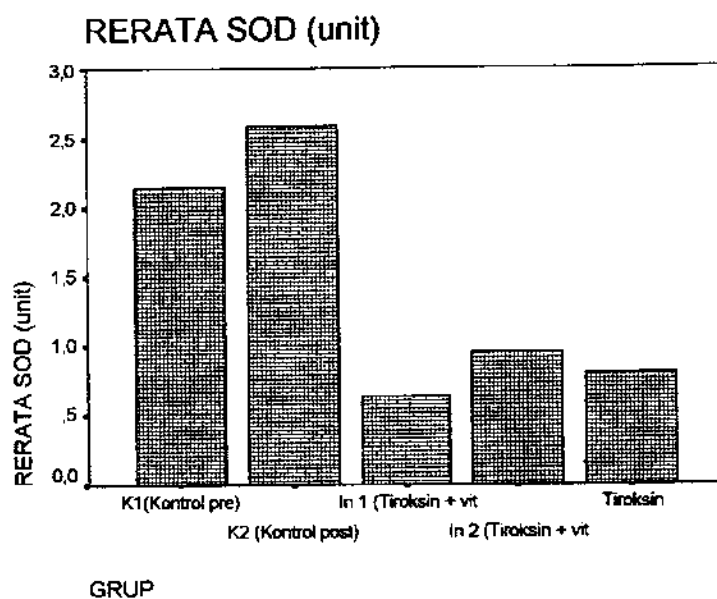
Univariate Tests

Dependent Variable		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
MDA (mcg/ml)	Contrast	3,109E-02	4	7,773E-03	1,128	,372
	Error	,138	20	6,894E-03		
SOD (unit)	Contrast	15,524	4	3,881	45,114	,000
	Error	1,720	20	8,602E-02		

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

Profile Plots**MDA (mcg/ml)**

GAMBAR : RERATA MDA MENURUT GRUP PERLAKUAN

SOD (unit)**GAMBAR : RERATA SOD MENURUT GRUP PERLAKUAN****General Linear Model****Between-Subjects Factors**

		Value Label	N
GRUP	3	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	5
	4	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	5
	5	Tiroksin	5

Descriptive Statistics

	GRUP	Mean	Std. Deviation	N
PERUBAHAN MDA	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	-6,0E-03	3,539E-02	5
	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	-4,3E-02	5,873E-02	5
	Tiroksin	6,48E-02	3,691E-02	5
	Total	5,20E-03	6,231E-02	15
PERUBAHAN SOD	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	-1,95760	,13299	5
	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	-1,63120	,15469	5
	Tiroksin	-1,78400	,52768	5
	Total	-1,79093	,33241	15

Multivariate Tests^c

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	,977	237,892 ^a	2,000	11,00	,000
	Wilks' Lambda	,023	237,892 ^a	2,000	11,00	,000
	Hotelling's Trace	43,253	237,892 ^a	2,000	11,00	,000
	Roy's Largest Root	43,253	237,892 ^a	2,000	11,00	,000
GRUP	Pillai's Trace	,758	3,660	4,000	24,00	,018
	Wilks' Lambda	,330	4,074 ^a	4,000	22,00	,013
	Hotelling's Trace	1,764	4,410	4,000	20,00	,010
	Roy's Largest Root	1,598	9,586 ^b	2,000	12,00	,003

- a. Exact statistic
 b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.
 c. Design: Intercept+GRUP

Multivariate Tests^c

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	,977	237,892 ^a	2,000	11,00	,000
	Wilks' Lambda	,023	237,892 ^a	2,000	11,00	,000
	Hotelling's Trace	43,253	237,892 ^a	2,000	11,00	,000
	Roy's Largest Root	43,253	237,892 ^a	2,000	11,00	,000
GRUP	Pillai's Trace	,758	3,660	4,000	24,00	,018
	Wilks' Lambda	,330	4,074 ^a	4,000	22,00	,013
	Hotelling's Trace	1,764	4,410	4,000	20,00	,010
	Roy's Largest Root	1,598	9,586 ^b	2,000	12,00	,003

- a. Exact statistic
 b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.
 c. Design: Intercept+GRUP

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	PERUBAHAN MDA	3,010E-02 ^a	2	1,505E-02	7,446	,008
	PERUBAHAN SOD	,267 ^b	2	,133	1,250	,321
Intercept	PERUBAHAN MDA	4,056E-04	1	4,056E-04	,201	,662
	PERUBAHAN SOD	48,112	1	48,112	450,954	,000
GRUP	PERUBAHAN MDA	3,010E-02	2	1,505E-02	7,446	,008
	PERUBAHAN SOD	,267	2	,133	1,250	,321
Error	PERUBAHAN MDA	2,425E-02	12	2,021E-03		
	PERUBAHAN SOD	1,280	12	,107		
Total	PERUBAHAN MDA	5,476E-02	15			
	PERUBAHAN SOD	49,659	15			
Corrected Total	PERUBAHAN MDA	5,436E-02	14			
	PERUBAHAN SOD	1,547	14			

a. R Squared = ,554 (Adjusted R Squared = ,479)

b. R Squared = ,172 (Adjusted R Squared = ,034)

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	PERUBAHAN MDA	3,010E-02 ^a	2	1,505E-02	7,446	,008
	PERUBAHAN SOD	,267 ^b	2	,133	1,250	,321
Intercept	PERUBAHAN MDA	4,056E-04	1	4,056E-04	,201	,662
	PERUBAHAN SOD	48,112	1	48,112	450,954	,000
GRUP	PERUBAHAN MDA	3,010E-02	2	1,505E-02	7,446	,008
	PERUBAHAN SOD	,267	2	,133	1,250	,321
Error	PERUBAHAN MDA	2,425E-02	12	2,021E-03		
	PERUBAHAN SOD	1,280	12	,107		
Total	PERUBAHAN MDA	5,476E-02	15			
	PERUBAHAN SOD	49,659	15			
Corrected Total	PERUBAHAN MDA	5,436E-02	14			
	PERUBAHAN SOD	1,547	14			

a. R Squared = ,554 (Adjusted R Squared = ,479)

b. R Squared = ,172 (Adjusted R Squared = ,034)

Estimated Marginal Means GRUP

Estimates

Dependent Variable	GRUP	Mean	Std. Error
PERUBAHAN MDA	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	-6,00E-03	,020
	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	-4,32E-02	,020
	Tiroksin	6,480E-02	,020
PERUBAHAN SOD	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	-1,958	,146
	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	-1,631	,146
	Tiroksin	-1,784	,146

Pairwise Comparisons

Dependent Variable	(I) GRUP	(J) GRUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a
PERUBAHAN MDA	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	3,720E-02	,028	,215
		Tiroksin	-7,080E-02	,028	,028
	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	Tiroksin	-,108	,028	,003
PERUBAHAN SOD	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	-,326	,207	,140
		Tiroksin	-,174	,207	,417
	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	Tiroksin	,153	,207	,474
		Tiroksin	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)		

Based on estimated marginal means

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

Multivariate Tests

	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Pillai's trace	.607	2.617	4.000	24.00	.060
Wilks' lambda	.413	3.063 ^a	4.000	22.00	.038
Hotelling's trace	1.376	3.439	4.000	20.00	.027
Roy's largest root	1.340	8.038 ^b	2.000	12.00	.006

Each F tests the multivariate effect of GRUP. These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

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

Univariate Tests

Dependent Variable		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
PERUBAHAN MDA	Contrast	3,010E-02	2	1,505E-02	7,446	,008
	Error	2,425E-02	12	2,021E-03		
PERUBAHAN SOD	Contrast	,267	2	,133	1,250	,321
	Error	1,280	12	,107		

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

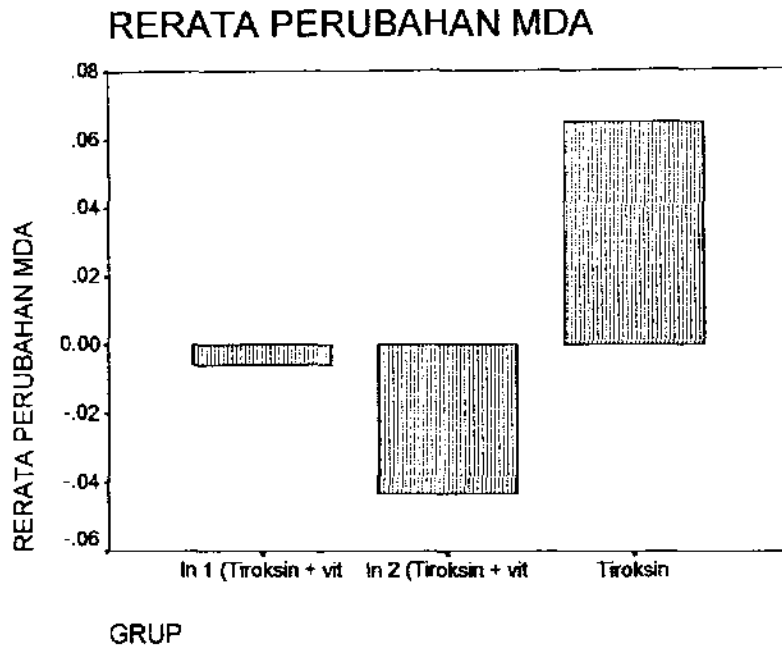
Univariate Tests

Dependent Variable		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
PERUBAHAN MDA	Contrast	3,010E-02	2	1,505E-02	7,446	,008
	Error	2,425E-02	12	2,021E-03		
PERUBAHAN SOD	Contrast	,267	2	,133	1,250	,321
	Error	1,280	12	,107		

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

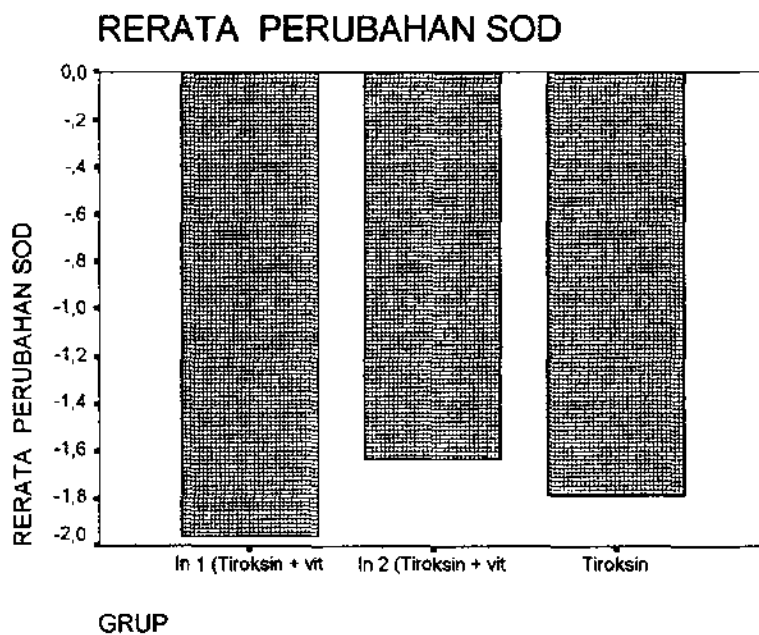
Profile Plots

PERUBAHAN MDA



GAMBAR : RERATA PERUBAHAN MDA MENURUT GRUP PERLAKUAN

PERUBAHAN SOD



GAMBAR : RERATA PERUBAHAN SOD MENURUT GRUP PERLAKUAN

General Linear Model

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
GRUP	3	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	5
	4	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	5
	5	Tiroksin	5

Descriptive Statistics

	GRUP	Mean	Std. Deviation	N
PERSEN PERUBAHAN MDA	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	-3,963012	23,373746	5
	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	-28,5337	38,788397	5
	Tiroksin	42,800528	24,382277	5
	Total	3,434610	41,155914	15
PERSEN PERUBAHAN SOD	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	-75,55967	5,13323	5
	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	-62,96744	5,96261	5
	Tiroksin	-68,85904	20,36759	5
	Total	-69,12872	12,82832	15

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	,977	237,873 ^a	2,000	11,000	,000
	Wilks' Lambda	,023	237,873 ^a	2,000	11,000	,000
	Hotelling's Trace	43,250	237,873 ^a	2,000	11,000	,000
	Roy's Largest Root	43,250	237,873 ^a	2,000	11,000	,000
GRUP	Pillai's Trace	,758	3,659	4,000	24,000	,018
	Wilks' Lambda	,330	4,072 ^a	4,000	22,000	,013
	Hotelling's Trace	1,763	4,408	4,000	20,000	,010
	Roy's Largest Root	1,597	9,580 ^b	2,000	12,000	,003

a. Exact statistic

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

c. Design: Intercept+GRUP

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	PERSEN PERUBAHAN MDA	13131,851 ^a	2	6565,931	7,446	,008
	PERSEN PERUBAHAN SOD	396,956 ^b	2	198,478	1,249	,322
Intercept	PERSEN PERUBAHAN MDA	176,948	1	176,948	,201	,662
	PERSEN PERUBAHAN SOD	71681,694	1	71681,694	451,073	,000
GRUP	PERSEN PERUBAHAN MDA	13131,861	2	6565,931	7,446	,008
	PERSEN PERUBAHAN SOD	396,956	2	198,478	1,249	,322
Error	PERSEN PERUBAHAN MDA	10581,469	12	881,789		
	PERSEN PERUBAHAN SOD	1906,967	12	158,914		
Corrected Total	PERSEN PERUBAHAN MDA	23713,330	14			
	PERSEN PERUBAHAN SOD	2303,923	14			

a. R Squared = ,554 (Adjusted R Squared = ,479)

b. R Squared = ,172 (Adjusted R Squared = ,034)

Estimated Marginal Means GRUP

Estimates

Dependent Variable	GRUP	Mean	Std. Error
PERSEN PERUBAHAN MDA	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	-3,963	13,280
	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	-28,534	13,280
	Tiroksin	42,801	13,280
PERSEN PERUBAHAN SOD	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	-75,560	5,638
	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	-62,967	5,638
	Tiroksin	-68,859	5,638

Pairwise Comparisons

Dependent Variable	(I) GRUP	(J) GRUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a
PERSEN PERUBAHAN MDA	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	24,571	18,781	,215
		Tiroksin	-46,764	18,781	,028
	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	Tiroksin	-71,334	18,781	,003
PERSEN PERUBAHAN SOD	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	-12,592	7,973	,140
		Tiroksin	-6,701	7,973	,417
	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	Tiroksin	5,892	7,973	,474

Based on estimated marginal means

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

Multivariate Tests

	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Pillai's trace	,758	3,659	4,000	24,000	,018
Wilks' lambda	,330	4,072 ^a	4,000	22,000	,013
Hotelling's trace	1,763	4,408	4,000	20,000	,010
Roy's largest root	1,597	9,580 ^b	2,000	12,000	,003

Each F tests the multivariate effect of GRUP. These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

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

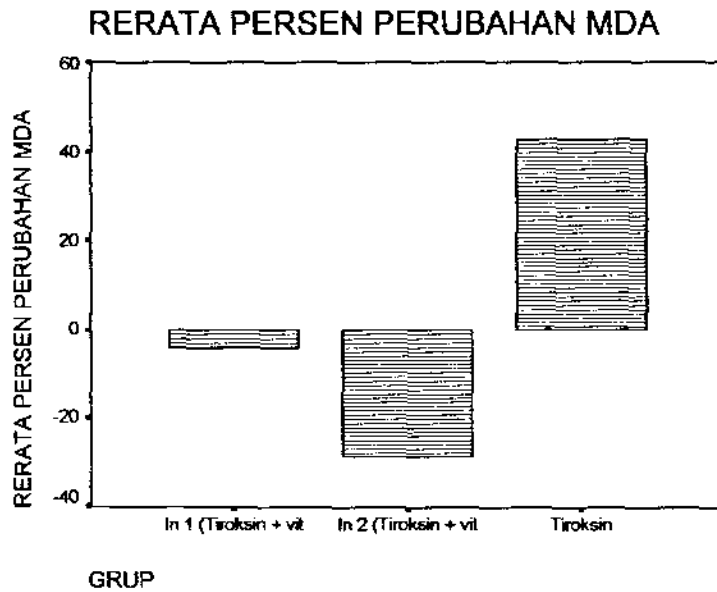
Univariate Tests

Dependent Variable		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
PERSEN PERUBAHAN MDA	Contrast	13131,861	2	6565,931	7,446	,008
	Error	10581,469	12	881,789		
PERSEN PERUBAHAN SOD	Contrast	396,956	2	198,478	1,249	,322
	Error	1906,967	12	158,914		

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

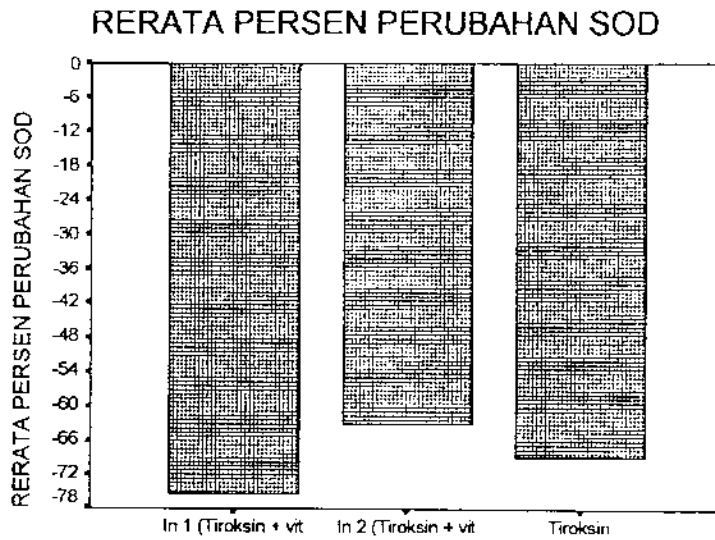
Profile Plots

PERSEN PERUBAHAN MDA



GAMBAR : RERATA PERSEN PERUBAHAN MDA MENURUT GRUP PERLAKUAN

PERSEN PERUBAHAN SOD



GRUP

**GAMBAR : RERATA PERSEN PERUBAHAN SOD
MENURUT GRUP PERLAKUAN**

General Linear Model

Between-Subjects Factors

GRUP	Value Label	N
3	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	5
4	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	5
5	Tiroksin	5

Descriptive Statistics

GRUP		Mean	Std. Deviation	N
PERUBAHAN MDA	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	,164200	3,539E-02	5
	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	,127000	5,873E-02	5
	Tiroksin	,235000	3,691E-02	5
	Total	,175400	6,231E-02	15
PERUBAHAN SOD	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	,185600	,132992	5
	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	,241920	,527686	5
	Tiroksin	,359200	,527684	5
	Total	,262240	,412033	15

Multivariate Tests^c

Effect		Value	F	Hypothesis s df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	,959	130,054 ^a	2,000	11,000	,000
	Wilks' Lambda	,041	130,054 ^a	2,000	11,000	,000
	Hotelling's Trace	23,646	130,054 ^a	2,000	11,000	,000
	Roy's Largest Root	23,646	130,054 ^a	2,000	11,000	,000
GRUP	Pillai's Trace	,614	2,660	4,000	24,000	,057
	Wilks' Lambda	,393	3,275 ^a	4,000	22,000	,030
	Hotelling's Trace	1,527	3,818	4,000	20,000	,018
	Roy's Largest Root	1,515	9,093 ^b	2,000	12,000	,004

- a. Exact statistic
 b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.
 c. Design: Intercept+GRUP

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	PERUBAHAN MDA	3,010E-02 ^a	2	1,505E-02	7,446	,008
	PERUBAHAN SOD	7,844E-02 ^b	2	3,922E-02	,205	,818
Intercept	PERUBAHAN MDA	,461	1	,461	228,315	,000
	PERUBAHAN SOD	1,032	1	1,032	5,386	,039
GRUP	PERUBAHAN MDA	3,010E-02	2	1,505E-02	7,446	,008
	PERUBAHAN SOD	7,844E-02	2	3,922E-02	,205	,818
Error	PERUBAHAN MDA	2,425E-02	12	2,021E-03		
	PERUBAHAN SOD	2,298	12	,192		
Total	PERUBAHAN MDA	,516	15			
	PERUBAHAN SOD	3,408	15			
Corrected Total	PERUBAHAN MDA	5,436E-02	14			
	PERUBAHAN SOD	2,377	14			

- a. R Squared = ,554 (Adjusted R Squared = ,479)
 b. R Squared = ,033 (Adjusted R Squared = -,128)

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	PERUBAHAN MDA	3,010E-02 ^a	2	1,505E-02	7,446	,008
	PERUBAHAN SOD	7,844E-02 ^b	2	3,922E-02	,205	,818
Intercept	PERUBAHAN MDA	,461	1	,461	228,315	,000
	PERUBAHAN SOD	1,032	1	1,032	5,386	,039
GRUP	PERUBAHAN MDA	3,010E-02	2	1,505E-02	7,446	,008
	PERUBAHAN SOD	7,844E-02	2	3,922E-02	,205	,818
Error	PERUBAHAN MDA	2,425E-02	12	2,021E-03		
	PERUBAHAN SOD	2,298	12	,192		
Total	PERUBAHAN MDA	,516	15			
	PERUBAHAN SOD	3,408	15			
Corrected Total	PERUBAHAN MDA	5,436E-02	14			
	PERUBAHAN SOD	2,377	14			

a. R Squared = ,554 (Adjusted R Squared = ,479)

b. R Squared = ,033 (Adjusted R Squared = -,128)

Estimated Marginal Means GRUP

Estimates

Dependent Variable	GRUP	Mean	Std. Error
PERUBAHAN MDA	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	,164	,020
	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	,127	,020
	Tiroksin	,235	,020
PERUBAHAN SOD	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	,186	,196
	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	,242	,196
	Tiroksin	,359	,196

Estimates

Dependent Variable	GRUP	Mean	Std. Error
PERUBAHAN MDA	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	,164	,020
	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	,127	,020
	Tiroksin	,235	,020
PERUBAHAN SOD	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	,186	,196
	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	,242	,196
	Tiroksin	,359	,196

Pairwise Comparisons

Dependent Variable	(I) GRUP	(J) GRUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a
PERUBAHAN MDA	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	3,720E-02	,028	,215
		Tiroksin	-7,080E-02	,028	,028
	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	Tiroksin	-,108	,028	,003
PERUBAHAN SOD	In 1 (Tiroksin + vit C+E hari 1)	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	-5,632E-02	,277	,842
		Tiroksin	-,174	,277	,542
	In 2 (Tiroksin + vit C+E hari 4)	Tiroksin	-,117	,277	,679

Based on estimated marginal means

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

Multivariate Tests

	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Pillai's trace	,614	2,660	4,000	24,000	,057
Wilks' lambda	,393	3,275 ^a	4,000	22,000	,030
Hotelling's trace	1,527	3,818	4,000	20,000	,018
Roy's largest root	1,515	9,093 ^b	2,000	12,000	,004

Each F tests the multivariate effect of GRUP. These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

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

Univariate Tests

Dependent Variable		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
PERUBAHAN MDA	Contrast	3,010E-02	2	1,505E-02	7,446	,008
	Error	2,425E-02	12	2,021E-03		
PERUBAHAN SOD	Contrast	7,844E-02	2	3,922E-02	,205	,818
	Error	2,298	12	,192		

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

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
BERAT BADAN AWAL	2,295	3	16	,117
BERAT BADAN AKHIR	3,076	3	16	,058
SELISIH BB	5,028	3	16	,012

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BERAT BADAN AWAL	Between Groups	6127,350	3	2042,450	11,725	,000
	Within Groups	2787,200	16	174,200		
	Total	8914,550	19			
BERAT BADAN AKHIR	Between Groups	2910,550	3	970,183	2,619	,087
	Within Groups	5927,200	16	370,450		
	Total	8837,750	19			
SELISIH BB	Between Groups	3793,025	3	1264,342	13,378	,000
	Within Groups	1512,091	16	94,506		
	Total	5305,116	19			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
BERAT BADAN AWAL	TYROKSIN	TYROKSIN+ANOX 1	21,0000	8,3475	,023
		TYROKSIN+ANOX 2	-,4000	8,3475	,962
		KONTROL POS	42,0000	8,3475	,000
	TYROKSIN+ANOX 1	TYROKSIN+ANOX 2	-21,4000	8,3475	,021
		KONTROL POS	21,0000	8,3475	,023
		TYROKSIN+ANOX 2	42,4000	8,3475	,000
BERAT BADAN AKHIR	TYROKSIN	TYROKSIN+ANOX 1	10,0000	12,1729	,423
		TYROKSIN+ANOX 2	-14,8000	12,1729	,242
		KONTROL POS	-20,6000	12,1729	,110
	TYROKSIN+ANOX 1	TYROKSIN+ANOX 2	-24,8000	12,1729	,059
		KONTROL POS	-30,6000	12,1729	,023
		TYROKSIN+ANOX 2	-5,8000	12,1729	,640
SELISIH BB	TYROKSIN	TYROKSIN+ANOX 1	3,2115	6,1484	,609
		TYROKSIN+ANOX 2	7,2120	6,1484	,258
		KONTROL POS	34,7261	6,1484	,000
	TYROKSIN+ANOX 1	TYROKSIN+ANOX 2	4,0006	6,1484	,524
		KONTROL POS	31,5146	6,1484	,000
		TYROKSIN+ANOX 2	27,5140	6,1484	,000