

- 1. VITAMIN E
- 2. ASAM ASAM
- 3. SUPEROKSID DISMUTASE

TESIS

**PENGARUH SUPLEMENTASI VITAMIN E DAN C TERHADAP
AKTIVITAS ENZIM *SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD)* DALAM
ERITROSIT TIKUS YANG TERPAPAR
ASAP ROKOK KRETEK**

FK
TKD 04/03
chr
P

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



JULIANA CHRISTYANINGSIH

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2002**

**MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

TESIS

**PENGARUH SUPLEMENTASI VITAMIN E DAN C TERHADAP
AKTIVITAS ENZIM *SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD)* DALAM
ERITROSIT TIKUS YANG TERPAPAR
ASAP ROKOK KRETEK**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



JULIANA CHRISTYANINGSIH

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2002**

TESIS

**PENGARUH SUPLEMENTASI VITAMIN E DAN C TERHADAP
AKTIVITAS ENZIM *SUPER OXIDE DISMUTASE (SOD)* DALAM
ERITROSIT TIKUS YANG TERPAPAR
ASAP ROKOK KRETEK**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



JULIANA CHRISTYANINGSIH

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2002**

**PENGARUH SUPLEMENTASI VITAMIN E DAN C TERHADAP
AKTIVITAS ENZIM *SUPER OXIDE DISMUTASE (SOD)* DALAM
ERITROSIT TIKUS YANG TERPAPAR
ASAP ROKOK KRETEK**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TESIS

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

Oleh :

JULIANA CHRISTYANINGSIH
NIM 090014135M

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

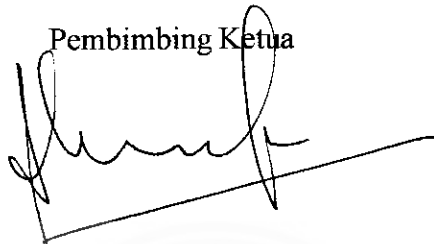
Tanggal 17 September 2002

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 23 AGUSTUS 2002

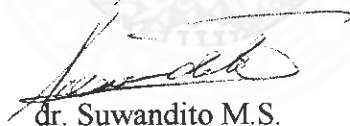
Oleh

Pembimbing Ketua



Prof. dr. Sri Utari SpBK
NIP 130 099 600

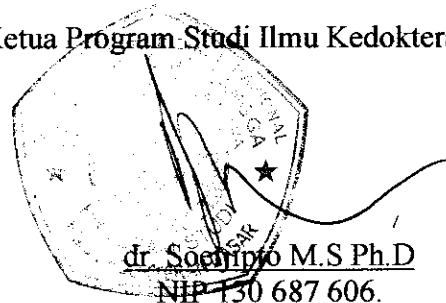
Pembimbing



dr. Suwandito M.S.
NIP 130 808 641

Mengetahui :

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar



dr. Soeharto M.S Ph.D
NIP 130 687 606.

Telah diuji pada

Tanggal 17 September 2002

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. dr. Purnomo Suryohudoyo

Anggota : 1. Prof. dr.. Sri Utari SpBK
2. dr. Moch. Cholil Munif AIF
3. Dr. dr. Indri Safitri M.S
4. dr Suwandito M.S.



UCAPAN TERIMA KASIH

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

Saya ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Pemerintah Republik Indonesia cq Menteri Kesehatan melalui Pusat Pendidikan Tenaga Kesehatan yang telah memberikan bantuan finansial, sehingga meringankan beban saya dalam menyelesaikan tesis ini.

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

Rektor Universitas Airlangga **Prof Dr Med Puruhito, dr, Sp.BTKV(K)** 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, Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang dijabat oleh **Prof. Dr. H. Muhammad Amin dr, Sp.P (K)** atas kesempatan untuk menyelesaikan pendidikan program Magister, Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar dan juga selaku Kepala Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, **Soetjipto dr, MS, PhD.**

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada **Profesor Sri Utari dr, SpBK**, Pembimbing Ketua sekaligus Ketua Minat studi Biokimia Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran.

Terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada **Suwandito dr, M.S**, Pembimbing yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran.

Ketua Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Surabaya, **Mohd. Junus Drs, M.Si**, yang telah mengijinkan untuk menempuh dan menyelesaikan studi di Program Magister ini.

Prof. Purnomo Suryohudoyo dr, Moch. Cholil Munif dr, AIF, Dr. Indri Safitri dr, M.S. selaku penguji usulan penelitian dan tesis atas saran dan perbaikannya.

Seluruh staf pengajar dan karyawan laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Unair, khususnya **bapak Heri** yang telah membantu dengan tulus ikhlas memberi ilmu dan pengalamannya selama studi.

Kepala Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan izin untuk menggunakan fasilitas di laboratorium dalam rangka pelaksanaan penelitian.

Loeki Enggar Fitri dr, M.Kes, ibu Afrida dan ibu Ucik, teknisi laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya atas bantuannya dalam pelaksanaan penelitian ini.

Edyson dr dan kawan-kawan yang tidak dapat kami sebutkan satu-persatu, yang telah membantu memberikan dorongan semangat dan dukungan dalam menyelesaikan tesis ini.

Bapak dan Ibu yang selalu berkorban dan mendukung sampai selesainya pendidikan ini, serta bapak dan ibu mertua, adik-adik yang penuh perhatian dan kesabaran memahami kami.

Suami tercinta, **Agung Bagus Raka Drs, Ir.** dan kedua anak tercinta, **Christian** dan **Alvin** yang selalu setia mendampingi, mendengar keluhan, memberi semangat, mengorbankan apapun agar terselesaikannya pendidikan ini

Serta semua pihak yang ikut membantu dan mendukung selama masa pendidikan yang namanya tidak dapat kami sebutkan satu persatu.

Saya menyadari bahwa dalam tesis ini banyak kekurangan, oleh karena itu saran dan kritik tetap diharapkan sebagai bahan perbaikan agar dapat menghasilkan suatu penelitian yang bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan khususnya dan kesejahteraan umat pada umumnya.

Surabaya, Agustus 2002

RINGKASAN

Asap rokok merupakan aerosol heterogen dari pembakaran tembakau, komponen dalam rokok serta pembungkusnya . Setiap batang rokok mengandung banyak bahan kimia diantaranya adalah : nikotin, karbon monoksida, tar yang bersifat karsinogenik dan radikal bebas , seperti radikal *nitric oxide* ($\bullet\text{NO}$, $\bullet\text{NO}_2$) dll.. Radikal bebas merupakan oksidan yang dapat berdampak negatif antara lain mengganggu integritas sel dan dapat bereaksi dengan komponen sel, yaitu : komponen struktural, merusak protein (termasuk enzim) dan DNA, yang akhirnya akan terjadi kerusakan sel.

Vitamin E merupakan antioksidan yang bekerja pada membran sel yang memerlukan tekanan oksigen yang tinggi, sedangkan vitamin C bekerja pada sitosol dan secara ekstrasel . Dengan mekanisme kerja yang berbeda, jika kedua vitamin ini digunakan bersamaan diharapkan akan memberikan efek yang optimal dalam menghadapi aktifitas senyawa oksigen reaktif (ROS) pada eritrosit.

Eritrosit yang dilengkapi dengan antioksidan yang berupa enzim CuZn-SOD, akan mencegah terhimpunnya senyawa oksidan yang berlebihan dan mencegah reaksi rantai lebih lanjut. Suplementasi vitamin E dan vitamin C diharapkan akan menghambat penurunan aktifitas enzim SOD yang diakibatkan oleh oksidan yang berasal dari paparan asap rokok .

Penelitian jenis eksperimental laboratoris dengan rancangan *Randomized Post Test Only Control Group Design* dan analisis data dilakukan dengan uji Anova. Variabel penelitian yang diperiksa adalah aktivitas enzim SOD eritrosit., dengan menggunakan hewan coba *Rattus norvegicus* jantan dewasa (umur 2,5 – 3 bulan). Hasil analisis aktivitas enzim SOD kelompok perlakuan terdiri dari 2 kelompok , yaitu kelompok tikus yang diberi asap rokok dan suplementasi vitamin E & C (kelompok P1) dan kelompok tikus yang hanya diberi asap rokok selama 2 bulan (kelompok P2) akan dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Hasil yang diperoleh menunjukkan pada kelompok tikus yang dipapar asap rokok dengan diberi vitamin E & C, aktivitas enzim SOD eritrosit lebih tinggi bermakna ($\times = 0,5908$ Unit/ml) bila dibandingkan dengan kelompok tikus yang hanya diberi asap rokok

($\times = 0,1276$ Unit/ml) dan kelompok kontrol menunjukkan aktivitas enzim SOD yang paling tinggi ($\times = 1,0044$ Unit/ml).

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa suplementasi vitamin E dan C pada tikus yang dipapar asap rokok selama 2 bulan dapat menghambat penurunan aktifitas SOD dan asap rokok memang memberikan efek yang merugikan terhadap eritrosit. ROS eksternal dari asap rokok berpotensi merusak protein yang dibuktikan dengan adanya penurunan drastis terhadap aktifitas enzim SOD eritrosit pada tikus yang hanya dipapar asap rokok. Bagaimanapun juga suplementasi vitamin E dan C, tetap tidak dapat mempertahankan aktivitas enzim SOD seperti pada kelompok kontrol. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui efek asap rokok terhadap komponen lain dalam sel.



ABSTRACT

Cigarette smoke contains many chemical substances including nicotine, carbon monoxide, carcinogenic tar and free radicals e.g. nitric oxide radicals. Free radicals are a negative-impact oxide which disturbs cell integrity and reacts with cell component such as lipid, proteins (including enzymes) and DNA. The damaged protein c.q. enzymes, such as superoxide dismutase (SOD) will result in the decrease of its activity.

Tocopherol is an antioxidant, which works at the cell membrane needing high pressure oxygen, and ascorbic acid works extracellularly at cytosol. Although using different working mechanisms, if these two vitamins are used simultaneously they can be expected to provide an optimum effect to counter the Reactive Oxygen Species activity on erythrocytes.

Randomized Post-Test Only Control Group Design was used in this laboratory experiment. The data collected were then analysed by Anova . Superoxide dismutase enzyme levels in erythrocytes was used as the parameter.

Fifteen male *Rattus norvegicus*, age 2,5-3 months served as sample. The rats were divided into 2 separate groups and one control group. Both treatment group were fumigated with cigarette smoke for two months. Group 2 (second) , beside fumigated got also vitamin E (400 mg/kg) and ascorbic acid (20 mg/kg) . After 2 months, erythrocytes were collected from the groups and analyzed.

The result shows that the vitamins were effective in reducing the decrease of SOD level significantly ($P = 0,005$; $\alpha = 5\%$). It can be concluded that external ROS is harmful to the proteins of the erythrocytes. Further investigation is needed to look for the effect of cigarette smoke to other components of the cell.

Keyword : cigarette smoke, Reactive Oxygen Species, ascorbic acid, tocopherol, , superoxide dismutase enzyme activity

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 DAN ISTILAH.....	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Rokok.....	7
2.1.1 Asal usul merokok.....	7
2.1.2 Perokok pasif.....	8
2.1.3 Kandungan asap rokok.....	9
2.1.4 Rokok dan radikal bebas.....	13
2.2 Darah.....	14
2.2.1 Eritrosit.....	15
2.2.2 Oksidan dan antioksidan dalam eritrosit.....	15
2.2.3 Dampak oksidan terhadap tubuh.....	20

2.3 Vitamin C.....	23
2.3.1 Struktur vitamin C.....	23
2.3.2 Fungsi vitamin C.....	24
2.4 Vitamin E.....	25
2.4.1 Struktur vitamin E.....	25
2.4.2 Fungsi vitamin E.....	26
2.5 Kombinasi vitamin E dan vitamin C	28
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN...	29
3.1 Dasar Teori.....	29
3.2. Kerangka Konseptual Penelitian.....	32
3.3 Hipotesis Penelitian.....	33
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	34
4.1 Rancangan Penelitian	34
4.2 Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Tehnik Pengambilan Sampel.....	34
4.3 Variabel Penelitian.....	35
4.3.1 Klasifikasi variabel	35
4.4. Bahan Penelitian.....	36
4.4.1 Hewan coba	36
4.4.2 Rokok.....	36
4.4.3 Antioksidan	36
4.4.4 Pakan dan air minum.....	37
4.4.5 Pereaksi pemeriksaan SOD	37
4.5 Instrumen Penelitian	37
4.5.1 Peralatan untuk perlakuan	37
4.5.2 Peralatan untuk analisis aktivitas enzim SOD.....	38
4.6 Prosedur Penelitian.....	38
4.6.1 Tahap pra perlakuan.....	38
4.6.2 Tahap perlakuan.....	38
4.6.3 Tahap analisis sampel.....	40

4.7 Lokasi dan Waktu Penelitian	41
4.7.1 Lokasi penelitian.....	41
4.7.2 Waktu penelitian.....	41
4.8 Cara Analisis Data.....	41
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA.....	42
5.1 Hasil Uji Deskriptif.....	42
5.2 Hasil Uji Normalitas Variabel Tergantung.....	43
5.3 Hasil Uji Homogenitas Variabel tergantung.....	44
5.4 Hasil Uji Univariate Test aktivitas enzim SOD eritrosit antar kelompok pelakuan.....	44
5.5 Hasil Analisis Kandungan Asap Rokok.....	45
BAB 6 PEMBAHASAN.....	46
6.1 Pengaruh Suplementasi Vitamin E & C Terhadap Aktifitas SOD....	46
6.2 Analisis Kandungan Asap Rokok.....	49
BAB 7 KESIMPULAN	50
7.1 Kesimpulan.....	50
7.2 Saran.....	50
DAFTAR PUSTAKA.....	51

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1. Kandungan asap rokok.....	10
Tabel 5.1 Hasil uji deskriptif variabel aktivitas enzim SOD eritrosit dalam satuan Unit/ml.....	42
Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas Distribusi variabel enzim SOD eritrosit.....	43
Tabel 5.3 Hasil <i>Univariate test</i> penurunan aktivitas enzim SOD eritrosit antar kelompok Perlakuan.....	44



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Struktur vitamin C.....	23
Gambar 2.2. Struktur vitamin E.....	25
Gambar 2.3. Peranan vitamin E terhadap radikal bebas.....	27
Gambar 2.4. Interaksi dan sinergisme antara sistem antioksidan yang bekerja dalam fase lipid sel dan fase aquoeus.....	28
Gambar 4.1. Alur Penelitian.....	40
Gambar 5.1 Rerata SOD tiap Kelompok.....	43

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Penghitungan besar sampel.....	56
Lampiran 2. Prosedur Pemeriksaan SOD Eritrosit.....	57
Lampiran 3 Kandungan Minyak Kelapa.....	59
Lampiran 4. Komposisi Pakan Tikus.....	60
Lampiran 5. Hasil Analisis Aktivitas Enzim SOD	61
Lampiran 6. Sketsa “Smoking Pump”.....	62
Lampiran 7. Hasil Pemeriksaan Komposisi Asap Rokok	63
Lampiran 8. Perhitungan Statistik.....	64

DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH

ADP	: <i>Adenosin Diphosphate</i>
ATP	: <i>Adenosin Triphosphate</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 Tetraacetic Acid</i>
GSHPx	: <i>Glutathion Peroxydase</i>
GSH	: <i>Glutathion (Reduced)</i>
GSSG	: <i>Glutathion (Oxidized)</i>
Hb	: <i>Haemoglobine</i>
HCl	: <i>Hydrochloric Acid</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>
NTB	: <i>Nitroblue Tetrazolium</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RNS	: <i>Reactive Nitrogen Species</i>
SOD	: <i>Superoxyde dismutase</i>
TCA	: <i>Trichloroacetic Acid</i>
XO	: <i>Xanthine Oxidase</i>
XH	: <i>Xanthine Dehydrogenase</i>
•R	: <i>Alkyl Radical</i>
•NO, •NO ₂	: <i>Nitric Oxide Radicals</i>
ONOO ⁻	: <i>Peroxynitric Ionic</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Rokok mempunyai hubungan erat dengan terjadinya beberapa penyakit, terutama penyakit kanker paru, emfisema dan bronkhitis kronis. Selain itu merokok juga merupakan salah satu faktor resiko terjadinya aterosklerosis.(Halliwel, 1999). Kebiasaan merokok pada umumnya sulit dihentikan, karena perokok beresiko ketagihan. Hal ini ditunjang dengan adanya pariwisata yang menampilkan bahwa seorang perokok nampak lebih jantan, tampan dan sehat.

Asap rokok yang dihisap oleh perokok disebut asap utama (*main stream smoke*), sedangkan asap yang keluar dari ujung rokok yang terbakar dan dihisap oleh orang yang ada disekitar perokok adalah asap sampingan (*side stream smoke*) (Stafford & Becker, 1996). Perokok pasif yang sering disebut sebagai *Environmental Tobacco Smoker* (ETS) akan menghisap asap rokok yang dihembuskan keluar oleh perokok aktif. Hal ini biasanya terjadi didalam ruangan tertutup seperti didalam gedung bioskop, ruangan kantor, dan tempat yang berada dalam lingkungan perokok. Yang termasuk dalam kelompok perokok pasif ini adalah janin dalam kandungan ibu perokok, anak-anak dari orang tua perokok, dan orang dewasa bukan perokok yang berada dalam lingkungan perokok.

Asap rokok merupakan aerosol heterogen dari pembakaran tembakau dan pembungkusnya. Setiap batang rokok mengandung lebih dari 4000 jenis bahan kimia,



400 diantaranya beracun dan kira-kira 43 diantaranya bersifat karsinogenik (Tjandra Yoga, 2001). Bahan-bahan kimia yang ada dalam rokok antara lain (Halliwel, 1999):

1. Nikotin, yang merangsang sekresi adrenalin sehingga menyebabkan jantung berdenyut lebih cepat dan bekerja lebih kuat.
2. Karbon monoksida, merupakan gas yang berbahaya yang dapat menggantikan oksigen sebanyak 15 % yang seharusnya dibawa oleh eritrosit.
3. Tar, bersifat karsinogenik yang berisi *benzo(a) pyrene*, *nitrosamine* dan *β naphthylamine*, kadmium , *dibenzacridine*, dll.
4. Radikal bebas , seperti radikal *nitric oxide* (\bullet NO dan \bullet NO₂) dll..

Radikal bebas merupakan oksidan yang berbahaya karena memiliki elektron yang tidak berpasangan sehingga cenderung untuk menarik elektron molekul lain. Sifat ini menyebabkan radikal bebas menjadi sangat reaktif yang dapat mengakibatkan terjadinya reaksi berantai dengan menghasilkan senyawa radikal bebas yang baru. (Yueniwati, 2000). Dampak negatif radikal bebas antara lain mengganggu integritas sel dan dapat bereaksi dengan komponen sel, yaitu : (1) komponen struktural, antara lain molekul-molekul penyusun membran sel yang dikenal dengan peroksidasi lipid yang menghasilkan senyawa toksik terhadap sel, seperti malondialdehida (MDA), (2) fungsional, antara lain protein (termasuk enzim) dan DNA, yang akhirnya akan terjadi kerusakan sel. (Widjaya, 1999).

Antioksidan merupakan senyawa-senyawa yang dapat meredam dampak negatif suatu oksidan, termasuk didalamnya enzim-enzim dan protein-protein pengikat logam.

Berdasarkan reaksinya terhadap oksidan, antioksidan dapat dibagi menjadi dua golongan, yaitu :

- a. Antioksidan pencegah (*preventive antioxidants*), akan mencegah terjadinya reaksi berantai terutama yang disebabkan radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$), yaitu radikal yang paling berbahaya. Yang termasuk antioksidan jenis ini adalah transferin, ferritin, seruloplasmin, albumin, ion *superoxide dismutase* (SOD), glutathion peroksidase.
- b. Antioksidan pemutus rantai (*chain breaking antioxidants*), akan memutus rantai reaksi menjadi senyawa non radikal atau radikal yang lebih stabil. Yang termasuk antioksidan jenis ini adalah tokoferol (vitamin E), asam askorbat (vitamin C), β -karoten, glutathion dan sistein (Suryohudoyo, 2000)

Vitamin E merupakan antioksidan yang bekerja pada membran sel yang memerlukan tekanan oksigen yang tinggi, sedangkan vitamin C bekerja pada sitosol (Suryohudoyo, 2000) (Murray, 1999) dan secara ekstrasel (Widjaya, 1999). Dengan mekanisme kerja yang berbeda, jika kedua vitamin ini digunakan bersamaan diharapkan akan memberikan efek yang optimal dalam menghadapi serangan *Reactive Oxygen Species* (ROS).

Aktivitas radikal bebas pada suatu organisme dapat diketahui dengan pemeriksaan aktivitas enzim antara lain enzim SOD dan atau kadar hasil peroksidasi lipid seperti MDA. Aktivitas enzim SOD dapat menurun dan hilang, bila terjadi kerusakan pada enzim SOD sendiri atau DNA / gen penyangganya akibat aktivitas radikal bebas (Suryohudoyo, 2000).

Paparan asap rokok yang mengandung tar, nikotin, radikal bebas dan karbon monoksida terbukti dapat meningkatkan aktivitas radikal bebas pada beberapa sel tubuh, seperti membran sel endotel pembuluh darah, epitel paru, lensa mata dan neuron (Halliwell, 1987), serta dapat ditunjukkan dengan adanya penurunan aktivitas enzim *superoxide dismutase* (SOD) sampai 1100 % pada sel hepar tikus yang dipapar asap rokok kretek selama 10 minggu (Yueniwati & Ali, 1998) (Yueniwati, 2000). Pada penelitian ini menggunakan *Rattus novergicus* sebagai hewan coba, mengacu pada hewan coba yang dipakai Yueniwati (2000) yang meneliti pengaruh paparan asap rokok terhadap aktivitas enzim SOD.

Aktivitas enzim SOD dapat ditentukan dari eritrosit (Harjanto, 2002) atau jaringan lain, misalnya sel hati (Yueniwati, 2000). Eritrosit merupakan sel darah yang tidak memiliki inti, sehingga bila aktivitas enzim SOD ditentukan dari eritrosit akan mencerminkan keadaan yang sebenarnya. Apabila aktivitas SOD dalam eritrosit menurun akibat radikal bebas, tidak akan terjadi pembentukan enzim SOD baru oleh ekspresi gen yang menyandi protein SOD. Vitamin E berperan efektif bila berada pada konsentrasi oksigen yang tinggi dan cenderung terkonsentrasi dalam struktur lipid yang terkena tekanan parsial oksigen yang tinggi, misalnya pada membran eritrosit (Murray, 1999).

Berdasarkan latar belakang tersebut diatas, maka peneliti menganggap perlu melakukan penelitian mengenai pengaruh suplementasi vitamin E dan C terhadap aktifitas radikal bebas yang berasal dari asap rokok. Pada penelitian ini dipakai rokok kretek karena menurut Djahhuri (1991), rokok kretek mengandung komponen yang lebih kompleks dibandingkan rokok putih sehingga akan mempunyai kemampuan memicu radikal bebas yang lebih tinggi dibandingkan rokok putih.

Dengan pemakaian kombinasi vitamin E dan C sebagai antioksidan yang bekerja di tempat berbeda (vitamin E pada membran eritrosit dan vitamin C pada sitosol), akan didapatkan kerjasama yang baik dalam melawan radikal bebas (ROS) dari asap rokok. Karena keterbatasan dana, parameter yang diteliti hanya aktivitas enzim SOD dalam eritrosit.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka masalah dapat dirumuskan sebagai berikut :

“Apakah suplementasi vitamin E dan vitamin C dapat menghambat penurunan aktivitas enzim SOD pada eritrosit tikus yang terpapar asap rokok kretek?”

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Untuk mempelajari pengaruh suplementasi vitamin E dan vitamin C terhadap aktivitas enzim pada tikus yang terpapar asap rokok kretek.

1.3.2. Tujuan khusus

Mempelajari pengaruh suplementasi vitamin E dan vitamin C terhadap aktivitas enzim SOD-dalam eritrosit tikus uji yang terpapar asap rokok kretek.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan , sehingga hasil penelitian ini dapat menjadi acuan untuk penelitian lebih lanjut tentang pengaruh suplementasi vitamin E dan vitamin C pada manusia.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Rokok

2.1.1 Asal usul merokok

Merokok mempunyai sejarah yang panjang dan sangat bervariasi. Kata *tobacco* (tembakau) yang merupakan bahan utama dari rokok berasal dari kata indian *tobago*. Orang Indian dari benua Amerika dikenal sebagai orang pertama yang menanam dan menggunakan tembakau untuk dirokok, dihisap dan dikunyah. Tembakau adalah tanaman genus *Nicotiana* dan termasuk keluarga *Solanaceae*. Pada tahun 1550, pelaut yang pulang dari Dunia Baru (Amerika) membawa dan memperkenalkan tembakau ke Spanyol dan Portugis, kemudian menjalar ke negara-negara lain. Tembakau pada tahun 1565 diperkenalkan di Inggris, dan dari sana dengan cepatnya menyebar ke daratan Eropa, sedangkan negara-negara Rusia, Turki, Persia, Afrika, Filipina, Jepang dan Tiongkok baru mengenal rokok pada permulaan abad 17 (Sumintarti, 1997).

Di Indonesia sendiri tidak diketahui dengan pasti, kapan rokok mulai diperkenalkan. Setelah abad ke 17, pemakaian tembakau meluas dan mempunyai arti cukup penting dalam dunia perdagangan. Tembakau mempunyai peranan yang cukup strategis dalam penghasilan negara di Indonesia. Tembakau merupakan salah satu sumber penerimaan dalam negeri yaitu cukai, maupun sebagai salah satu komoditi ekspor non migas. Industri tembakau sangat besar dalam penyerapan tenaga kerja, artinya mulai dari

penanaman sampai pengolahannya di pabrik hingga menjadi rokok, banyak memerlukan tenaga kerja serta tidak melupakan penghasilan para petani tembakau (Sumintarti, 1997)

Tembakau digunakan dalam bentuk rokok sigaret, cerutu, tembakau pipa dan sebagai bubuk cerutu. Di Indonesia dikenal beberapa macam sigaret antara lain rokok putih, rokok kretek, rokok kelembak, rokok kemenyan dan lain-lain. Pada proses pembuatan rokok untuk menghilangkan rasa pahit dari tembakau yang berlebihan serta menimbulkan aroma yang menyegarkan telah ditambah bermacam-macam rempah, antara lain bumbu kimiawi, cengkeh, kelembak dan kemenyan. Sejak awal abad ke-20, terjadi perubahan cara merokok dimana orang lebih menyukai rokok sigaret daripada menghisap cerutu, pipa atau menghisap bubuk tembakau dengan demikian maka menyebar luaslah kebiasaan merokok. Hal ini ditunjang oleh industri rokok yang dalam pariwarnya selalu memperlihatkan bahwa perokok nampak lebih jantan, tampan dan sehat, sehingga kebiasaan merokok dengan cepat melanda dunia, tak ubahnya dengan epidemi. Kebiasaan merokok menjalar dari satu negara ke negara lain, dari satu benua ke benua lain, bahkan antara kelompok masyarakat yang berbeda dalam satu negara. Kebiasaan merokok menjadi sesuatu yang dapat dinikmati oleh umat manusia di seluruh penjuru dunia, bahkan siap dinikmati kapan saja dan oleh siapa saja. (Sumintarti, 1997)

2.1.2. Perokok pasif

Orang yang bukan perokok, tetapi berada di sekitar perokok dan ikut menghirup asap rokok beserta zat-zat yang terkandung di dalamnya disebut perokok pasif. Keadaan ini biasanya terjadi di ruangan umum yang tertutup seperti di dalam gedung bioskop, ruangan kantor dan tempat yang berada dalam lingkungan perokok. (Sumintarti, 1997)

Efek samping asap rokok yang merugikan bagi perokok pasif yaitu dapat meningkatkan resiko terjadinya penyakit paru dan kanker, seperti halnya yang terjadi pada perokok dengan segala akibat-akibat yang tidak berbeda. Yang termasuk dalam kelompok perokok pasif antara lain adalah janin dalam kandungan ibu perokok, anak-anak dari orang tua perokok, orang dewasa bukan perokok yang berada dalam lingkungan perokok. (Sumintarti, 1997)

2.1.3. Kandungan asap rokok

Asap rokok mengandung bahan-bahan kimia lebih dari 4000 macam, merupakan campuran yang terdiri dari bentuk partikel padat dan bentuk gas, 400 diantaranya beracun dan kira-kira 43 senyawa yang bersifat karsinogenik (Tjandra Yoga, 2001). Beberapa efek campuran bahan-bahan kimia yang ada dalam asap rokok terhadap jaringan tubuh terdapat pada tabel dibawah ini (Halliwell, 1999):

Kadar bahan kimia di dalam asap rokok yang bisa diperiksa di Balai Besar Pengawasan Obat dan Makanan Indonesia, ada tiga macam yaitu tar, nikotin dan karbon monoksida

Tabel 2.1 Kandungan asap rokok

Bahan	Efek
<u>Bahan partikel</u> Tar Nikotin Logam (kadmium, timbal, nikel, besi, krom, arsenik) <i>Phenols / semiquinones / quinones</i> <i>Carcinogenic hydrocarbons</i> <i>(Benzo(a)pyrene, benzathracene, chrysene)</i>	Karsinogen Stimulator, depresor ganglionik Karsinogen dan iritan Karsinogen dan iritan Karsinogen
<u>Bahan Gas</u> Karbon monoksida Asam hidrosianik NO•, NO ₂ • <i>Volatile aldehydes (etanal, formaldehyde, acrolein)</i> Amonia <i>Benzene vapour</i> Aceton Vinilklorida, <i>Unsaturated hydrocarbon (butadiene, isoprene)</i> Karbon dioksida	Gangguan transpor dan penggunaan O ₂ Siliotoksin dan iritan Karsinogen Siliotoksin dan iritan Siliotoksin dan iritan Siliotoksin dan iritan Siliotoksin dan iritan Karsinogen Karsinogen

Sumber : Halliwell, 1999

a. Tar

Tar terbentuk selama pemanasan tembakau. Tar merupakan kumpulan berbagai zat kimia yang berasal dari daun tembakau sendiri, maupun yang ditambahkan dalam proses pertanian dan industri sigaret. Tar adalah hidrokarbon aromatik polisiklik yang ada dalam asap rokok, tergolong zat karsinogen yaitu zat yang dapat menimbulkan kanker. Kadar tar yang terkandung dalam asap rokok inilah yang berhubungan dengan resiko timbulnya kanker. (Sumintarti, 1997). Dari tar ini bila diidentifikasi kandungannya dengan menggunakan kromatografi akan didapatkan senyawa-senyawa : naftilamin, *pyrene*, *benzo(a)pyrene*, *urethane*, *dibenzacridine*, kadmium, *dimethylnitrosamine* yang

bersifat karsinogen. Bahan-bahan karsinogen ini dapat memicu terbentuknya senyawa ROS didalam tubuh.

Dengan adanya aldehida, khususnya akrolein, aldehida tak jenuh lain, asetaldehida, dan formalin dapat menyebabkan deplesi GSH dan modifikasi protein grup -SH dan grup -NH₂, apabila protein tersebut jenis enzim maka enzim tersebut akan kehilangan sifat katalitiknya.

Hydroquinone / quinone dalam tar dapat menembus paru, berdifusi pada membran sel, dan ikut dalam reaksi redoks yang terjadi pada ekstraseluler dan intraseluler sehingga akan membentuk senyawa *semiquinone*, H₂O₂ dan O₂^{-•} (Halliwel, 1999)

b. Nikotin

Nikotin adalah bahan alkaloid toksis yang terdapat dalam tembakau. Banyak sigaret berisi kira-kira 8 -9 mg nikotin dan perokok umumnya mendapatkan kira-kira 1-3 mg nikotin. Nikotin diabsorpsi melalui paru-paru dan kecepatan absorpsinya hampir sama dengan masuknya nikotin secara intra vena. Nikotin masuk ke dalam otak dengan cepat dalam waktu kira-kira 10 detik, dapat melewati barrier di otak dan diedarkan ke seluruh bagian otak, kemudian menurun secara cepat. Efek bifasik dari nikotin pada dosis rendah menyebabkan rangsangan ganglionik yang merupakan eksitasi, tetapi pada dosis tinggi menyebabkan blokade ganglionik setelah eksitasi sepiantas. (Sumintarti, 1997)

Pada perokok sigaret, kadar nikotin dalam darah naik secara cepat dan mencapai puncaknya pada waktu selesai merokok. Nikotin pada dosis rendah (seperti pada saat awal merokok), efek kardiovaskuler nampak melalui sistem saraf pusat. Akibatnya terjadi

rangsangan simpatik dengan meningkatnya tekanan darah dan denyut jantung. Pada dosis yang lebih tinggi nikotin langsung bekerja pada sistem saraf perifer, menimbulkan rangsangan ganglionik dan pelepasan katekolamin. Dengan dosis yang sangat tinggi, nikotin dapat menyebabkan hipotensi dan menurunnya denyut jantung melalui blokade ganglionik perifer dan terjadi efek depresi langsung melalui kerja di otak. (Sumintarti, 1997). Kadar katekolamin dalam serum, telah diteliti akan meningkat pada keadaan tekanan rendah, suhu dingin, tindakan bedah, perdarahan, dan berbagai macam stres (termasuk stres oksidatif) (Prasetyo, 2002). Dengan peningkatan kadar katekolamin, secara tidak langsung akan menghasilkan senyawa oksigen reaktif (ROS).

c. Karbon monoksida

Karbon monoksida merupakan gas beracun yang tidak berwarna, kandungannya didalam asap rokok 2 – 6 %. Karbon monoksida dari asap rokok masuk ke dalam darah melalui alveoli paru-paru, mempunyai afinitas dengan hemoglobin (Hb) sekitar 200 kali lebih kuat dibanding afinitas oksigen terhadap hemoglobin, dan mempunyai *half life* 4 –7 jam dalam tubuh. Sebanyak 10 % dari seluruh hemoglobin dapat ditemukan terisi oleh karbon monoksida dalam bentuk COHb (*Carboxy Hemoglobin*) yang berakibat sel darah merah akan kekurangan oksigen. Keadaan kekurangan oksigen (hipoksia) dapat menyebabkan terbentuknya senyawa ROS dalam tubuh, jika diberikan reperfusi oksigen. Dengan adanya oksigen dalam jumlah banyak, oksigen akan mengalami reduksi univalen yang menyebabkan terbentuknya ion superoksida dan metabolit oksigen radikal lainnya. Xantin oksidase yang tereduksi akan mengalami oksidasi univalen dan akan terbentuk ion superoksida ($O_2^{\cdot-}$). (Siregar, 1992) Kekurangan oksigen jangka panjang dapat

menyebabkan pembuluh darah akan terganggu karena menyempit dan mengeras. Bila hal ini menyerang pembuluh darah jantung dapat menyebabkan terjadinya serangan jantung. (Sumintarti, 1997).

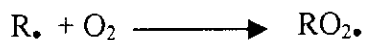
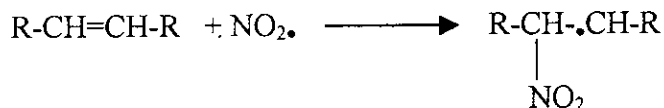
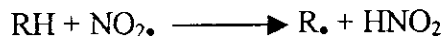
2.1.4. Rokok dan radikal bebas

Selain radikal bebas dapat ditemukan dalam asap rokok, asap rokok juga mengandung substansi yang dapat memicu terbentuknya radikal bebas dalam tubuh, misalnya dimetilnitrosamin, benzo(a)pirena dll. (Halliwell, 1987 dan 1991). Menurut Djamhuri (1991), rokok kretek mengandung komponen yang lebih kompleks dari rokok putih sehingga mempunyai kemampuan memicu radikal bebas yang lebih kompleks dibandingkan rokok putih.

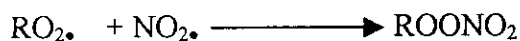
Keberadaan radikal NO (\bullet NO) dalam fase gas asap rokok dapat ditemukan dengan teknik *spin trapping* dengan menggunakan alat *electrical spin resonance* (ESR). Radikal NO terbentuk dari donor \bullet NO seperti kompleks \bullet NO amina dan reaktan lain seperti *nitrogen oxide* (NOx). (Shinagawa K et al, 1998)

Sebuah penelitian yang dilakukan oleh Flicker TM (2001) tentang komparasi radikal bebas dari asap rokok beberapa merk dengan sistem model HPLC, ternyata radikal bebas yang ditangkap oleh kromatogram asap rokok mempunyai nilai bervariasi antara 54 sampai 185 nmol radikal alkil (\bullet R) per batang rokok.

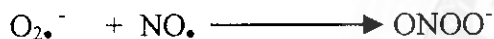
Reaksi-reaksi yang terjadi adalah (Halliwell, 1999) :



Reaksi radikal bebas ini dapat diredam apabila radikal bebas ini saling bereaksi :



Adanya $\text{RO}_2\cdot$ dan oksida-oksida nitrogen dapat menyebabkan kerusakan langsung, merangsang peroksidasi lipid dan mengoksidasi basa DNA.



Reaksi ion superoksida dengan oksida nitrogen yang terbentuk dari tar akan menghasilkan ion peroksinitrit

2.2. Darah

Darah tersusun dari plasma dan sel-sel darah yaitu eritrosit (sel darah merah), leukosit (sel darah putih) dan keping darah (trombosit). Penelitian dengan menggunakan sel darah banyak dilakukan, karena sel darah mudah diperoleh dan memiliki makna fungsional yang penting dan terlibat dalam banyak proses terjadinya penyakit. (Murray , 1999)

2.2.1. Eritrosit

Fungsi utama eritrosit adalah mengangkut O₂ dari paru ke jaringan dan mengembalikan CO₂ dari jaringan ke paru. Fungsi ini dikerjakan oleh hemoglobin. Eritrosit mempunyai Ø 8 µm, bentuk bikonkaf, dengan umur kurang lebih 120 hari. Pembentukan eritrosit selama pertengahan trisemester pertama kehamilan terutama di hepar, kemudian fase berikutnya sampai janin lahir, sumsum tulang merupakan organ utama produsen eritrosit. Pengaturan eritropoesis berdasarkan mekanisme umpan balik, prosesnya akan menurun bila kadar eritrosit dalam sirkulasi meningkat di atas normal dan sebaliknya proses pembentukan akan meningkat jika terjadi anemia. (Darmawan, 1996).

Membran eritrosit merupakan lapisan lipid bipolar yang mengandung protein struktural, kontraktile, banyak enzim serta antigen permukaan. Kira-kira 50 % adalah protein, 40 % lipid dan sampai 10 % karbohidrat. Lipid terdiri dari 60 % fosfolipid, 30 % lipid netral (terutama kolesterol) dan 10 % glikolipid. Fosfolipid dan glikolipid adalah struktur dengan gugus polar pada permukaan eksterna dan interna, serta gugus nonpolar pada tengah membran. Karbohidrat hanya terdapat pada permukaan eksterna sedangkan protein diduga terdapat pada bagian perifer maupun integral yang menembus lipid bilayer. Satu dari protein tersebut yaitu spektrin merupakan struktur pada permukaan dalam yang berfungsi untuk mempertahankan bentuk bikonkaf. (Darmawan, 1996)

2.2.2. Oksidan dan antioksidan dalam eritrosit

A. Oksidan

Dalam pengertian ilmu kimia, oksidan adalah senyawa penerima elektron, yaitu senyawa-senyawa yang dapat menarik elektron, sedangkan radikal bebas adalah atom atau molekul (sekumpulan atom) yang memiliki elektron yang tak berpasangan (*unpaired electron*) (Suryohudoyo, 2000).

Beberapa oksidan kuat (ROS) bisa dihasilkan selama proses metabolisme dalam sel darah maupun sebagian besar sel tubuh lainnya. Oksidan kuat ini adalah ion superoksid ($\bullet\text{O}_2^-$), hidrogen peroksida (H_2O_2), radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$), radikal peroksil ($\text{HOO}\bullet$) dan singlet oksigen ($^1\text{O}_2$). Radikal yang terakhir merupakan molekul yang reaktif dan dapat bereaksi dengan protein, asam nukleat, lipid dan molekul lainnya untuk mengubah strukturnya serta menimbulkan kerusakan jaringan. (Murray, 1999)

Superoksida terbentuk karena adanya proses autooksidasi Hb (yang besarnya 3 % autooksidasi perhari) menjadi methemoglobin. Superoksid secara spontan mengalami dismutasi sehingga terbentuk H_2O_2 dan O_2 ; akan tetapi kecepatan reaksi yang sama akan mengalami peningkatan yang luar biasa akibat kerja *enzim superoksid dismutase* (SOD) (Murray K, 1999). Ion Fe^{2+} pada Hb rentan terhadap oksidasi oleh oksidan (ion superoksid), dimana terbentuk metHb yang tidak mampu mengangkut oksigen. Pada keadaan normal hanya dijumpai sedikit metHb di dalam darah, karena eritrosit memiliki sistem yang efektif untuk mereduksi kembali Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} . (Darmawan, 1996) . Ion superoksida terbentuk melalui beberapa cara, antara lain :

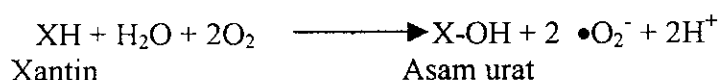
- Sebagai reaksi samping yang melibatkan Fe^{2+} , misalnya : pada proses fosforilasi oksidatif, proses oksigenasi hemoglobin, proses hidroksilasi oleh

enzim monoxygenase (sitokrom P450 dan sitokrom b4), dan ion Fe^{2+} dengan reaksi $Fe^{2+} + O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \bullet O_2^-$

- Reaksi yang dikatalisis oleh *NADPH/NADH oksidase* yang terdapat dalam mitokondria.



- Reaksi yang dikatalisis oleh *enzim xantin oksidase*



Hidrogen peroksida terbentuk karena aktifitas-aktifitas *enzim oksidase* yang terdapat pada retikulum endoplasmik dan peroksisom. Enzim ini mengkatalisis reaksi :



Selain itu, hidrogen peroksida merupakan oksidan yang kuat dan dapat mengoksidasi berbagai senyawa yang terdapat di dalam sel, misalnya glutation.



Pada eritrosit dan beberapa jaringan, *enzim glutation peroksidase* yang mengandung selenium (Se) mengkatalisis H_2O_2 , sehingga mencegah peroksidasi lipid dan menghambat terjadinya oksidasi Hb menjadi metHb. (Darmawan, 1996) (Murray, 1999). Daya rusak hidrogen peroksida bukan hanya karena senyawa tersebut merupakan oksidan yang kuat, tetapi H_2O_2 juga dapat menghasilkan radikal hidroksil bila H_2O_2 bereaksi dengan logam transisi seperti Fe^{2+} dan Cu^+

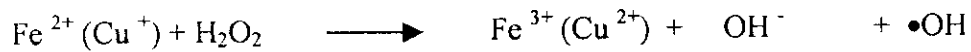


(Reaksi Fenton)

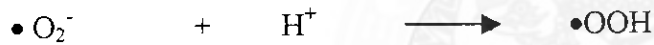
Selain terbentuk dari reaksi Fenton diatas, **radikal hidroksil** dapat juga terbentuk dari reaksi ion superoksida dan hidrogen peroksida (reaksi Haber Weiss).



Reaksi ini memerlukan ion Fe^{3+} dan Cu^{2+} dan diperkirakan melalui 2 tahap, yaitu :



Radikal peroksil terbentuk dari ion superoksida dengan asam . Radikal ini sangat reaktif dan akan membentuk radikal baru serta H_2O_2



Singlet Oksigen, merupakan bentuk oksigen yang jauh lebih reaktif dibandingkan oksigen “biasa”. Singlet oksigen ini terbentuk dari reaksi-reaksi yang dikatalis oleh enzim-enzim tertentu, antara lain :

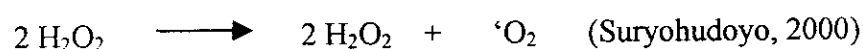
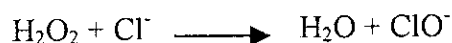
- a. *Enzim mono-oksigenase* yang menggunakan sitokrom P450 apabila enzim tersebut menggunakan suatu peroksida sebagai substrat :



- b. *Enzim prostaglandin endoperoksidase sintetase*, suatu enzim yang berperan dalam pembentukan prostaglandin dari asam arakidonat :



- c. Reaksi yang dikatalis oleh *enzim mieloperoksidase* apabila ion hipoklorit yang terjadi bereaksi dengan H_2O_2 yang kedua:



B. Antioksidan

Senyawa antioksidan adalah senyawa-senyawa pemberi elektron, dalam arti yang lebih luas adalah : senyawa-senyawa yang dapat meredam dampak negatif oksidan, termasuk diantaranya enzim-enzim dan protein pengikat logam. Dalam meredam dampak negatif oksidan diterapkan dua strategi:

1. Mencegah terhimpunnya senyawa-senyawa oksidan secara berlebihan
2. Mencegah reaksi rantai lebih lanjut.

Berdasarkan dua mekanisme pencegahan dampak negatif oksidan, antioksidan dapat dibagi menjadi dua golongan yaitu (Suryohudoyo, 2000):

1. Antioksidan pencegah
2. Antioksidan pemutus rantai.

Eritrosit dilengkapi antioksidan berupa enzim seperti *copper-zink-superoxide dismutase (CuZn-SOD)*, glutathion peroksidase (GSH-Px), katalase (Cat), dan glutathion reduktase (Anderson, 1997) (Murray K et al, 1999).

Sintesis antioksidan yang berupa enzim dalam eritrosit ini terjadi selama *erythropoiesis*. Sedangkan pada eritrosit dewasa , enzim-enzim ini tidak disintesis lagi, hal ini berkaitan dengan hilangnya inti sel pada eritrosit dewasa (Beutler E et al,

1995). Sebagai peredam dampak negatif ROS dalam penelitian ini akan digunakan antioksidan golongan pemutus rantai, yaitu kombinasi vitamin C dan vitamin E.

2.2.3. Dampak oksidan terhadap tubuh

A. Dampak negatif.

Dampak negatif timbul karena senyawa ROS merupakan oksidan yang kuat dan mempunyai reaktifitas yang dapat merusak komponen-komponen sel yang penting untuk mempertahankan integritas dan kehidupan sel.

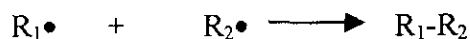
Diantara senyawa ROS yang lain, radikal hidroksil merupakan senyawa yang paling berbahaya karena reaktifitasnya sangat tinggi. Radikal hidroksil dapat merusak tiga jenis senyawa yang penting untuk mempertahankan integritas sel yaitu :

- **Terhadap membran sel**

Komponen terpenting membran sel adalah fosfolipid, glikolipid dan kolesterol. Dua komponen pertama mengandung asam lemak tak jenuh (asam linolet, linolenat dan arakidonat) yang sangat rawan terhadap serangan-serangan radikal, terutama radikal hidroksil. Radikal hidroksil dapat menimbulkan reaksi rantai yang dikenal dengan nama peroksidasi lipid.



Akibat dari rantai reaksi ini adalah terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa yang bersifat toksik terhadap sel, antara lain berbagai macam aldehida, seperti **malondialdehida (MDA)**, 9-hidroksi-nonanal serta bermacam-macam hidrokarbon seperti etana (C_2H_6) dan pentana (C_5H_{12}). Selain reaksi diatas dapat pula terjadi ikatan silang antara dua rantai asam lemak atau antara asam lemak dan rantai peptida (protein) yang timbul karena reaksi dua radikal :



Semuanya ini menyebabkan kerusakan parah membran sel yang membahayakan kehidupan sel. (Suryohudoyo, 2000)

- **Terhadap protein**

Oksidan dapat merusak protein karena dapat mengadakan reaksi dengan asam-asam amino yang menyusun protein. Diantara asam-asam amino penyusun protein yang paling rawan adalah sistein. Sistein mengandung gugusan sulfhidril (SH) dan justru gugusan inilah yang paling 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 aktifitasnya).(Suryohudoyo, 2000) (Siregar P, 1992)

- **Terhadap DNA**

Radikal bebas dapat menimbulkan berbagai perubahan pada DNA yang antara lain berupa : hidrosilasi basa timin dan sitosin, pembukaan inti purin dan pirimidin serta terputusnya rantai fosfodiester DNA.

Bila kerusakan tak terlalu parah, maka masih bisa diperbaiki oleh sistem perbaikan DNA. Namun apabila kerusakan terlalu parah, misalnya rantai DNA terputus diberbagai tempat, maka kerusakan tersebut tak dapat diperbaiki dan replikasi sel terganggu. Susahnya, perbaikan DNA ini justru menimbulkan mutasi, karena dalam memperbaiki DNA sistem perbaikan DNA cenderung membuat kesalahan, dan apabila mutasi ini mengenai gen-gen tertentu, maka mutasi tersebut dapat menimbulkan kanker.(Suryohudoyo, 2000)

B. Dampak positif

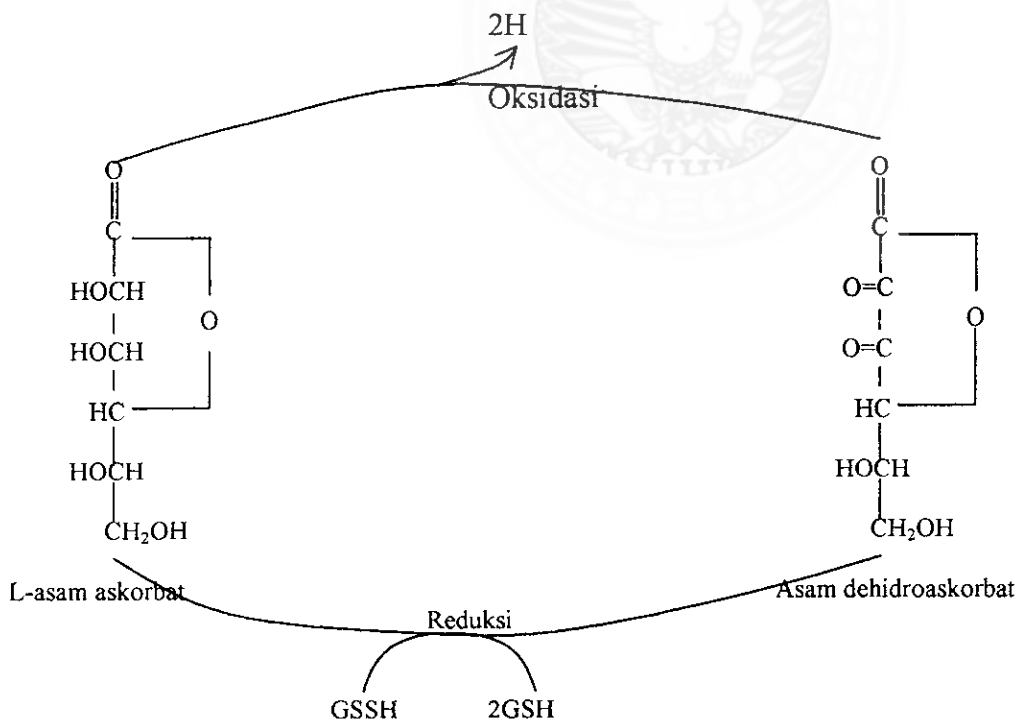
Oksidan yang dihasilkan oleh sel-sel khusus yang disebut sel radang seperti granulosit, monosit, dan makrofag mempunyai dampak positif dalam menghadapi serangan mikroorganisma. Namun oksidan tersebut selain dapat menghancurkan mikroorganisma, dapat pula merusak sel-sel jaringan tubuh sehingga apabila terjadi peradangan hebat yang melibatkan banyak sel radang, kerusakan jaringan tak dapat dihindarkan. (Suryohudoyo, 2000)

2.3. Vitamin C

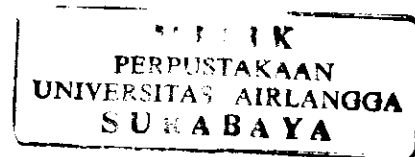
2.3.1. Struktur vitamin C

Vitamin C merupakan vitamin yang larut dalam air, banyak didapatkan dalam buah-buahan segar dan sayur-sayuran terutama sitrus, beri dan dari famili kubis. Ditemukan pertama kali oleh Sir Richard Hawkins pada abad 16 yang melaporkan bahwa jeruk / lemon adalah yang paling efektif dalam menyembuhkan pelaut-pelaut Inggris dari penyakit scorbut (Linder , 1992)

Vitamin C mempunyai 2 bentuk, yaitu asam askorbat (bentuk reduksi) dan asam dehidroaskorbat (bentuk oksidasi). Vitamin ini sangat tidak stabil pada pH netral atau alkali, juga terhadap panas tetapi sangat stabil terhadap asam dan selama penyimpanan sementara dalam keadaan dingin dan segar (Girindra, 1990)



Gambar 2.1 Struktur vitamin C (Girindra, 1990)



2.3.2. Fungsi vitamin C

Pada level molekuler, askorbat dan dehidroaskorbat mempunyai sifat pereduksi dan juga mempunyai sifat penting lainnya sebagai antioksidan yang mempengaruhi redoks-potensial tubuh (sebagai sumber *reducing equivalent* di seluruh tubuh) . Pada proses hidroksilasi yang menggunakan molekul oksigen dan sering mempunyai kofaktor Fe^{++} atau Cu^{++} , vitamin C ikut berperan sebagai :

1. Sumber elektron untuk mereduksi oksigen (misalnya sebagai kosubstrat)
2. Sebagai zat pelindung untuk memelihara status reduksi besi (Fe).

Reaksi hidroksilasi tersebut misalnya pada :

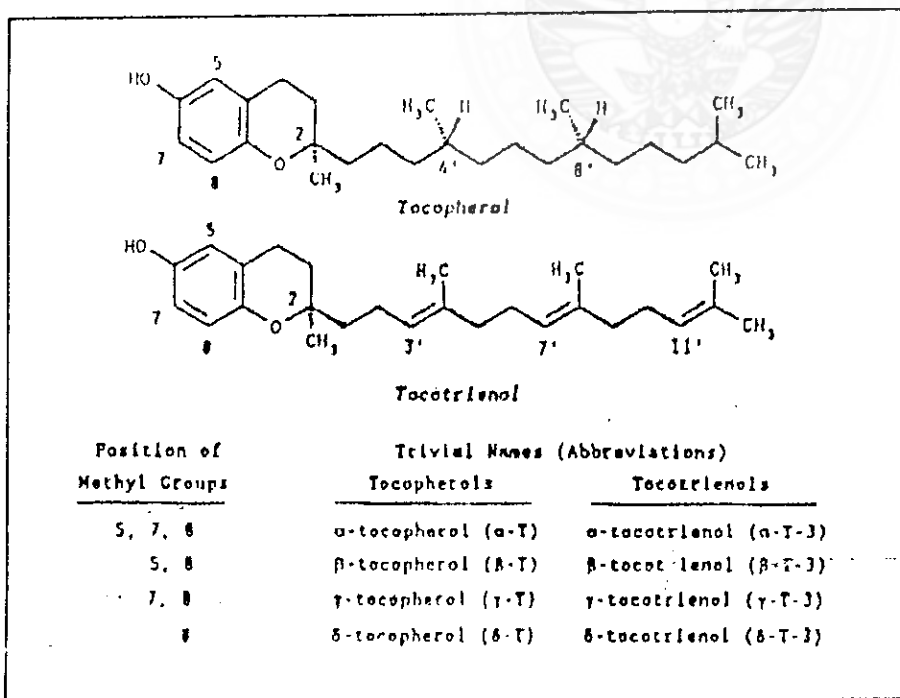
- Reaksi pembentukan hidroksiprolin dan hidroksilisin dalam sintesis prokolagen pada endoplasmik retikulum sel.
- Sintesis karnitin dari lisin yang penting dalam proses pengangkutan asam-asam lemak ke dalam mitokondria untuk mendapat proses oksidasi.
- Hidroksilasi tirosin dan mungkin pada pembentukan katekolamin dan serotonin-5-OH triptamin atau mungkin proses hidroksilasi hormon steroid, obat-obatan aromatik dan karsinogen melalui sistem mikrosomal oksigenase endoplasmik retikulum hati (Linder, 1992).

Kebutuhan vitamin C menurut RDA adalah 60 mg untuk orang dewasa, lebih banyak dalam kehamilan dan laktasi, dan untuk bayi dan anak-anak : 35-45 mg per hari. (Linder , 1992).Dosis vitamin C untuk tikus putih dihitung dari Ritchel (1974) serta Laurence & Bachranh (1964) yang dikonversi dari manusia 60 mg/hari x 0,018 {faktor konversi tikus (200 mg)} x 5 {konversi i.v menjadi p.o} = 5,4 mg/hari. Dosis penelitian adalah 4,5 mg / hari, sehingga dibawah dosis fisiologis.

2.4. Vitamin E

2.4.1. Struktur vitamin E

Vitamin E disebut juga tokoferol, merupakan vitamin yang larut dalam lemak yang banyak terdapat dalam minyak nabati (minyak jagung, minyak bunga matahari), kacang-kacangan (almond, kacang tanah), mentega, biji-bijian (gandum, beras pecah kulit) dan buah-buahan/ sayuran (muskmelon, pisang, wortel, tomat, brokoli). Vitamin ini mengandung cincin aromatik bergugus hidroksil dengan rantai samping isoprenoid, yang larut dalam lemak. (Girindra, 1990). Ada 4 jenis tokoferol, diantaranya yaitu : bentuk α , β , γ , δ yang dibedakan oleh letak berbagai grup metil pada cincin fenil pada rantai cabang molekul. Kebutuhan vitamin E menurut RDA adalah 30 IU/ hari untuk orang dewasa, dan 3-6 IU/ hari untuk bayi. (Linder , 1992)

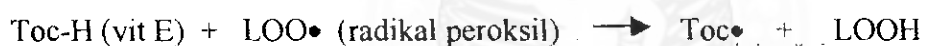


Gambar.2.3 Struktur vitamin E (Linder, 1992)

Vitamin E dapat berperan efektif bila berada dalam konsentrasi oksigen yang tinggi, oleh karena itu vitamin E cenderung terkonsentrasi dalam struktur lipid yang terkena tekanan parsial oksigen yang paling tinggi seperti pada membran eritrosit, membran respiratorius dan retina (Murray, 1999).

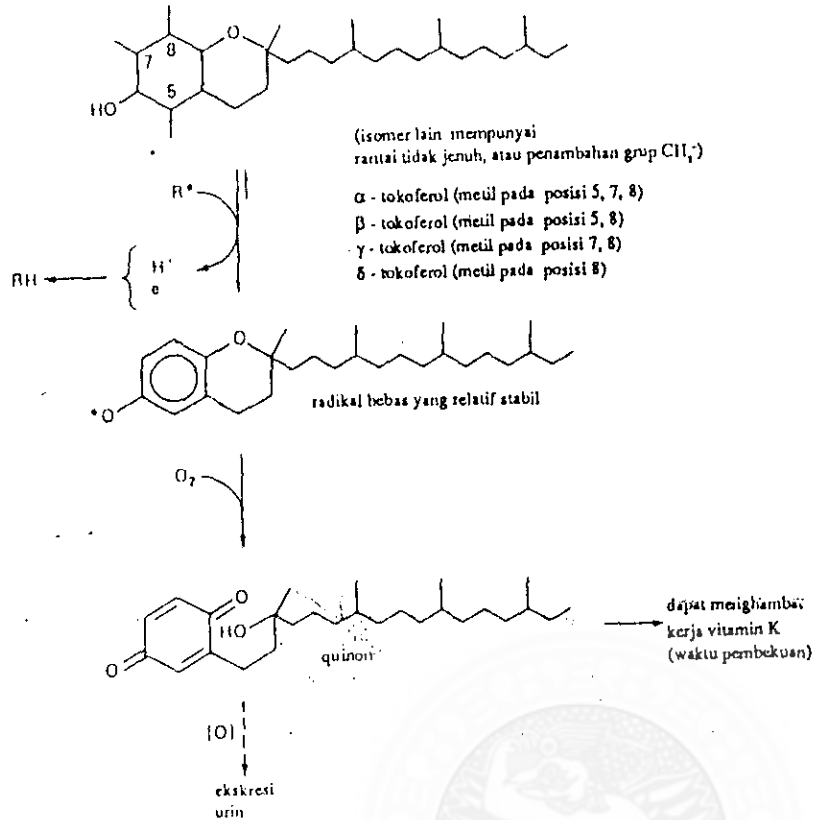
2.4.2. Fungsi vitamin E

Fungsi yang paling nyata dari vitamin E adalah antioksidan dan anti radikal bebas, terutama untuk asam lemak tidak jenuh pada fosfolipid dalam membran sel (Suryohudoyo, 2000).



Radikal vitamin E tidak terlalu reaktif, meskipun demikian perlu juga untuk dihilangkan. Ada dua cara untuk menghilangkan :

1. Radikal vitamin E mengalami reaksi-reaksi intramolekuler menghasilkan senyawa non radikal (Suryohudoyo, 2000) yang diperkirakan dapat dioksidasi lebih lanjut menjadi kuinon dan diekskresi melalui urin (Linder, 1992).



Gambar 2.4. Peranan vitamin E terhadap radikal bebas (Linder, 1992)

2. Radikal vitamin E bergeser ke arah permukaan membran selanjutnya akan bereaksi dengan vitamin C (Suryohudoyo, 2000).

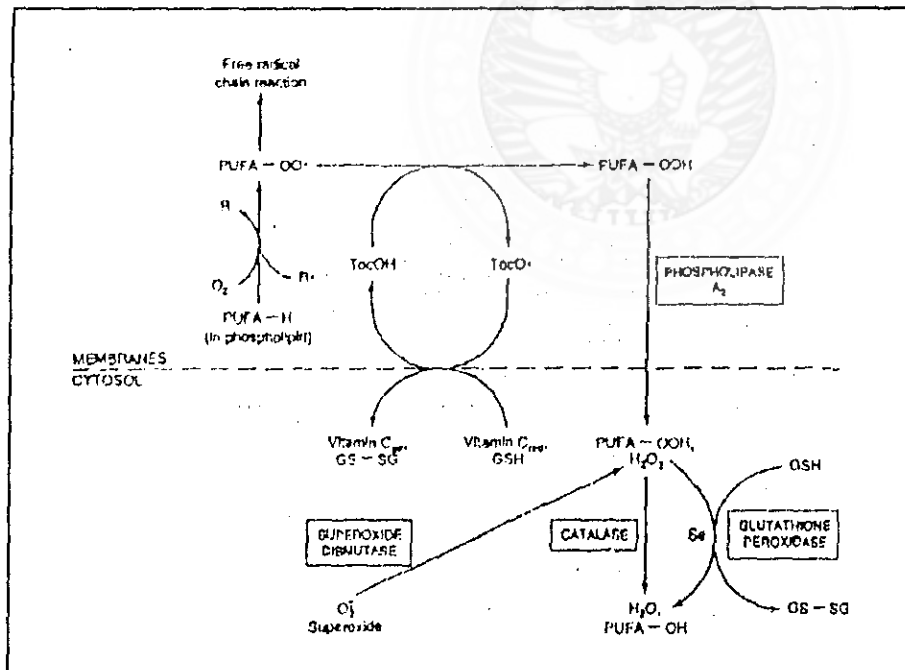


Fungsi vitamin E yang lain adalah menghambat dan memodifikasi pembentukan prostaglandin / tromboksan, terutama pada trombosit. Hal ini memungkinkan menurunkan pembentukan radikal bebas dari asam arakidonat dan meningkatkan produksi prostaglandin I₂ yang secara normal menghambat agregasi trombosit. (Linder, 1992).

2.5. Kombinasi vitamin E dan vitamin C

Dengan adanya kombinasi vitamin E dan vitamin C, akan menjadi grup antioksidan yang efektif, hal ini disebabkan masing-masing vitamin mempunyai keistimewaan tersendiri dan dapat bekerjasama dalam menghadapi ROS. Seperti yang sudah dibahas didepan, bahwa vitamin C akan bekerja dalam fase aquoeus dan vitamin E akan bekerja dalam fase lipid sel (Murray, 1999)

Mekanisme cara kerjanya adalah sebagai berikut :



Gambar 2.5 Interaksi dan sinergisme antara sistem antioksidan yang bekerja dalam fase lipid sel dan fase aquoeus (Murray, 1999)

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Dasar Teori

Asap rokok, antara lain mengandung tar, nikotin, radikal bebas dan karbon monoksida dan paparan asap rokok terbukti dapat meningkatkan aktivitas radikal bebas pada beberapa sel tubuh, seperti membran sel endotel pembuluh darah, epitel paru, lensa mata dan neuron (Halliwell, 1987), yang dapat ditunjukkan dengan adanya penurunan aktivitas enzim *superoxide dismutase* (SOD) dalam sel hepar tikus (Yueniwati & Ali, 1998) (Yueniwati, 2000).

Tar dalam asap rokok merupakan kumpulan berbagai zat kimia berupa hidrokarbon aromatik polisiklik yang bersifat karsinogen (Tjandra yoga, 2001) (Sumintarti, 1997). Bila diidentifikasi dengan kromatografi, akan didapatkan senyawa-senyawa yang dapat memicu terbentuknya ROS misalnya : naftilamin, *pyrene*, *benzo(a)pyrene*, *urethane*, *dibenzacridine*, kadmium, *dimethylnitrosamine* (*National Health Education Departement Ministry of Health, Singapore*). Gas CO yang terdapat dalam asap rokok akan mengakibatkan terjadinya *carboxyhaemoglobin*, dan bila ditemukan dengan kadar tinggi akan mengakibatkan terjadinya hipoksia pada eritrosit (Sumintarti, 1997). Keadaan hipoksia akan memicu terbentuknya senyawa ROS (Siregar, 1992). Selain itu, asap rokok bila diidentifikasi dengan tehnik *spin trapping* menggunakan alat *electrical spin resonance* (ESR) dilanjutkan dengan kromatografi, diketahui mengandung radikal bebas dalam bentuk $\bullet\text{NO}$ dan radikal alkil ($\bullet\text{R}$)

Selain itu, asap rokok bila diidentifikasi dengan tehnik *spin trapping* menggunakan alat *electrical spin resonance (ESR)* dilanjutkan dengan kromatografi, diketahui mengandung radikal bebas dalam bentuk $\bullet\text{NO}$ dan radikal alkil ($\bullet\text{R}$) (Shinagawa, 1998) (Flicker, 2001). Radikal bebas mempunyai dampak negatif terhadap DNA, protein, dan membran sel yang mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim SOD, terputusnya rantai DNA dan mutasi pada gen penyandi protein serta terjadi peroksidasi lipid pada membran sel (Suryohudoyo, 2000).

Akhir-akhir ini pemakaian vitamin, terutama vitamin E dan vitamin C sangat meluas karena dipercaya dapat mencegah timbulnya berbagai macam penyakit terutama penyakit yang berhubungan dengan ROS, karena kedua vitamin ini dikenal sebagai antioksidan pemutus rantai reaksi radikal bebas (Suryohudoyo, 2000).

Vitamin E merupakan antioksidan yang bekerja pada membran sel yang memerlukan tekanan oksigen yang tinggi, sedangkan vitamin C bekerja pada sitosol (Suryohudoyo, 2000) (Murray, 1999) dan secara ekstrasel (Widjaya, 1999). Dengan mekanisme kerja yang berbeda, kedua vitamin ini apabila digunakan bersamaan akan memberikan efek yang optimal.

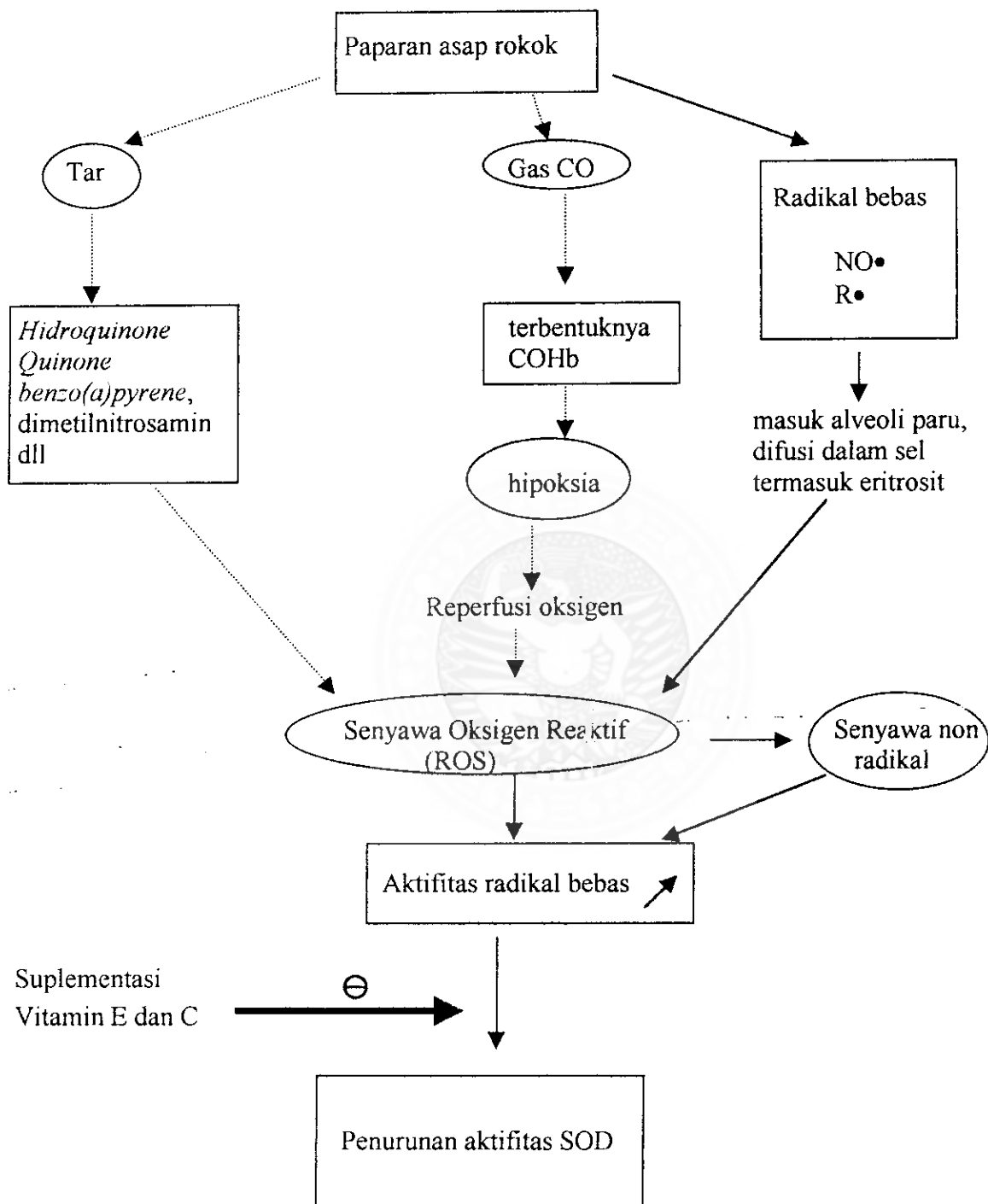
Aktivitas enzim SOD dapat ditentukan dari eritrosit (Harjanto, 2002) atau jaringan lain, misalnya sel hati (Yueniwati, 2000). Eritrosit merupakan sel darah yang tidak memiliki inti, sehingga bila aktivitas enzim SOD ditentukan dari eritrosit akan mencerminkan keadaan yang sebenarnya. Apabila aktivitas SOD dalam eritrosit menurun akibat radikal bebas, tidak akan terjadi pembentukan enzim SOD baru oleh ekspresi gen yang menyandi protein SOD. Vitamin E berperan efektif bila berada pada konsentrasi

oksigen yang tinggi dan cenderung terkonsentrasi dalam struktur lipid yang terkena tekanan parsial oksigen yang tinggi, misalnya pada membran eritrosit (Murray, 1999).

Untuk mengetahui efektifitas antioksidan vitamin E dan vitamin C dalam menghambat reaksi radikal bebas yang berasal dari asap rokok, sebagai indikator dilakukan pemeriksaan aktifitas enzim SOD dalam eritrosit .



3.2 Kerangka Konseptual Penelitian



Keterangan :

.....

yang tidak diteliti
yang diteliti

3.3. Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah : “Suplementasi vitamin E dan C menghambat penurunan aktifitas enzim SOD pada eritrosit tikus yang terpapar asap rokok kretek”.

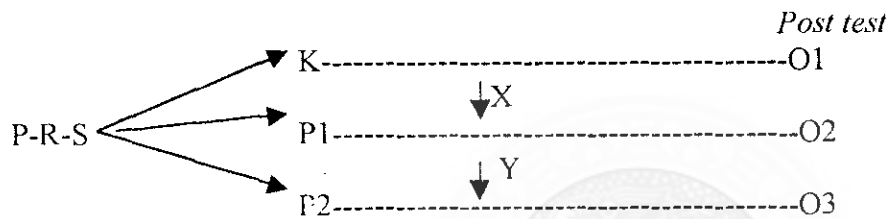


BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini tergolong jenis penelitian eksperimental laboratoris dengan menggunakan rancangan *Randomized Post test only Control Group Design*. (Stanley, 1966).



Keterangan :

- P = Populasi
 R = Randomisasi
 S = Sampling
 K = Kelompok kontrol
 P = Kelompok perlakuan
 X = Pemberian paparan asap rokok dan suplementasi vitamin E dan vitamin C selama 2 bulan
 Y = Pemberian paparan asap rokok dan pelarut vitamin E dan C selama 2 bulan
 O1 = Data kelompok kontrol K
 O2 = Data kelompok perlakuan P1 yang dipapar asap rokok dan diberi vitamin E dan vitamin C selama 2 bulan
 O3 = Data kelompok perlakuan P2 yang dipapar asap rokok dan diberi pelarut vitamin selama 2 bulan

4.2 Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

- Populasi adalah *Rattus novergicus* strain Wistar jenis kelamin jantan, dewasa yang ada di laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.

- Sampel menggunakan *Rattus novergicus* strain Wistar jenis kelamin jantan, dewasa, umur 2,5 – 3 bulan, berat 100 - 200 gram dengan kondisi sehat fisik (Sujari, 1996) dari laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.
- Besar sampel :
Pada penelitian pendahuluan yang menggunakan 5 ekor tikus untuk tiap kelompok, ternyata sudah didapatkan data yang berbeda bermakna antar kelompok, sehingga jumlah sampel 5 ekor tiap kelompok sudah dianggap mewakili populasi. Perhitungan besar sampel dalam lampiran 1.
- Teknik pengambilan sampel menggunakan random sampling dan dibagi menjadi 3 kelompok secara undian.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Klasifikasi variabel :

a. Variabel bebas (independen)

- Suplementasi vitamin C dan E
- Paparan asap rokok kretek

b. Variabel tergantung (dependen)

- Kadar SOD

c. Variabel kendali

- Jenis hewan coba
- Jenis kelamin hewan coba
- Umur hewan coba

- Berat badan hewan coba
- Kesehatan fisik hewan coba
- Faktor lingkungan laboratorium untuk pemeriksaan

4.4 Bahan Penelitian

4.4.1. Hewan coba

Hewan coba adalah *Rattus novergicus* strain Wistar dari laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya, jenis kelamin jantan, umur 2,5-3 bulan berat 100-200 gram, dalam kondisi sehat fisik dengan ciri-ciri bermata jernih, bulu mengkilap, gerakan aktif / lincah dan feses baik / tidak lembek (Sujari,1996).

4.4.2. Rokok

Rokok kretek ber-merek “X” dengan pembungkus kertas, dibeli di pasar daerah Sidoarjo, sebelum digunakan untuk penelitian, terlebih dulu diperiksa kadar nikotin, tar dan kandungan CO-nya di Balai Besar Pengawasan Obat dan Makanan agar diketahui kadarnya. Dosis pemaparan adalah 2 kali sehari masing-masing dengan 1 batang rokok, dengan kecepatan pemaparan 1 batang rokok habis dalam 7,5 menit (Yueniwati ,2000)

4.4.3. Antioksidan

- Vitamin E (kadar 98,0 – 102,0 % alfa tokoferol 8283 dari Merck) dilarutkan dalam minyak kelapa dengan dosis 400 mg / kg BB secara peroral (Ozturk, 1997). 1 mg vitamin E setara dengan 1 Unit.

- Vitamin C (dengan kadar 99,5 % dari Fluka AG, *Chemische Fabrik CH-9470 Buchs SG*) dilarutkan dengan aquadest dengan dosis 20 mg/ kg BB secara peroral (Yunus, 2001)

Pemberian kedua antioksidan ini dilakukan secara terpisah, bergantian dan mulai diberikan pada 3 hari sebelum dilakukan pemaparan asap rokok (pada kelompok P1) selama 2 bulan.

4.4.4. Pakan dan air minum

Tikus uji maupun kontrol diberi makan pelet dan minum *ad libitum*. Pelet didapatkan dari PT Charoen Phokpand dengan komposisi seperti pada lampiran 4, sedangkan minum adalah air PDAM.

4.4.5. Pereaksi pemeriksaan Superoksid Dismutase (SOD)

$Xanthine\ 25 \times 10^{-6}$ · *Xanthine Oxidase* 1 Unit / ml, NitroblueTetrazolium (NBT) 30 mg / ml, DMF 70 %, EDTA 0,05 M, Bufer Fosfat 0,05 M pH 7,4, Dimethyl Formamide (DMF) 70 %, Aquabidest

4.5 Instrumen Penelitian

4.5.1. Peralatan untuk perlakuan

- Peralatan untuk perlakuan meliputi kandang tikus, botol minum, neraca analitis dan neraca kasar, sonde, *beaker glass* 100 ml.

- “Smoking pump” terbuat dari kotak kaca yang terbagi menjadi 3 ruang yang masing-masing mempunyai ukuran 25 x 12 x 15 cm. Didalam tiap ruangan terdapat pipa yang akan mengalirkan asap rokok, ketiga pipa ini nantinya menyatu keluar dengan pipa yang dipasang rokok. Bagian lainnya yaitu pompa yang berfungsi menghisap asap rokok (Yueniwati, 2000). Lihat lampiran 6.

4.5.2. Peralatan untuk analisis aktivitas enzim SOD

Tabung reaksi, *vortex*, *ependorf*, *waterbath*, transpipet dan tip, kertas saring whatman 42, *microcentrifuge*, spektrofotometer, *glass wool*.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1. Tahap pra perlakuan

Aklimatisasi hewan selama tujuh hari dalam kondisi laboratorium

4.6.2. Tahap perlakuan

Seluruh hewan percobaan dibagi secara acak dalam tiga kelompok.

a. Kelompok kontrol (K)

Kelompok kontrol adalah kelompok tikus yang tidak diberikan induksi apapun selama 2 bulan.

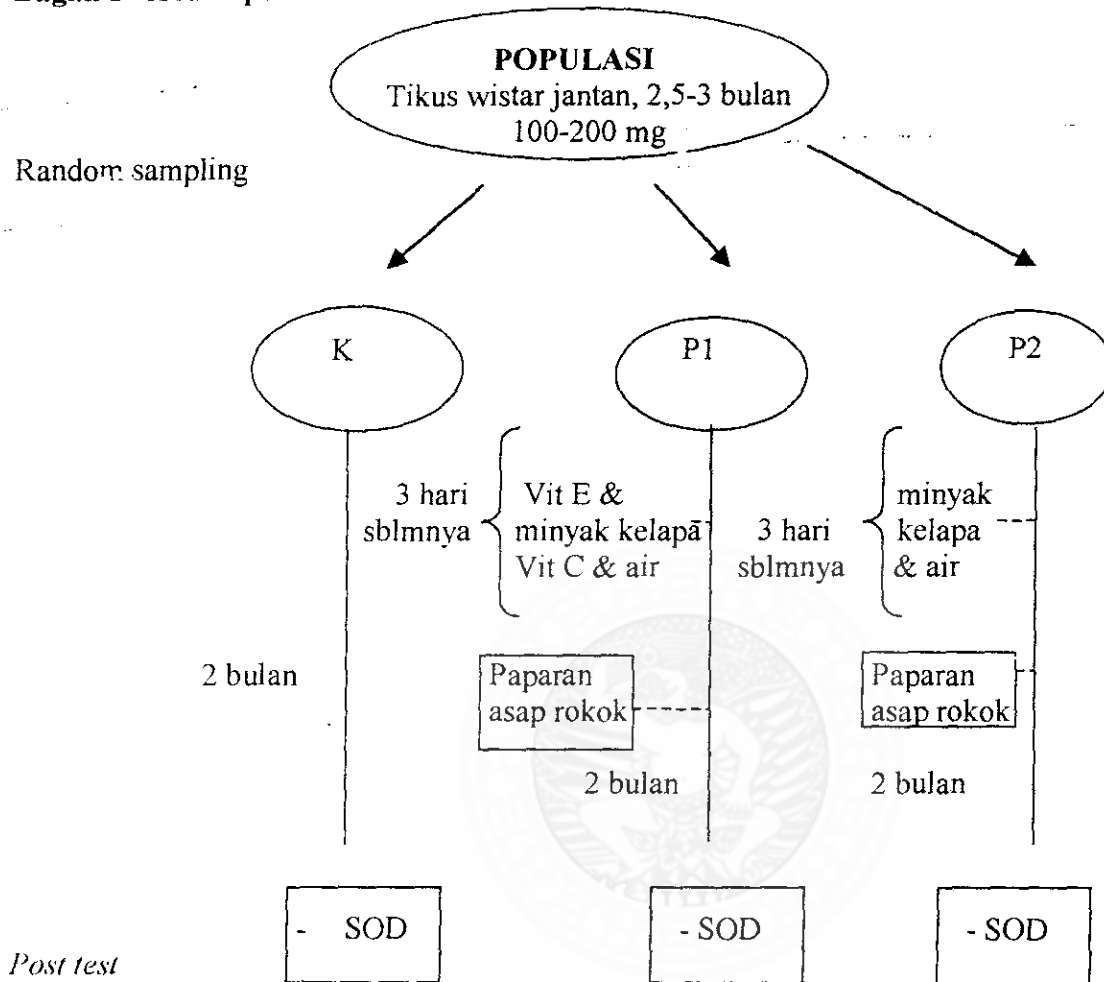
b. Kelompok perlakuan 1 (P1)

Kelompok perlakuan 1 adalah kelompok tikus yang diberi vitamin E dan C peroral / sonde dimulai pada 3 hari sebelum pemaparan rokok dilakukan dan dipapar asap dari 2 batang rokok setiap hari pada pagi dan sore selama 2 bulan dengan alat “*smoking pump*” (dimana 1 batang rokok habis dalam 7,5 menit). Setelah selesai pemaparan, tikus dikembalikan pada kandang masing-masing secara berkelompok

c. Kelompok perlakuan 2 (P2)

Kelompok perlakuan 2 adalah kelompok tikus yang terpapar asap dari 2 batang rokok setiap hari pada pagi dan sore selama 2 bulan dengan alat “*smoking pump*” (dimana 1 batang rokok habis dalam 7,5 menit) serta diberi pelarut vitamin. Setelah selesai pemaparan, tikus dikembalikan pada kandang masing-masing secara berkelompok

- Pemaparan asap rokok dilakukan setiap hari termasuk hari libur dengan dosis 2 batang rokok setiap hari, dan setiap batang rokok dipaparkan pada 3 ekor tikus.
- Pemberian larutan vitamin E dan C (pada kelompok P1) atau pelarutnya (pada kelompok P2) dilakukan setiap hari dan dimulai 3 hari sebelum pemaparan asap rokok sampai 2 bulan berikutnya.
- Pada hari ke 57, kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2), dan kelompok kontrol (K) , diambil darah dari jantung dan ditampung dalam botol yang berisi EDTA , dipusingkan untuk memisahkan eritrositnya dan ditentukan aktivitas enzim SOD nya.

Bagan Prosedur penelitian

Gambar 4.1. Alur Penelitian

4.6.3. Tahap analisis aktifitas enzim SOD eritrosit

Penentuan aktifitas enzim SOD dilakukan dengan protokol Wong dkk (1989)

dengan dasar teori :

Apabila xantin direaksikan dengan enzim xantin oksidase akan terbentuk radikal

bebas superoksid. ($\bullet\text{O}_2^-$) . Superoksid yang terbentuk akan mereduksi *Nitroblue*

Tetrazolium (NBT) membentuk warna formazan, yang dibaca pada panjang gelombang 580 nm. Enzim SOD dalam eritrosit akan mampu menghambat superoksida untuk mereduksi NBT. Satuan pemeriksaan aktivitas enzim SOD dinyatakan dalam Unit / ml . Satuan Unit yang dimaksud adalah aktivitas enzim SOD yang mampu menghambat reduksi NBT sebesar 50 % pada penelitian ini.

4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1. Lokasi penelitian

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

4.4.2. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan dalam waktu 4 bulan.

4.5. Cara analisis data

Data aktivitas enzim SOD dari kelompok perlakuan dan kelompok kontrol akan dianalisis :

1. Deskriptif
2. Normalitas
3. Anova

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

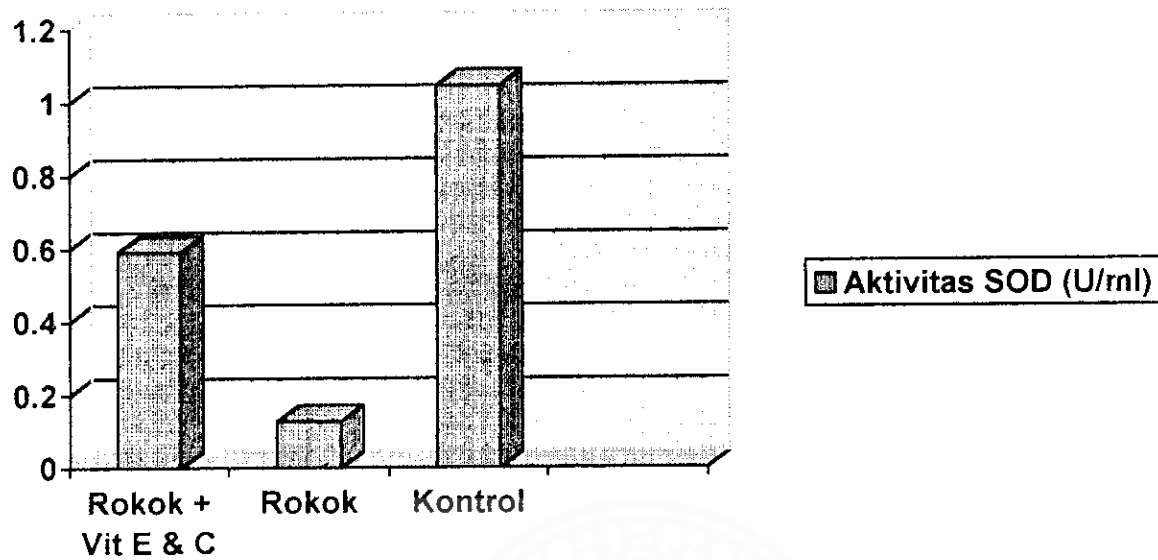
Data yang didapat dari hasil penelitian berupa aktivitas enzim SOD eritrosit yang dideskripsikan dan diuji dengan taraf signifikansi 5 % dan diolah dengan program SPSS V 09 dan *Systat for Window* untuk analisis grafik. Dari rangkaian penelitian yang telah dilaksanakan, diperoleh informasi data-data sebagai berikut :

5.1. Hasil Uji Deskriptif

Tabel 5.1. Hasil uji deskriptif variabel aktivitas enzim SOD eritrosit dalam satuan Unit/ml

Kelompok	Rerata	Simpangan baku
Asap Rokok+ Vitamin E&C	0,5908	0,3616
Asap Rokok	0,1276	0,0711
Kontrol	1,0044	0,8640

Apabila rerata enzim SOD tiap kelompok digambarkan dalam bentuk diagram akan terlihat sebagai berikut:



Gambar 5.2. Rerata enzim SOD tiap kelompok

5.2 Hasil Uji Normalitas Variabel Tergantung

Tabel 5.2. Hasil Uji Normalitas Distribusi (Uji *Kolmogorov-Smirnov*) Variabel enzim SOD eritrosit

Kelompok perlakuan	K-S(Z)	Sig (2-tailed)
Rokok + vitamin E & C	0,600	0,865 (P>0,05)
Rokok	0,561	0,911 (P>0,05)
Kontrol	0,674	0,754 (P>0,05)

Untuk melakukan analisis hasil penelitian dengan menggunakan statistik parametrik, penulis harus membuktikan bahwa data yang akan dianalisis berdistribusi normal. Dari tabel diatas ini data variabel tergantung berdistribusi normal pada semua kelompok ($p>0,05$) (Lampiran 8 hal 64-65)

5.3 Hasil Uji Homogenitas Variabel tergantung

Dari penghitungan dengan Bartlett's test didapatkan nilai uji statistik sebesar 14,191 dengan nilai $P = 0,001$ ($P < 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa data sampel adalah homogen (Lampiran 8 hal 70)

5.4 Hasil *Univariate Test* penurunan aktivitas enzim SOD eritrosit antar kelompok perlakuan

Tabel 5.4 Hasil *Univariate Test* penurunan aktivitas enzim SOD eritrosit antar kelompok perlakuan

Variabel	F	P
SOD	8,631	0,005 ($P<0,05$)

Berdasarkan tabel diatas (lampiran 8 hal 65), dapat dilihat bahwa pada enzim SOD antar kelompok perlakuan didapatkan perbedaan yang bermakna ($P<0,05$)

Dari hasil perhitungan statistik, dapat disimpulkan bahwa:

Suplementasi vitamin E dan C menghambat penurunan aktivitas enzim SOD eritrosit pada tikus yang terpapar asap rokok, hipotesis dapat diterima. Hal ini terlihat dengan ada perbedaan yang bermakna antara kelompok Rokok + Vitamin E & C terhadap kelompok Rokok .

5.5. Hasil Analisis Kandungan Asap Rokok

Analisis asap rokok kretek yang digunakan dalam perlakuan, dilakukan di Balai Besar Pengawasan Obat dan Makanan . Ternyata asap rokok kretek tersebut mempunyai kandungan :

- Kadar nikotin sebesar 2,1 mg / batang ($< 1,5$ mg / batang), menggunakan alat Kromatografi Gas
- Gas Karbon monoksida sebesar 10,72 mg / batang, menggunakan alat *CO analyzer*.
- Kadar tar sebesar 43,78 mg / batang (< 20 mg / batang), menggunakan metode Gravimetri. (Lampiran 7 hal 63)



BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pengaruh Suplementasi Vitamin E & C terhadap aktifitas enzim SOD

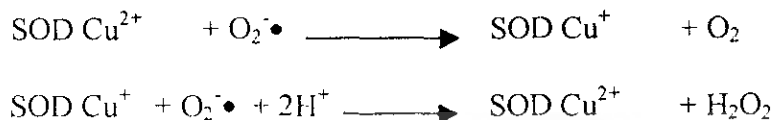
Eritrosit dalam darah dilengkapi antioksidan berupa enzim seperti *copper-zink superoxide dismutase* (CuZn-SOD), glutathion peroksidase (GSH-Px), katalase (Cat) dan glutathion reduktase. (Anderson, 1997) (Murray, 1999) yang merupakan sistem pertahanan terhadap stress oksidatif. Pada penelitian ini, variabel yang digunakan adalah aktivitas enzim SOD karena :

1. Enzim SOD bereaksi spesifik, hanya dengan ion superoksid.
2. Pada tar yang terdapat dalam asap rokok, mengandung Hidroquinon / quinon yang dapat menembus paru, berdifusi pada membran sel dan ikut reaksi yang terjadi secara intra dan ekstrasel yang akhirnya dapat membentuk senyawa ion superoksid (Halliwell, 1999).
3. Asap rokok terbukti mengandung radikal bebas ($\bullet R$, *Nitric Oxides radicals*) yang dapat juga membentuk radikal ion superoksid (Halliwell, 1999) (Flicker TM, 2001).

Penentuan aktivitas enzim SOD dilakukan menurut protokol Wong dkk (1989), berdasarkan reaksi bahwa aktifitas enzim SOD dapat ditentukan sesuai dengan kemampuannya menghambat reduksi NBT. Metoda ini mempunyai sensitivitas dan recoveri yang tinggi sehingga hasil yang diperoleh dapat dipercaya validitas dan keakuratannya.

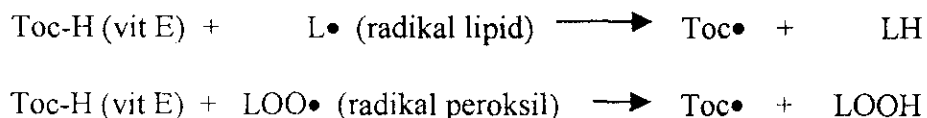
Rokok terbukti dapat menurunkan aktivitas *thiol dependent enzymes* seperti seperti glutathion peroksidase dan superoksid dismutase, yang merupakan sistem pertahanan selular aktif terhadap radikal bebas. (Halliwell, 1999). SOD dengan logam Cu dan Zn yang terdapat dalam eritrosit, berperan melindungi sel dari stress oksidatif. Hal ini terbukti pada penelitian ini dimana aktivitas enzim SOD eritrosit kelompok rokok lebih kecil dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Metal enzim SOD akan mereduksi superoksid dengan cara sebagai berikut :



Radikal bebas (yang berasal dari asap rokok) mempunyai sifat reaktivitasnya tinggi dan cenderung membentuk radikal baru, apabila radikal bebas ini menjumpai molekul lain akan membentuk molekul radikal lainnya (*chain reaction*) (Suryohudoyo, 2000). Bentuk radikal ion superoksid dapat membentuk radikal hidroksil dan pada akhirnya dapat membentuk radikal lipid ($\text{L}\bullet$) atau radikal peroksil ($\text{LOO}\bullet$).

Dengan suplementasi kombinasi vitamin E dan vitamin C, akan menjadi grup antioksidan yang efektif, hal ini disebabkan masing-masing vitamin mempunyai keistimewaan tersendiri dan dapat bekerjasama dalam menghadapi ROS. Seperti yang diketahui vitamin C akan bekerja dalam fase *aqueous* dan vitamin E akan bekerja dalam fase lipid sel (Murray, 1999) Mekanisme cara kerjanya adalah sebagai berikut :



Radikal vitamin E bergeser ke arah permukaan membran selanjutnya akan bereaksi dengan vitamin C (Suryohudoyo,2000).



Oksidasi askorbat dalam sitoplasma eritrosit dapat berlangsung karena eritrosit mempunyai enzim *GSH-dependent dehydroascorbate reductase* (Halliwell,1999). Dengan adanya suplementasi vitamin E dan C, akan membantu kerja enzim SOD dalam menghadapi oksidan dari asap rokok sehingga oksidan dari asap rokok merusak protein dalam eritrosit (dalam hal ini enzim SOD) tidak separah kelompok yang hanya diberi asap rokok.

Hasil analisis statistik penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna dari aktifitas enzim SOD eritrosit pada tikus yang terpapar asap rokok selama 2 bulan pada kelompok tikus yang diberi rokok + antioksidan (kombinasi vitamin E & C) bila dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberi antioksidan. Dengan analisis statistik dapat ditunjukkan bahwa suplementasi vitamin E & C dapat menghambat penurunan aktifitas enzim SOD eritrosit, sesuai dengan yang diprediksi.

Karena keterbatasan biaya dan waktu , pada penelitian ini memakai sampel hanya 5 ekor pada tiap kelompok. Meskipun penelitian ini hanya memakai jumlah sampel 5 (kurang dari jumlah sampel minimal hasil perhitungan), namun sudah bisa memperlihatkan perbedaan yang bermakna dari aktivitas enzim SOD antar kelompok. Ada baiknya bila variabel yang diperiksa tidak hanya aktivitas enzim SOD eritrosit saja, tetapi dilengkapi dengan pemeriksaan MDA eritrosit untuk membuktikan terjadinya peroksidasi lipid yang terjadi didalam membran eritrosit akibat adanya oksidan eksternal

yang berasal dari asap rokok. Pada penelitian pendahuluan ternyata memerlukan besar sampel minimal untuk parameter MDA sebesar 93 ekor tikus.

6.2. Analisis kandungan asap rokok.

Dari analisis kandungan asap rokok, terbukti bahwa dalam asap rokok terdapat gas karbon monoksida yang dideteksi dengan alat *CO analyzer*, tar yang ditetapkan kadarnya dengan metode Gravimetri dan nikotin yang ditetapkan dengan metode Kromatografi Gas. Dari analisis diatas membuktikan bahwa asap rokok benar-benar mengandung oksidan yang dapat mengganggu kesehatan.



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

3.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang sudah dilakukan dan pembahasan yang telah diuraikan, penulis berkesimpulan bahwa suplementasi vitamin E dan vitamin C dapat menghambat penurunan aktifitas enzim SOD pada eritrosit tikus yang terpapar asap rokok selama 8 minggu bila dibandingkan dengan kelompok tikus yang hanya diberi rokok .

3.2 Saran

1. Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan , sehingga memerlukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh asap rokok (eksternal ROS) terhadap komponen-komponen lain yang terdapat dalam sel.
2. Penelitian ini dapat dipakai sebagai acuan untuk peneliti selanjutnya tentang pengaruh asap rokok pada manusia.
3. Perlu diadakan penelitian lebih lanjut tentang dosis terapeutik vitamin C

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson HR , 1997, *Antioxidative enzym activities in Human Erythrocytes*, Clinical Chemistry,
- Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, 1995, *Williams Hematology*, , fifth edition, United State of America, 406-417.
- Darmawan I, 1996, *Eritrosit : Kapita selekta Hematologi*, EGC, Jakarta,
- Djambhuri A, 1991, *Perbedaan gambaran histopatologik saluran nafas mencit pada pemberian asap rokok sigaret dan rokok kretek*, majalah Farmakologi dan Terapi Indonesia, IKAFI 8:1-2
- Flicker TM, Green SA, 2001, *Comparison of gas-phase free-radical populations in tobacco smoke and model system by HPLC*, Environ Health Perspect, ed Aug; 109(8) : 765-71
- Harjanto, 2002, *Permasalahan Pemeriksaan Senyawa Radikal Di Dalam Tubuh*, Seminar IAIFI.
- Halliwel B, 1987, *Oxidants and Human Disease : Some New Concepts*. FASEB J 1:358-364

Halliwell B, 1991, *Reactive Oxygen Species in Living System : Source, Biochemistry and role in human disease*, Am.J. Med .91 (supl 3C), 14S-22S.

Halliwell B, Gutteridge JMC., 1999, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd, Oxford University Press, 584-591, 485-495

Higgins JE, Klimbaun AP, 1985, *Determining Sample Size* in introduction to Randomized Clinical Trials . USA: Family Health International, 24- 25

Gilbert H.F, 2000, *Basic Concepts in Biochemistry*, McGraw-Hill, 28-30

Girindra A, 1990, *Biokimia I*, PT Gramedia, Jakarta, 146-147

Khotib J, 1998, *Pengaruh pemberian karoten dan kombinasi vitamin E-vitamin C terhadap karsinoma pada mencit galur Balb-C yang diinduksi dengan Benzo(a)pirena*, Tesis, Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Linder CM, 1992, *Nutritional Biochemistry and metabolism*, Elsevier Science Publishing, Company, Inc. 167-177, 201-214

Murray K, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW , 1999, *Harper's Biochemistry*, 24th,

Appleton & Lange, 637-641, 758 – 759.

Oey Kam Nio, 1992, *Daftar Analisis Bahan Makanan*, Universitas Indonesia Press, Jakarta, 34

Ozturk SH., Mustafa K, Murat K, Orhan C, 1997, *The effects of gentamicin on the activities of glutathion peroxidase and superoxide dismutase enzymes and malondialdehyde levels in heart tissues of guinea pigs*, Current Medical Research and Opinion, 14 (1): 47-52

.Prasetyo A, 2002, *Pengaruh pemberian stresor epinefrin terhadap fragilitas osmotik eritrosit tikus strain Wistar*, tesis, Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya

Shinagawa K, Tokimoto T, Shirane K, 1998, *Spin trapping of nitric oxide in aqueous solutions of cigarette smoke*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998 Dec 9; 253(1): 99-103

S. Ketaren, 1986, *Pengantar Teknologi : Minyak dan lemak pangan*, Universitas Indonesia Press, Jakarta

Siregar P, 1992, *Metabolit Oksigen Radikal Bebas, dan Kerusakan Jaringan*, Cermin

Dunia Kedokteran no 80, 112-115

Sumintarti, 1997, *Pengaruh asap rokok dan stres terhadap respon imun menciit*, disertasi,
Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya

Stafford RS, Becker CG, 1996, *Cigarette smoking and atherosclerosis*, In atherosclerosis
and Coronary artery disease. By Ross VF & Topol EJ (editor), Lippincott-
Raven Publishers, 303-325.

Stanley J.C, Campbell D.T, 1966, *Experimental and Quasi Experimental Designs for
research*, Rand McNally College Publishing Co, Chicago.

Sujari, 1996, *Tikus Wistar sebagai Hewan Coba untuk penelitian dengan toksoid tetanus*,
Majalah kedokteran UNIBRAW, XII(3)

Suryohudoyo P, 2000, *Kapita Selekta : Ilmu Kedokteran Molekuler*, Sagung Seto,
Surabaya, 31 -- 47

Tjandra Yoga A, 2001, *Asap rokok lingkungan*, Rokok dan masalahnya, ed Januari

Widjaya K, 1999, *Pemberian Kombinasi Antioksidan Vitamin E dan Vitamin C untuk
Mencegah Nekrosis Sel Parenkim Hati*, Majalah Kedokteran vol 31 (4): 213-

220

Yueniwati Y, Ali M. 1998. *Pengaruh Rokok Kretek terhadap Peroksidasi Lemak dan Sistem Proteksi Superoksid Dismutase Hepar Tikus Wistar*. Simposium Nasional Hepatitis , Mataram Lombok.

Yueniwati, 2000, *Pengaruh paparan asap rokok kretek terhadap aktivitas radikal bebas mikrosom hepar yang menginduksi sitokrom P450 IAI*, tesis, Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya.

Yunus M, 2001, *Pengaruh vitamin C terhadap kerusakan membran eritrosit (Tikus Wistar) akibat latihan anaerobik*, tesis, Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya

Zainudin M, 2000, *Metodologi Penelitian* , Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya.

Lampiran 1

Penentuan jumlah sampel minimal berdasarkan rumus Higgins & Klinbaum (1985) sebagai berikut :

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

dimana :

n = besarnya sampel

Xt = Nipura kelompok eksperimen

Xc = Nipura kelompok kontrol

Sc = simpangan baku kelompok kontrol

F = proporsi yang gagal

Z α = 1,96 (α = 0,05)

Z β = 1,28 (β = 0,10)

Berdasarkan penelitian pendahuluan, diperoleh data sebagai berikut :

Xc (Nipura SOD eritrosit kelompok asap rokok + vit E & C) = 0,2954

Sc (simpangan baku kelompok asap rokok + vit E & C) = 0,18079

Xt (Nipura SOD eritrosit kelompok terpapar asap rokok) = 0,0638

Besar sampel bila $f = 0$ adalah 10,47 dan dibulatkan menjadi 11 (sebelas) ekor tikus perkelompok. Jadi jumlah tikus minimal pada 3 kelompok adalah 33 ekor.

Lampiran 2.

Prosedur pemeriksaan SOD Eritrosit (Wong dkk, 1989)

1. Membuat kurva baku hambatan SOD terhadap NBT oleh superoksid. Selanjutnya kurva baku ini digunakan untuk menentukan aktivitas SOD dari sampel.
2. Ambil 500 μL darah + EDTA , dicentrifuge 3000 rpm 10 menit pada suhu kamar dan buang supernatannya.
3. Cuci peletnya dengan menggunakan 3 ml NaCl 0,9 % sebanyak 4 kali
4. Tambahkan H_2O dingin sampai 2 ml
5. Ambil tabung reaksi 3 buah, kemudian diisi dengan bahan-bahan sebagai berikut :

Bahan	Tabung 1	Tabung 2	Tabung 3
EDTA (μL)	30	30	30
Bufer fosfat (μL)	1000	1000	1000
H_2O (μL)	2970	1770	1760
Xanthine (μL)	-	100	100
Xanthine oxidase (μL)	-	100	100
NBT (μL)	-	-	10
Sampel (μL)	-	1000	1000

Kemudian ketiga tabung tersebut dipanaskan 30 °C selama 10 menit. Setelah didiamkan 30 menit, kemudian aktivitas SOD dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm.



Lampiran 3

KANDUNGAN MINYAK KELAPA

No	Kandungan	Jumlah
1.	Bydd	100 %
2.	Energi	886 kal
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

Sedangkan pada minyak kelapa yang belum dimurnikan, mengandung :

★Sterol 0,06 – 0,08 %

★Tokoferol 0,003 %

★Asam lemak bebas < 5 % (S. Ketaren, 1986)

Lampiran 4.

KOMPOSISI PAKAN TIKUS

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

Sumber : PT Charoen Pokphand Indonesia

Lampiran 5

UNIVERSITAS BRAWIJAYA FAKULTAS KEDOKTERAN
 LABORATORIUM SENTRAL BIOMEDIK


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

HASIL ANALISIS AKTIVITAS ENZIM SOD ERITROSIT TIKUS

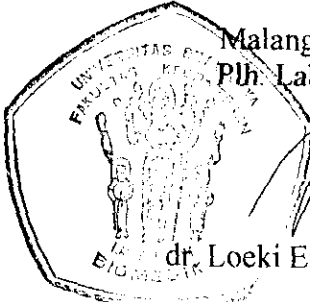
Nama Pengirim : Ir Juliana Christyaningsih
 Bahan : Whole Blood

Kode Sampel	Aktivitas SOD (Unit/ml)
P1.1	0,95
P1.2	0,748
P1.3	0,848
P1.4	0,248
P1.5	0,16
P2.1	0,15
P2.2	0,100
P2.3	0,238
P2.4	0,100
P2.5	0,050
K2.1	1,348
K2.2	0,548
K2.3	0,308
K2.4	2,37
K2.5	0,448

Malang, 29 Juli 2002
 Plh. Lab Biomedik

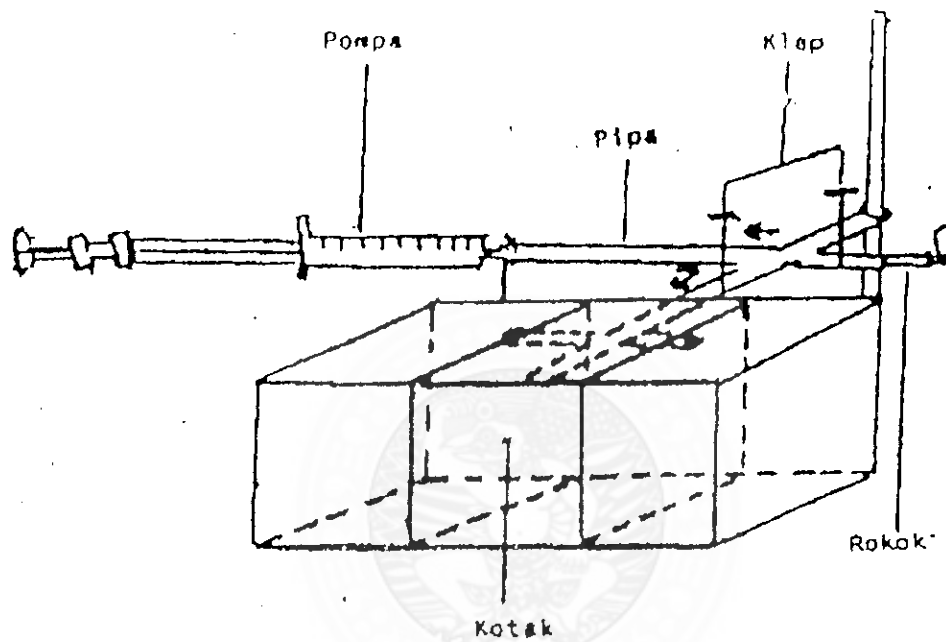


dr. Loeki Enggar Fitri M. Kes



Lampiran 6.

SKETSA "SMOKING PUMP"



Lampiran 7

BADAN POMLAPORAN PENGUJIAN

Nama sediaan contoh : Rokok merek -
 Produksi pabrik : -
 Kemasan : bungkus kertas
 No Batch : -
 No Registrasi : -
 No Kode : -

Pengirim contoh : Ir Juliana Christyaningsih

No surat, tanggal pengiriman : -
 Contoh diterima tanggal : -

HASIL PENGUJIAN

PEMERIAN : padat coklat rasa dan bau khas

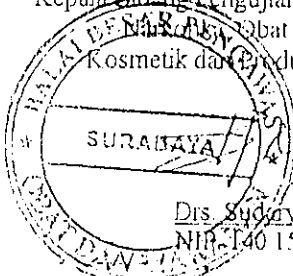
IDENTIFIKASI : terhadap asap rokok :
 • Nicotin : positif
 • CO : positif
 • Tar : positif

UJI YANG DILAKUKAN : terhadap asap rokok :
 • Kadar nicotin : 2,10 mg/batang (syarat : < 1,5 mg/bt)
 • Kadar CO : 10,72 mg/batang
 • Kadar Tar : 43,78 mg/batang (syarat : < 20mg/bt)

METODE, PUSTAKA : Kromatografi gas; CO analyzer; PP/81/99

KESIMPULAN : hasil uji seperti tersebut diatas

Surabaya, 11 SEP 2002
 Kepala Bidang Pengujian Produk Terapeutik,
 Obat Tradisional,
 Kosmetik dan Produk Komplemen



Dr. Sudoyo Apt
 NIP. 140 158 558

Means

Report

SOD (Unit/ml)

KELOMPOK	Mean	N	Std. Deviation
ROKOK+VIT E & C	.59080	5	.36159
ROKOK	.12760	5	7.1125E-02
KONTROL	1.00440	5	.86397
Total	.57427	15	.62410

NPar Tests

KELOMPOK = ROKOK+VIT E & C

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		SOD (Unit/ml)
N		5
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.59080
	Std. Deviation	.36159
Most Extreme Differences	Absolute	.268
	Positive	.228
	Negative	-.268
Kolmogorov-Smirnov Z		.600
Asymp. Sig. (2-tailed)		.865

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

KELOMPOK = ROKOK

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		SOD (Unit/ml)
N		5
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.12760
	Std. Deviation	7.11E-02
Most Extreme Differences	Absolute	.251
	Positive	.251
	Negative	-.149
Kolmogorov-Smirnov Z		.561
Asymp. Sig. (2-tailed)		.911

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

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

		S O D (Unit/ml)
N		5
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	1.00440
	Std. Deviation	.86397
Most Extreme Differences	Absolute	.301
	Positive	.301
	Negative	-.210
Kolmogorov-Smirnov Z		.674
Asymp. Sig. (2-tailed)		.754

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. KELOMPOK = KONTROL

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

KELOMPOK	Value Label	N
1	ROKOK+VIT E & C	5
2	ROKOK	5
3	KONTROL	5

Descriptive Statistics

Dependent Variable: S O D (Unit/ml)

KELOMPOK	Mean	Std. Deviation	N
ROKOK+VIT E & C	.59080	.36159	5
ROKOK	.12760	7.1125E-02	5
KONTROL	1.00440	.86397	5
Total	.57427	.62410	15

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: S O D (Unit/ml)

F	df1	df2	Sig.
8.631	2	12	.005

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

a. Design: Intercept+KEL

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: S O D (Unit/ml)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.924 ^a	2	.962	3.271	.073
Intercept	4.947	1	4.947	16.821	.001
KEL	1.924	2	.962	3.271	.073
Error	3.529	12	.294		
Total	10.400	15			
Corrected Total	5.453	14			

a. R Squared = .353 (Adjusted R Squared = .245)

Estimated Marginal Means KELOMPOK

Estimates

Dependent Variable: S O D (Unit/ml)

KELOMPOK	Mean	Std. Error
ROKOK+VIT E & C	.591	.243
ROKOK	.128	.243
KONTROL	1.004	.243

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: S O D (Unit/ml)

(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a
ROKOK+VIT E & C	ROKOK	.463	.343	.202
	KONTROL	-.414	.343	.251
ROKOK	KONTROL	-.877	.343	.025

Based on estimated marginal means

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

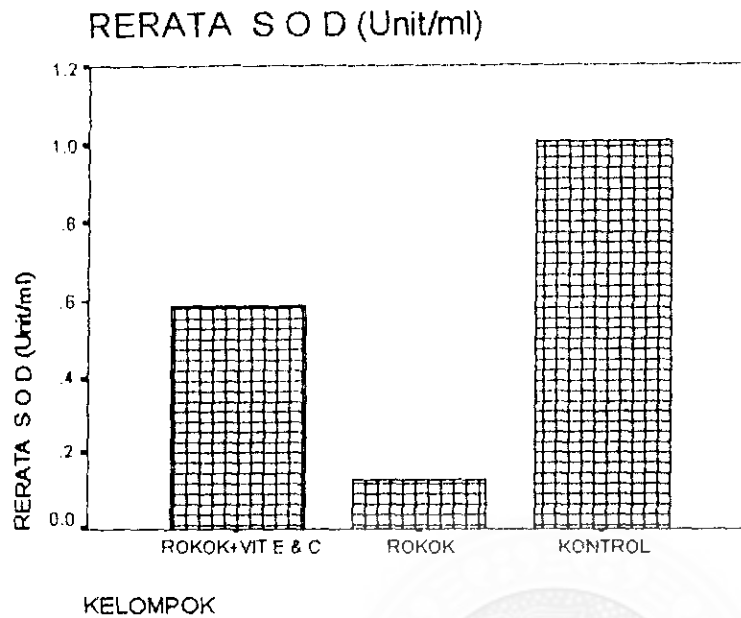
Univariate Tests

Dependent Variable: S O D (Unit/ml)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	1.924	2	.962	3.271	.073
Error	3.529	12	.294		

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

Profile Plots



GAMBAR : RERATA SOD MENURUT KELOMPOK PERLAKUAN

NPar Tests

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	KELOMPOK	N	Mean Rank
S O D (Unit/ml)	ROKOK+VIT E & C	5	9.60
	ROKOK	5	3.20
	KONTROL	5	11.20
	Total	15	

Test Statistics^{a,b}

	S O D (Unit/ml)
Chi-Square	8.976
df	2
Asymp. Sig.	.011

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: KELOMPOK

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

KELOMPOK	N	Mean Rank	Sum of Ranks
SOD (Unit/ml) ROKOK+VIT E & C	5	7.80	39.00
ROKOK	5	3.20	16.00
Total	10		

Test Statistics^a

	SOD (Unit/ml)
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	16.000
Z	-2.410
Asymp. Sig. (2-tailed)	.016
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.016 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: KELOMPOK

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

KELOMPOK	N	Mean Rank	Sum of Ranks
SOD (Unit/ml) ROKOK+VIT E & C	5	4.80	24.00
KONTROL	5	6.20	31.00
Total	10		

Test Statistics^a

	SOD (Unit/ml)
Mann-Whitney U	9.000
Wilcoxon W	24.000
Z	-.731
Asymp. Sig. (2-tailed)	.465
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.548 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: KELOMPOK

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

	KELOMPOK	N	Mean Rank	Sum of Ranks
S O D (Unit/ml)	ROKOK	5	3.00	15.00
	KONTROL	5	8.00	40.00
	Total	10		

Test Statistics^a

	S O D (Unit/ml)
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.619
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: KELOMPOK

Response Akt SOD
 Factors faktor
 ConfLvl 95.0000

Conferron confidence intervals for standard deviations

Lower	Sigma	Upper	N	Factor Levels
0.466918	0.863970	3.32533	5	1
0.195415	0.361590	1.39172	5	2
0.038438	0.071125	0.27375	5	3

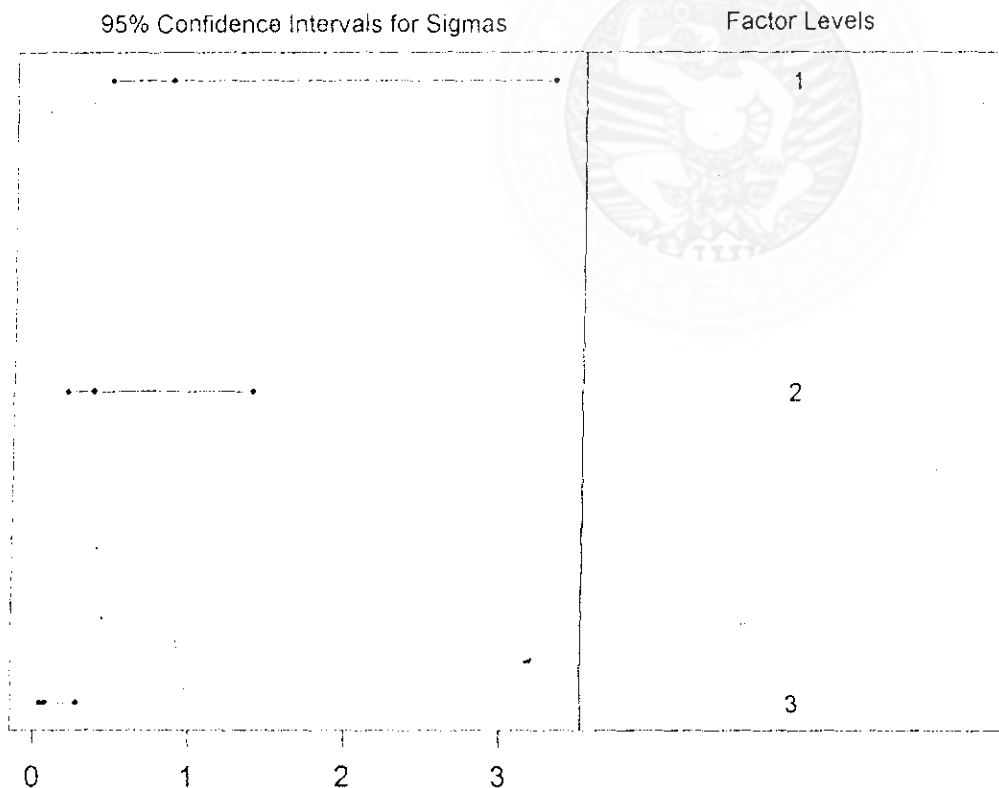
Bartlett's Test (normal distribution)

Test Statistic: 14.191
 P-Value : 0.001

Levene's Test (any continuous distribution)

Test Statistic: 1.763
 P-Value : 0.213

Homogeneity of Variance Test for Akt SOD



Bartlett's Test
 Test Statistic: 14.191
 P-Value : 0.001

Levene's Test
 Test Statistic: 1.763
 P-Value : 0.213