

**EFEK EKSTRAK KACANG TUNGGAK (*Vigna unguiculata*) TERHADAP
KADAR SUPEROKSIDA DISMUTASE (SOD) SERUM TIKUS GALUR WISTAR
(*Rattus novergicus*) YANG DIPAPAR DENGAN ASAP MESIN BERBAHAN**

BAKAR BENSIN

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum



Oleh:

Arum Gladys K.

NIM: 0910710041

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2013

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

EFEK EKSTRAK KACANG TUNGGAK (*Vigna unguiculata*) TERHADAP
KADAR SUPEROKSIDA DISMUTASE (SOD) SERUM TIKUS GALUR WISTAR
(*Rattus novergicus*) YANG DIPAPAR DENGAN ASAP MESIN BERBAHAN
BAKAR BENSIN

Oleh :

Arum Gladys K.

NIM : 0910710041

Telah diuji pada

Hari : Senin

Tanggal : 18 Februari 2013

dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I

dr. Habiba Aurora

NIP. 19840628 200812 2 003

Penguji II/ Pembimbing I

Penguji III / Pembimbing II

Prof. dr Moch. Aris Widodo, MS, SpFK, PhD

NIP. 19480408 197903 2 001

dr. Bambang Prijadi, MS

NIP. 19520324 198403 1 002

Mengetahui,

Ketua Jurusan Kedokteran

Prof.Dr.dr.Teguh W. Sardjono DTM& H, MSc, SpParK

NIP. 19520410 198002 1 001

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas rahmat, karunia, serta hidayah yang senantiasa tercurah, sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul “Efek Ekstrak Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) terhadap Kadar SOD (Superoksida Dismutase) Serum Tikus Galur Wistar (*Rattus novergicus*) Yang Dipapar Dengan Asap Mesin Berbahan Bakar Bensin”. Tak lupa penulis sampaikan shalawat serta salam terhadap junjungan kita Nabi Muhammad Saw.

Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Prof. dr. Moch. Aris Widodo, Ms. SpFK. PhD, selaku dosen pembimbing pertama yang telah membimbing serta mendukung kelancaran dalam memilih judul dan melaksanakan penelitian.
3. dr. Bambang Prijadi, MS, selaku dosen pembimbing kedua yang telah memberikan dukungan dan kesabaran selama penulisan tugas akhir
4. Segenap tim pengelola tugas akhir, etik dan pihak akademik pendidikan dokter atas kemudahan yang diberikan.
5. Staf Laboratorium Farmakologi (Bu Ferrida dan Mas Memet) dan Biomedik FKUB atas bantuan dan dukungannya untuk memudahkan saya dalam menyelesaikan penelitian.
6. Ibu Sita Agustina dan Bapak Sudjari, atas dukungan dan doa yang senantiasa menjadi penerang hati serta kakak-kakak, Anjar dan Ames atas segala kasih sayang dan kebersamaan dalam keluarga.

7. Tim peneliti kacang tunggak (Sakinah, Vidi Prasetyo, Diana Bonton, Obi Chandra, Mesha Syafitra, Dhany Pristiano) atas ide dan kerjasama yang solid
8. Keluarga heries dan tkp sebagai keluarga kedua (Sasa, Cendy, Vivi, Ratih, Fika, Nying, Anis, Ines, Luki, Ditaris, Desty, Dedy, Er, Ersyad, Bogi, Ote) atas celotehan berharga dan kenangan yang tak terhapus waktu
9. Sahabat dan saudara yang tiada duanya (Olive) atas kebijaksanaannya
10. Kawan-kawan bro dan sis (Mahe, Erik, Robi, Dio, Rosyid, Lukito) atas hiburan dan semangat
11. Teman-teman Pendidikan Dokter FKUB 2009, dan semua teman-teman lainnya atas persahabatan, persaudaraan, dan kenangan indah.
12. Teman-teman Paduan Suara "Medcho" yang selalu ceria di segala suasana
13. Seluruh pihak yang telah memberikan bantuan moril maupun materiil demi penyelesaian tugas akhir ini, yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Meskipun penulis telah mencurahkan segala kemampuan demi kesempurnaan tugas akhir ini, namun penulis menyadari segala kekurangan dan keterbatasan. Oleh karena itu, saran dan kritik yang membangun merupakan masukan yang sangat berarti demi penyempurnaan karya selanjutnya. Akhirnya, semoga tugas akhir ini dapat menambah wawasan para pembaca.

Malang, 6 Februari 2013

Penulis

ABSTRAK

Kusumaningrum, Arum G. 2013. *Efek Ekstrak Kacang Tunggak (Vigna unguiculata) Terhadap Kadar Superoksida Dismutase (SOD) Serum Tikus Galur Wistar (Rattus novergicus) yang Dipapar Asap Mesin Berbahan Bakar Bensin*. Tugas akhir, Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pembimbing: (1) Prof. dr. Moch. Aris Widodo, Ms. SpFK. PhD (2) dr. Bambang Prijadi, MS

Asap mesin berbahan bakar bensin mengandung komponen *particulate matter* (PM) yang memiliki efek proinflamasi melalui pembentukan *reactive oxygen species* (ROS). Peningkatan ROS akan berdampak pada stress oksidatif yang menyebabkan penurunan kadar antioksidan. Kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) mengandung senyawa genistein yang dapat bekerja sebagai antioksidan sehingga mampu mencegah terjadinya stress oksidatif akibat paparan asap. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan pengaruh pemberian ekstrak kacang tunggak terhadap kadar SOD serum pada tikus wistar. Studi eksperimental ini menggunakan *post test only control group design*. Tiga puluh enam tikus wistar jantan dibagi secara acak dalam 9 kelompok, terdiri dari kelompok kontrol negatif (N), kelompok yang diberi oksigen 4 menit (N+O₄) kelompok yang diberi ekstrak kacang tunggak (N+G), kelompok yang diberi perlakuan asap 2, 3 dan 4 menit, masing-masing diberikan oksigen 4 menit tanpa ekstrak kacang tunggak (A₂O₄(-)G, A₃O₄(-)G, A₄O₄(-)G) dan dengan ekstrak kacang tunggak (A₂O₄(+)G, A₃O₄(+)G, A₄O₄(+)G). Pemaparan asap dilakukan setiap hari selama 30 hari. Variabel yang diukur pada penelitian ini adalah kadar SOD serum. Hasil uji ANOVA menunjukkan adanya perbedaan antar kelompok yang signifikan (p<0,05). Hasil analisis statistik *Post Hoc LSD* menunjukkan bahwa kadar SOD serum kelompok tikus A₂O₄(+)G, A₃O₄(+)G, A₄O₄(+)G meningkat signifikan dibandingkan dengan kelompok tikus A₂O₄(-)G, A₃O₄(-)G, A₄O₄(-)G. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak kacang tunggak dapat mencegah penurunan kadar SOD serum tikus wistar yang dipapar asap mesin berbahan bakar bensin

Kata Kunci : kacang tunggak; PM; asap mesin berbahan bakar bensin; superoksida dismutase

ABSTRACT

Kusumaningrum, Arum G. 2013. The Effect of Cowpea (*Vigna unguiculata*) Extract on Superoxide Dismutase (SOD) Serum of Wistar Male Rats (*Rattus norvegicus*) Exposed to Petrol-Fueled Engine Exhaust. Final Assignment, Medical Faculty of Brawijaya University. Supervisors: (1) Prof. dr. Moch. Aris Widodo, MS. SpFK. PhD, (2) dr. Bambang Prijadi, MS

Petrol-fueled engine exhaust consisting of PM exerts proinflammatory effects through the generation of reactive oxygen species (ROS). Excessive generation of ROS leads to oxidative stress causing antioxidant level to decrease. Cowpea (*Vigna unguiculata*) contains genistein as an antioxidant, prevent oxidative stress after being exposed to petrol-fueled engine exhaust. The purpose of this study was to determine the effect cowpea extract on SOD serum in wistar rat. This experimental study use post test only control group design. Thirty six male wistar rats were randomly selected and divided into nine groups, consisted of control negative group (N), normal + oxygen (N+O₄), normal + cowpea extract (N+G), wistar rat with 2, 3, and 4 minute exposure + oxygen without cowpea extract (A2O4(-)G, A3O4(-)G, A4O4(-)G) and with cowpea extract (A2O4(+)G, A3O4(+)G, A4O4(+)G). Intervention given each day for thirty days. The measured variable was SOD serum. ANOVA test showed a significant differences between all groups (p<0,05). Statistical analysis *Post Hoc* LSD Test showed significant increase of SOD serum in A2O4(+)G, A3O4(+)G, A4O4(+)G compared to A2O4(-)G, A3O4(-)G, A4O4(-)G. The conclusion is cowpea extract (*Vigna unguiculata*) prevent the decreasing of SOD serum level in wistar rat exposed to petrol-fueled engine exhaust.

Key words : cowpea; PM; petrol-fueled engine exhaust; superoxide dismutase

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Manfaat Akademik.....	5
1.4.2 Manfaat Praktis.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Asap Kendaraan Bermotor	7
2.1.1 Komponen Asap Kendaraan Bermotor	7
2.1.2 <i>Particulate Matter</i> (PM)	7



2.2 Radikal Bebas.....	9
2.2.1 Definisi Radikal Bebas	9
2.2.2 Tipe Radikal Bebas	9
2.2.3 Pembentukan Radikal Bebas	10
2.2.4 Efek Radikal Bebas	10
2.2.5 Pertahanan Sel Terhadap Radikal Bebas	12
2.3 <i>Reactive Oxygen Species</i> (ROS)	12
2.4 Reaksi Radikal Bebas	15
2.5 Stres Oksidatif	15
2.6 Antioksidan	16
2.6.1 Definisi	16
2.6.2 Klasifikasi Antioksidan	16
2.6.3 Mekanisme Kerja Antioksidan	18
2.7 Superoksida Dismutase (SOD)	19
2.8 Kacang Tunggak.....	20
2.8.1 Morfologi Kacang Tunggak	21
2.8.2 Penyebaran Pertumbuhan Kacang Tunggak.....	23
2.8.3 Kandungan Kacang Tunggak	23
2.8.3 Manfaat Antioksidan dan Antiinflamasi Kacang Tunggak.....	24

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep	26
3.2 Hipotesis Penelitian	28



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian.....	29
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian.....	29
4.2.1 Populasi Penelitian.....	29
4.2.2 Pemilihan Sampel.....	29
4.2.2.1 Kriteria Inklusi.....	29
4.2.2.2 Kriteria Eksklusi.....	29
4.2.3 Jumlah Sampel.....	32
4.3 Variabel Penelitian.....	33
4.3.1 Variabel Bebas.....	33
4.3.2 Variabel Tergantung.....	33
4.3.3 Variabel Luar.....	33
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	33
4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian.....	32
4.5.1 Bahan Penelitian.....	32
4.5.2 Alat/Instrumen Penelitian.....	33
4.6 Definisi Istilah/Operasional.....	34
4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data.....	35
4.7.1 Prosedur Ekstraksi Kacang Tunggak.....	35
4.7.2 Penentuan Dosis Ekstrak Kacang Tunggak.....	36
4.7.3 Proses Perlakuan pada Tikus Percobaan.....	36
4.7.4 Pengukuran Kadar SOD dengan Metode Spektrofometri.....	40
4.8 Pengolahan dan Analisis Data.....	42
4.9 Alur Penelitian.....	43

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA



5.1 Hasil Penelitian	44
5.2 Analisis Data	51
BAB 6 PEMBAHASAN	
6.1 Pengaruh paparan asap terhadap kadar SOD serum	54
6.2 Pengaruh lama paparan terhadap kadar SOD serum	55
6.3 Pengaruh ekstrak kacang tunggak terhadap kadar SOD serum	56
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1 Kesimpulan	59
7.2 Saran	59
DAFTAR PUSTAKA	61
LAMPIRAN	66



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Enzim-enzim antioksidan	12
Gambar 2.2	Klasifikasi antioksidan	17
Gambar 2.3	Biji Vigna unguiculata	23
Gambar 4.1	Mesin untuk Pemberian Asap Kendaraan Bermotor	33
Gambar 4.2	Skema Alur Penelitian	43
Gambar 5.1	Diagram Rerata Kadar SOD Serum Kelompok Tanpa Paparan Asap	45
Gambar 5.2	Diagram Rerata Kadar SOD Serum Kelompok Paparan Asap 2 menit Tanpa Ekstrak Kacang Tunggak dan Dengan Ekstrak Kacang Tunggak	46
Gambar 5.3	Diagram Rerata Kadar SOD Serum Kelompok Paparan Asap 3 menit Tanpa Ekstrak Kacang Tunggak dan Dengan Ekstrak Kacang Tunggak	47
Gambar 5.4	Diagram Rerata Kadar SOD Serum Kelompok Paparan Asap 4 menit Tanpa Ekstrak Kacang Tunggak dan Dengan Ekstrak Kacang Tunggak	48
Gambar 5.5	Diagram Rerata kadar SOD serum Kelompok Kontrol Negatif dan Kelompok Paparan Asap Tanpa Ekstrak Kacang Tunggak	49
Gambar 5.6	Diagram Rerata kadar SOD serum Kelompok Kontrol Negatif dan Kelompok Paparan Asap Dengan Ekstrak Kacang Tunggak	50



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan Gizi Biji Kacang Tunggak Setiap 100g.....	24
Tabel 5.1 Rerata Kadar SOD Serum	44
Tabel 5.2 Hasil Uji LSD Terhadap Kadar SOD Serum	52
Tabel Pengukuran Kadar SOD Serum.....	69
Tabel Uji Normalitas.....	71
Tabel Uji Homogenitas.....	71
Tabel Uji One-Way ANOVA.....	71
Tabel Uji Post Hoc Tukey HSD.....	72



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Diagram Alur Penelitian.....	68
Lampiran 2 Metode Pengukuran SOD	69
Lampiran 3 Penggunaan Spektrofotometri.....	70
Lampiran 4 Hasil Penghitungan Kadar SOD Serum	71
Lampiran 5 Analisis Data Kadar SOD Serum.....	73
Lampiran 6 Dokumentasi Penelitian.....	77
Lampiran 7 Pernyataan Keaslian Tulisan	78



DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH

AIISI	Asosiasi Industri Sepeda Motor
ANOVA	Analysis of Variance
CAT	Catalase
CO	Karbon Monoksida
Cu-Zn SOD	Cooper Zinc Superoksida Dismutase
eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase
Fe SOD	Iron Superoksida Dismutase
Gaikindo	Gabungan Industri Kendaraan Bermotor Indonesia
GSH-PX	Glutathion Peroksidase
H ₂ O ₂	Hidrogen Peroksida
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Mn SOD	Manganese Superoksida Dismutase
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NO	Nitrogen monoksida
O ₂ ⁻	Superoksida
OH [•]	Hidroksil
ONOO ⁻	Peroksinitrit
PM	Particulate Matter
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
RO [•]	Alkoksil
RO ₂ [•]	Peroksil
SO ₂	Sulfur Dioksida



SOD

Superoxide Dismutase

SPSS

Statistical Product and Service Solution

UFP

Ultrafine Particulate Matter



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perkembangan teknologi di bidang otomotif mengalami peningkatan yang sangat pesat. Ribuan inovasi telah dibuat dengan tujuan meningkatkan efisiensi kerja manusia. Namun, tidak selamanya perkembangan otomotif berdampak positif. Salah satunya dampak negatifnya yaitu dapat merugikan lingkungan dan ekosistem yang ada didalamnya. Dampak negatif dari masalah sistem transportasi ini adalah tingginya kadar polutan akibat emisi (pelepasan) dari asap kendaraan bermotor. Hal ini bisa menjadi ancaman serius bila dibiarkan begitu saja. Hampir 80% konsumsi bahan bakar di bumi ini dihabiskan untuk keperluan transportasi darat. Sedangkan pada tahun 1992, 40% dari total penggunaan bahan bakar dihabiskan untuk sektor transportasi, dan 80% bahan bakar untuk sektor transportasi digunakan untuk transportasi darat. Asap yang dikeluarkan kendaraan bermotor mengandung sekitar 1000 unsur beracun dan menyebabkan 60%-90% dari seluruh polusi di negara-negara industri.

Hasil penelitian WardAuto 2011, hingga 2010 lalu jumlah kendaraan bermotor di dunia telah mencapai 1,015 miliar unit. Peningkatan jumlah kendaraan bermotor juga terjadi di Indonesia. Data dari Gabungan Industri Kendaraan Bermotor Indonesia (Gaikindo) dan Asosiasi Industri Sepeda Motor Indonesia (AISI) menunjukkan bahwa jumlah kendaraan bermotor di Indonesia hingga 2010 lalu mencapai 50.824.128 unit, dimana rasio antara jumlah penduduk dengan kendaraan bermotor di Indonesia 1:4,6. Bahkan jumlah kendaraan di Indonesia menempati urutan pertama di kawasan Asia Tenggara

karena pada saat yang sama jumlah kendaraan di negara ASEAN lainnya di bawah 26 juta unit. Diperkirakan jumlah kendaraan di Indonesia dalam beberapa tahun terakhir akan terus bertambah 10-15 persen. (Arianto, 2011).

Efek membahayakan polusi udara terhadap kardiovaskular menyatakan bahwa terdapat peningkatan resiko kejadian kardiovaskular yang diasosiasikan dengan paparan terhadap *Particulate matter* (terutama $PM < 2.5 \mu m$ ($PM_{2.5}$) pada diameter aerodinamis (Brook *et al.*, 2010) dimana PM yang terhirup tidak hanya akan terdeposit di paru-paru, namun dapat memicu sejumlah reaksi terhadap radikal bebas ini. Salah satu reaksi terhadap radikal bebas ini dapat menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS). Apabila proses ini terjadi dalam jangka waktu lama sehingga ROS akan terakumulasi sehingga menimbulkan keadaan stress oksidatif.

Stres oksidatif merupakan ketidakseimbangan antara produksi oksidan (prooksidan) dan antioksidan, dimana produksi prooksidan melebihi jumlah antioksidan (Sies, 1991). Mekanisme pertahanan melawan stres oksidatif yang dipicu oleh radikal bebas melibatkan beberapa mekanisme, yaitu mekanisme preventif, mekanisme perbaikan, pertahanan fisik, dan pertahanan antioksidan. Pertahanan antioksidan enzimatis meliputi superoksida dismutase (SOD), glutathion peroxidase (GPx), katalase (CAT). Antioksidan non-enzimatis meliputi asam askorbat (vit.C), alpha-tocopherol (vit.E), dan glutathion (GSH) (Valko *et al.*, 2007).

Superoksida dismutase (SOD) merupakan suatu antioksidan yang mendismutase radikal superoksida (O_2^-) yang reaktif menjadi O_2 dan H_2O_2 . SOD merupakan suatu enzim yang mengkatalisis dismutasi radikal anion superoksida menjadi O_2 dan H_2O_2 yang selanjutnya akan dieliminasi lagi oleh katalase dan

peroksidase. SOD melindungi sel terhadap gangguan oksidan (radikal bebas) yang dapat menyebabkan terjadinya beberapa penyakit dan proses degenerasi seperti ketuaan dan karsinogenesis (Scandalios, 2005). Antioksidan ini juga secara tidak langsung memelihara keseimbangan beberapa oksigen yang toksik. Sejauh ini SOD telah digunakan dalam penelitian biomedis baik *in vivo* maupun *in vitro* (kultur jaringan) untuk pencegahan maupun pengobatan beberapa penyakit tertentu.

Berbagai jenis tanaman kacang-kacangan banyak tumbuh di Indonesia sepanjang tahun. Salah satunya kacang tunggak atau kacang tolo (*Vigna unguiculata* L.), yang merupakan salah satu jenis kacang-kacangan yang bentuknya mungil dan mudah berkembang biak, bahkan di daerah kering sekalipun. Dari segi gizi kacang tunggak jika dihitung per 100 gram bahan mengandung protein 22,9 gram, lemak 1,1 gram dan karbohidrat 61,6 gram. Sedangkan setiap 100 gram kacang kedelai mengandung protein 30,2 gram, lemak 15,6 gram dan karbohidrat 30,1 gram. Dari data tersebut dapat diartikan bahwa nilai gizi kacang tunggak setara dengan kacang kedelai sehingga berpotensi sebagai pengganti kedelai. Nilai gizi yang tinggi dan harga yang relatif murah menjadikan kacang tunggak sebagai bahan makanan sumber protein nabati untuk mencukupi kebutuhan gizi dalam masyarakat. Selain itu, ada juga kandungan zat lainnya seperti kalsium, fosfor, vitamin, dan senyawa-senyawa flavonoid. Golongan isoflavon fitoestrogen yang terkandung dalam kacang tunggak, antara lain genistein dan daidzein.

Genistein yaitu golongan isoflavone fitoestrogen selain mempunyai efek estrogenik juga mempunyai efek antioksidan. Ada dua kelompok antioksidan, yaitu antioksidan non enzimatis dan enzimatis. Genistein, merupakan salah satu

komponen fitoestrogen yang berperan sebagai antioksidan non enzimatis. Beberapa peneliti melaporkan potensi antioksidatif genistein dapat melindungi terjadinya stres oksidatif. Suplementasi isoflavon genistein pada tikus sebanyak 598 mg/kg pakan selama empat minggu juga meningkatkan aktivitas SOD (Chen *et al.* 2002). Kerja isoflavon sebagai antioksidan terjadi dengan cara menangkap radikal ion superoksida dan kemudian mengubahnya menjadi H₂O₂ (Vedavanam *et al.* 1999).

Dengan latar belakang tersebut, peneliti mencoba mengetahui keterkaitan antara efek ekstrak kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) terhadap kadar SOD pada *Rattus norvegicus* strain wistar yang dipapar asap mesin berbahan bakar bensin.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana efek ekstrak kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) terhadap kadar SOD serum tikus yang dipapar asap mesin berbahan bakar bensin?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas maka tujuan dari penelitian dalam Tugas Akhir ini sebagai berikut:

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui efek ekstrak kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) terhadap kadar SOD serum tikus yang dipapar asap mesin berbahan bakar bensin

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan penelitian ini secara khusus adalah:

1. Membuktikan pemaparan asap kendaraan bermotor dapat menyebabkan penurunan kadar SOD serum tikus wistar yang dipapar asap mesin berbahan bakar bensin
2. Membuktikan bahwa ada hubungan lama paparan dengan penurunan kadar SOD serum tikus yang dipapar asap mesin berbahan bakar bensin
3. Membuktikan bahwa ekstrak kacang tunggak dapat menghambat penurunan kadar SOD serum tikus wistar yang dipapar asap mesin berbahan bakar bensin

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diambil dari penelitian dalam Tugas Akhir ini adalah:

1.4.1 Manfaat Akademik

1. Turut menyumbang pengembangan ilmu pengetahuan di bidang kesehatan
2. Menambah referensi bacaan ilmiah yang dapat dijadikan kajian pustaka untuk penelitian atau penulisan karya ilmiah berikutnya yang terkait dengan efek ekstrak kacang tunggak (*Vigna unguiculata*)

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Memperluas pengetahuan masyarakat tentang efek dari kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) sebagai antioksidan terhadap paparan asap mesin berbahan bakar bensin

2. Mengenalkan kacang tunggak yang dapat digunakan sebagai obat herbal untuk meningkatkan kadar SOD akibat paparan asap mesin berbahan bakar bensin



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA



2.1 Asap Kendaraan Bermotor

2.1.1 Komponen Asap Kendaraan Bermotor

Sebagian besar kendaraan bermotor menghasilkan emisi gas buang yang buruk dan dapat mencemari udara di lingkungan. Hal ini bisa dikarenakan perawatan yang kurang memadai, pembakaran yang tak sempurna, ataupun penggunaan bahan bakar dengan kualitas yang kurang baik (misal kadar timbalnya tinggi). Polusi udara yang ditimbulkan ini sangat berpotensi mengganggu kesehatan karena bahan-bahan berbahaya yang terkandung di dalamnya.

Emisi kendaraan bermotor dengan mesin diesel mengandung senyawa kompleks yang terdiri dari fase gas dan partikulat. Fase gas mengandung bahan iritan dan non iritan seperti NO_x, SO_x, dan CO_x serta hidrokarbon seperti senyawa alkohol, aldehyd, dan derivat keton. Fase partikulat atau *diesel exhaust particle* (DEP) merupakan particulate matter (PM), berukuran sangat kecil dan mudah terhirup (Sagai *et al.*,1993)

2.1.2 Particulate Matter (PM)

Sebagian besar data epidemiologis menunjukkan particulate matter (PM) menimbulkan dampak yang tidak diinginkan terhadap kesehatan. Studi tentang PM yang telah dilakukan tidak hanya mengkaji efek PM terhadap sistem respirasi, namun juga terhadap sistem kardiovaskular. Akibat merugikan terhadap sistem kardiovaskular mulanya dikaitkan dengan paparan PM pada umumnya, tetapi diperlukan penjelasan lebih lanjut untuk mengidentifikasi komponen-komponen partikel polusi spesifik yang bertanggung jawab atas efek yang merugikan terhadap kesehatan. Konsekuensi paparan PM yang dapat terjadi antara lain, perubahan reaktivitas vaskular, perubahan variasi denyut

jantung, serta augmentasi injuri iskemi-reperfusi (Timothy, 2009). Polusi PM juga dikaitkan dengan disfungsi endotel dan vasokonstriksi; peningkatan tekanan darah; perubahan prothrombotik dan koagulasi; inflamasi sistemik dan respon stress oksidatif; ketidakseimbangan sistem otonom serta progresi aterosklerosis. Peningkatan resiko kejadian kardiovaskular diasosiasikan dengan paparan terhadap PM halus <math> < 2.5 \mu\text{m}</math> ($\text{PM}_{2.5}$) yaitu peningkatan resiko eksaserbasi MI, stroke, aritmia, dan gagal jantung apabila terpapar dalam hitungan jam sampai hari pada individu yang rentan. Sejumlah studi juga telah menunjukkan bahwa tinggal di area dengan tingkat PM yang lebih tinggi dalam jangka waktu lama meningkatkan resiko mortalitas kardiovaskular (Brook *et al.*, 2010).

Sumber utama PM meliputi proses kombusi, mekanis, dan debu environmental. PM dikategorikan secara luas menurut diameter aerodinamisnya yaitu (Cozzi, 2006):

1. *fine particle* ($< 2.5 \mu\text{m}$ [$\text{PM}_{2.5}$]) dan *ultrafine* ($< 0.1 \mu\text{m}$ [UFP]), yang kebanyakan berasal dari gas diesel.
2. *coarse particle* (2.5 sampai $10 \mu\text{m}$ [$\text{PM}_{10-2.5}$]), yang berasal dari proses penghancuran dan pengasahan suatu permukaan benda.
3. Komponen toksik UFP yang meliputi gas-gas oksidan, senyawa organik, dan besi transisi diabsorpsi ke dalam inti karbon partikel tersebut

PM_{10} mengandung fraksi *coarse particle* dan *fine particle*, sedangkan $\text{PM}_{2.5}$ sendiri mengandung UFP. Konsentrasi PM_{10} dan $\text{PM}_{2.5}$ diukur menurut massa per volume udara ($\mu\text{g}/\text{m}^3$), sedangkan UFP biasanya diukur menurut jumlahnya per kubik cm.

Mekanisme PM dalam menimbulkan dampak terhadap kesehatan adalah menginduksi efek proinflamasi sel target, seperti sel endotel, makrofag, dan sel

epitel melalui pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) dan stres oksidatif. Efek prooksidatif ini dipicu oleh molekul-molekul organik siklus redoks dan metal transisi yang terdapat pada permukaan partikel (Araujo *et al.*, 2008).

2.2 Radikal Bebas

2.2.1 Definisi radikal bebas

Radikal bebas didefinisikan sebagai suatu senyawa kimia yang dapat berupa atom, molekul atau fragmen molekul, mampu berdiri sendiri dan memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada molekul orbitalnya (Gutteridge and Halliwell, 2006).

2.2.2 Tipe Radikal Bebas

Radikal bebas terpenting dalam tubuh adalah radikal derivat dari oksigen yang disebut kelompok oksigen reaktif (*reactive oxygen species*/ROS), termasuk didalamnya adalah triplet ($3O_2$), tunggal (singlet/ 1O_2), anion superoksida (O_2^-), radikal hidroksil (-OH), nitrit oksida (NO $^-$), peroksinitrit (ONOO $^-$), asam hipoklorus (HOCl), hidrogen peroksida (H_2O_2), radikal alkoxy (LO $^-$), dan radikal peroksil (LO $_2$). Radikal bebas yang mengandung karbon (CCL $_3$) yang berasal dari oksidasi radikal molekul organik. Radikal yang mengandung hidrogen hasil dari penyerangan atom H (H $^-$). Bentuk lain adalah radikal yang mengandung sulfur yang diproduksi pada oksidasi glutation menghasilkan radikal thiyl (R-S $^-$). Radikal yang mengandung nitrogen juga ditemukan, misalnya radikal fenyldiazine (Arief 2007).

2.2.3 Pembentukan Radikal Bebas

Terdapat dua sumber pembentukan radikal bebas, sumber endogen dan sumber eksogen. Radikal bebas endogen atau intraseluler diantaranya dihasilkan dari proses autoksidasi dan proses inaktivasi molekul-molekul kecil, seperti flavin tereduksi dan thiol, serta aktivitas oksidasi, siklooksigenasi, lipoksigenasi, dehidrogenasi, dan peroksidasi. Oksidasi dan sistem transpor elektron merupakan sumber radikal bebas oksigen reaktif yang utama. Transfer elektron oleh metal transisi juga dapat menginisiasi reaksi radikal bebas. Radikal bebas dihasilkan di semua bagian sel meliputi mitokondria, lisosom, peroksisom, nukleus, retikulum endoplasma, membran plasma serta dalam sitosol. Sumber eksogen meliputi asap rokok, polutan tertentu dan pelarut organik, obat anastesi, lingkungan yang hiperoksik, dan pertisida. Beberapa dari komponen ini seperti juga dengan obat-obatan dimetabolisasi menjadi produk radikal bebas yang telah dibuktikan dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada target jaringan. Selain itu radikal bebas juga dapat terbentuk melalui eksposur terhadap radiasi pengionan, obat-obatan yang mampu mendaur reaksi redoks, atau terhadap xenobiotik (Crapo, 2003).

2.2.4 Efek Radikal Bebas

Jumlah radikal bebas yang melebihi antioksidan endogen akan membuat radikal bebas bereaksi dengan lemak, protein, asam nukleat seluler, sehingga terjadi kerusakan lokal dan disfungsi organ tertentu. Lemak merupakan biomolekul yang rentan terhadap serangan radikal bebas.

a. Peroksidasi lemak

Membran sel mengandung sumber *poly unsaturated fatty acid* (PUFA) yang mudah dirusak oleh bahan-bahan pengoksidasi sehingga mengalami

proses peroksidasi lemak. Hal ini sangat merusak karena merupakan suatu proses berkelanjutan. Pemecahan hidroperoksida lemak sering melibatkan katalisis ion logam transisi (Arief, 2007).

b. Kerusakan protein

Protein dan asam nukleat lebih tahan terhadap radikal bebas daripada PUFA, sehingga kecil kemungkinannya terjadi reaksi berantai yang cepat. Serangan radikal bebas terhadap protein sangat jarang kecuali bila sangat ekstensif dan radikal tersebut mampu berakumulasi (jarang pada sel normal), atau bila kerusakannya terfokus pada daerah tertentu dalam protein. Salah satu penyebab kerusakan terfokus adalah jika protein berikatan dengan ion logam transisi (Arief, 2007).

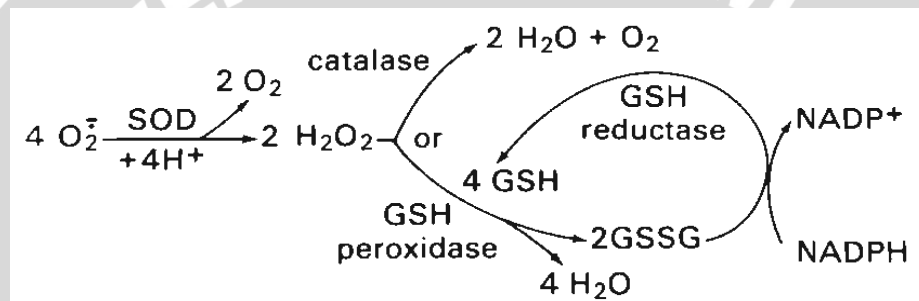
c. Kerusakan DNA

Seperti pada protein kecil kemungkinan terjadinya kerusakan di DNA menjadi suatu reaksi berantai, biasanya Kerusakan DNA terjadi bila ada lesi pada susunan molekul dan bila terjadi sebelum replikasi maka dapat terjadi mutasi. Radikal oksigen dapat menyerang DNA jika radikal tersebut terbentuk disekitar DNA, seperti pada radiasi biologis (Arief, 2007). Radiasi ionisasi juga dapat menginduksi beberapa lesi pada DNA yang menyebabkan delesi, mutasi, dan efek genetik letal lainnya.

2.2.5 Pertahanan sel terhadap radikal bebas

Terdapat mekanisme pertahanan tubuh terhadap efek perusakan suatu bahan teroksidasi kuat. SOD (superoksida dismutase dan katalase) mengkatalisasi dismutasi dari superoksida dan hidrogen peroksida. GSH (glutathion) peroksidase mereduksi peroksida hidrogen dan organik menjadi air

dan alkohol. GSH *S-transferase* melakukan pemindahan residu glutation menjadi metabolit elektrofilik reaktif dari *xenobiotic*. Produksi glutation teroksidasi (GSSG) direduksi secara cepat oleh reaksi yang menggunakan NADPH yang dihasilkan dari berbagai sistem intraseluler, diantaranya *hexose-monophosphate shunt*. Berbagai isoenzim organel spesifik dari dismutase superoksida juga ditemukan. SOD Zn, Cu merupakan sitoplasmik, sedangkan enzim Zn, Mn mitokondrial. Isoenzim ini tidak ditemukan dalam cairan ekstraseluler (Arief, 2007).



Gambar2.1 Enzim-enzim antioksidan (Arief, 2007)

2.3 Reactive Oxygen Species (ROS)

Reactive oxygen species (ROS) adalah ion dengan tingkat reaktif sangat tinggi, termasuk didalamnya radikal bebas yang mengandung molekul oksigen. Radikal bebas yang termasuk kelompok ROS adalah superoksida (), Hidroksil (), Peroksil (), alkoksil (). Akan tetapi tidak semua kelompok ROS adalah radikal bebas. Beberapa agen oksidasi yang dapat dengan mudah dikonversikan menjadi radikal masuk dalam kelompok ini seperti HOCL, ozon (), peroksinitrit (), dan hidrogen peroksida (). RNS (*reactive nitrogen species*) memiliki pengertian yang sama dengan ROS, akan tetapi digunakan untuk agen yang mengandung molekul nitrogen seperti oksida nitrit radikal () dan produksi nitrogen oksida lain ketika bereaksi dengan ,

RO^{\cdot} , dan RO_2^{\cdot} (Gutteridge dan Halliwell, 2006). ROS telah lama dianggap sebagai produk sampingan metabolisme sel yang toksik dan potensial menyebabkan kerusakan pada lipid, protein, dan DNA. Tetapi, ROS memiliki peranan lain yang penting, yaitu sebagai regulasi sinyal dan fungsi sel (Crapo, 2003).

ROS secara kontinyu dihasilkan melalui proses metabolisme di dalam semua sel makhluk hidup. Pada kondisi fisiologis normal, produksi ROS seluler dikontrol oleh enzim antioksidan dan molekul redox yang lain. Keseimbangan antara produksi ROS dan eliminasinya sangat penting untuk menjaga status redox seluler. Sedikit peningkatan ROS dapat menstimulasi proliferasi dan pertumbuhan sel. Walaupun demikian, akumulasi ROS yang berlebih dapat mengakibatkan injuri seluler, seperti kerusakan pada DNA, protein, dan membrane lipid. Dikarenakan efeknya yang sangat berbahaya. ROS yang berlebihan harus cepat dieliminasi dari sel oleh sejumlah mekanisme pertahanan antioksidan, seperti superoksida dismutase (SOD), katalase, dan peroksidase lain (Hu, 2005).

Oksigen molekuler (dioksigen; O_2) tidak diragukan lagi sangat penting untuk pertahanan hidup semua organism aerob. Metabolisme energi aerobik bergantung pada proses fosforilasi oksidatif, suatu proses dimana energi oksidoreduksi transfer elektron di mitokondria (melalui kompleks enzimatis NADH dehidrogenase) diubah menjadi ATP yang berikatan fosfat energi tinggi. O_2 berfungsi sebagai penerima elektron akhir untuk sitokrom c oksidase, yang mengkatalisis reduksi elektron O_2 menjadi H_2O . Metabolit O_2 yang separo tereduksi dan sangat reaktif dapat terbentuk selama reaksi transfer elektron ini

meliputi anion superoksida (O_2^-) dan hidrogen peroksida (H_2O_2) (Scandalios, 2005).

Radikal anion superoksida (O_2^-) merupakan senyawa yang sangat kuat karena mampu teroksidasi menjadi O_2 atau tereduksi menjadi H_2O_2 dengan energi yang sangat besar. Radikal superoksida terbentuk diantaranya melalui autooksidasi hemoglobin menjadi methemoglobin di eritrosit; di jaringan lain, dibentuk melalui kerja enzim seperti sitokrom P450 reduktase dan xanthin oxidase. Superoksida secara spontan mengalami dismutase sehingga terbentuk H_2O_2 dan O_2 , yang akan mengalami peningkatan kecepatan reaksi akibat kerja enzim superoksida dismutase (Murray et al, 2000).

Superoksida dieliminasi oleh superoksida dismutase (SOD), enzim scavenger konsentrasi tinggi, yang memiliki isoenzim-isoenzim berbeda yang masing-masing terletak di mitokondria, sitoplasma, dan kompartemen ekstraselular. NO berdifusi secara cepat melintasi jaringan ke dalam sel darah merah, dimana NO akan dikonversi menjadi nitrat melalui reaksi dengan oksihemoglobin. Hal ini akan membatasi waktu paruh NO in vivo. Ketika superoksida dan NO disintesis dalam sel yang saling berdekatan, maka keduanya akan bergabung secara spontan membentuk peroksinitrat melalui reaksi difusi-terlimitasi. Intinya, setiap kali NO dan superoksida bertubrukan, maka akan terbentuk peroksinitrit. NO merupakan satu-satunya molekul yang diketahui bereaksi cepat dengan superoksida dan produksinya cukup tinggi untuk berkompetisi dengan SOD. Konsekuensinya reaksi kinetik dan termodinamik antara superoksida dengan NO mengakibatkan pembentukan peroksinitrit in vivo tidak terhindarkan.

2.4 Reaksi Radikal Bebas

Radikal oksigen dilepaskan selama proses respiratory burst sel granulosit (PMN). Sifatnya yang reaktif menyebabkan senyawa ini menjadi agen bakterisidal melalui proses fagositosis (Sessa *et al.*, 2012) sekaligus menimbulkan kerusakan jaringan pada area inflamasi. Pada awalnya, respiratory burst dihubungkan dengan proses fagositosis, tetapi kemudian banyak studi menunjukkan bahwa PMN yang langsung kontak dengan suatu partikel asing atau adherensi ke suatu permukaan teropsonisasi yang besar menginduksi pelepasan metabolit oksigen (Mason *et al.*, 2010). Ketika distimulasi oleh kontak dengan partikel asing, neutrofil akan memperlihatkan ledakan respiratori (*respiratory burst*) yang dikatalisis oleh enzim NADPH-oksidas. NADPH-oksidas bertanggung jawab dalam proses transfer elektron dari NADPH ke O_2 dan menghasilkan radikal bebas superoksida. (Forman dan Torres, 2008).

2.5 Stres Oksidatif

Oxidative stress merupakan suatu keadaan di mana tingkat *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI) yang toksik melebihi pertahanan anti-oksidan endogen. Radikal bebas yang berlebihan akan bereaksi dengan lemak, protein, asam nukleat seluler sehingga terjadi kerusakan lokal dan disfungsi organ tertentu. *Reactive oxygen species* (ROS) seperti superoksida dan peroksida menginduksi terjadinya stres oksidatif, berkontribusi dalam inisiasi dan progresif dari aterosklerosis. Hidrogen peroksida, peroksinitrit, asam hipoklorat, radikal bebas seperti anion superoksida, radikal hidroxil merupakan *reactive oxygen species* (ROS) (Davies, 2000).

2.6 Antioksidan

2.6.1 Definisi

Istilah antioksidan mengacu pada semua senyawa yang mampu meredam *reactive oxygen species* (ROS) tanpa mengalami konversi menjadi radikal baru yang destruktif serta mampu mencegah kerusakan yang dapat ditimbulkan oleh ROS (Ratnam *et al.*, 2006)

2.6.2 Klasifikasi Antioksidan

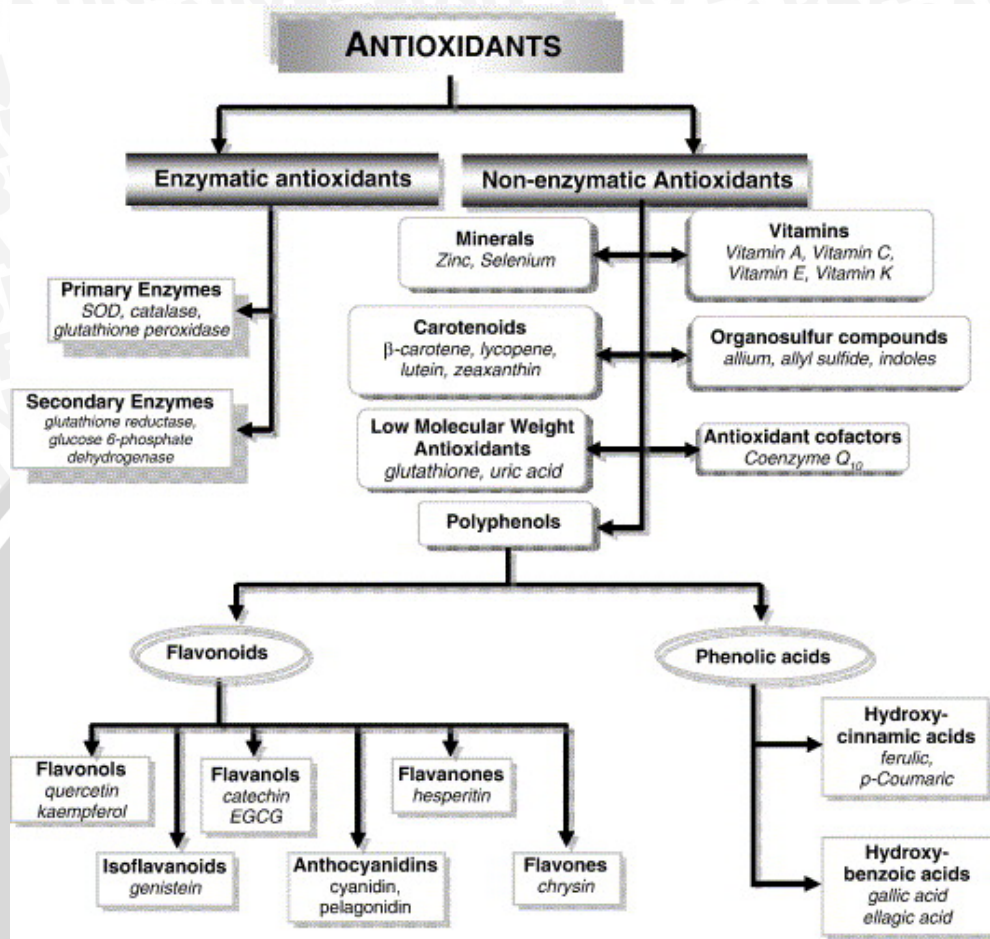
Antioksidan dapat dibagi menjadi dua jenis yaitu (Flora, 2009):

1. Antioksidan enzimatik yang terdiri dari:

- enzim primer yaitu, SOD yang mengkatalisis dismutasi radikal superoksida; CAT yang mengkonversi hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen molekuler; serta glutathione peroksidase yang mengeliminasi peroksida;
- enzim sekunder yaitu, glutathione reductase dan glukosa 6-fosfat dehidrogenase.

2. Antioksidan non enzimatik terdiri dari:

- vitamin larut air seperti vitamin C yang mendegradasi ROS melalui transfer elektron yang menghambat peroksidasi lemak;
- antioksidan kofaktor yaitu koenzim Q yang berperan sebagai antioksidan yang larut di dalam membran lemak;
- mineral seperti zinc dan selenium;
- karotenoid seperti beta-karotene, likopen, lutein;
- senyawa fenol yang berperan sebagai pemecah rantai radikal bebas dan sebagai *metal chelator*.



Gambar2.2 Klasifikasi antioksidan (Ratnam et al., 2006)

2.6.3 Mekanisme Kerja Antioksidan

Sel memiliki pertahanan yang hebat dalam melawan kerusakan oksidatif yaitu melalui antioksidan. Mekanisme antioksidan dalam melindungi sel melalui berbagai cara, diantaranya:

- a) Mencegah pembentukan radikal;

- b) Menahan sewaktu radikal dibentuk;
- c) Memperbaiki kerusakan oksidatif yang diakibatkan radikal;
- d) Meningkatkan eliminasi molekul yang rusak; dan
- e) Mencegah mutasi dengan tidak melakukan kerusakan molekul yang berlebihan.

Secara umum cara kerja antioksidan adalah dengan menghambat oksidasi lemak. Oksidasi lemak sendiri terdiri dari tiga tahap utama, yaitu inisiasi, propagasi, dan terminasi. Pada tahap inisiasi terjadi pembentukan radikal asam lemak, yaitu suatu senyawa turunan asam lemak yang bersifat tidak stabil dan sangat reaktif akibat dari hilangnya satu atom hidrogen. Tahap selanjutnya yaitu propagasi dimana radikal asam lemak akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksi yang lebih lanjut akan menyerang asam lemak menghasilkan hidroperoksida dan radikal asam lemak baru. Hidroperoksida yang terbentuk sifatnya tidak stabil dan akan terdegradasi menghasilkan senyawa-senyawa karbonil rantai pendek, seperti aldehida dan keton. Antioksidan yang baik akan beraksi dengan radikal asam lemak ini segera setelah terbentuk. Berbagai macam antioksidan yang ada mempunyai mekanisme kerja dan kemampuan yang sangat bervariasi (Kumalaningsih, 2006).

2.7 Superoksida dismutase

SOD merupakan suatu enzim yang mengkatalisis dismutasi radikal anion superoksida menjadi O_2 dan H_2O_2 yang selanjutnya akan dieliminasi lagi oleh katalase dan peroksidase.

Semua jaringan mamalia memiliki tiga bentuk SOD (Zelko *et al.*, 2002):

1. Cu/ZnSOD (SOD1)
2. MnSOD (SOD2)
3. SOD ekstraselular (ecSOD atau SOD3)

Yang membedakan antara isoform-isoform ini adalah lokasinya: Cu/ZnSOD yang mengandung homodimer Cu dan Zn, berada di sitosol; MnSOD yang mengandung tetramer Mn di mitokondria; dan ecSOD berada di matriks ekstraselular. SOD1 dan SOD2 ditranskripsi di semua sel di intrasel. Aktivitas ecSOD 10 kali lipat lebih tinggi di dinding pembuluh dibandingkan dengan di jaringan lain, dimana SOD1 dan SOD2 mewakili sebagian besar aktivitas SOD. Oleh karena itu, di dinding pembuluh ecSOD memainkan peranan penting pada regulasi status redox vaskular di ekstraselular. EcSOD merupakan SOD sekretori ekstraselular yang mengandung Cu/Zn, yang terdapat di permukaan hampir semua sel. EcSOD dianggap sebagai komponen yang sangat penting dari total SOD di dinding pembuluh, mencakup sepertiga sampai setengah dari total jumlah aktivitas SOD (Heistad *et al.*, 2009). Produksi ecSOD predominan terletak di sel otot polos, sedangkan sel endotel tidak menghasilkan. Meskipun ecSOD dihasilkan utamanya di sel otot polos, ecSOD dapat terikat pada heparin sulfat di permukaan sel endotel dan dapat diinternalisasi di sel endotel (Fukai dan Masuko, 2011). Dengan demikian, enzim antioksidan poten ini dapat diproduksi oleh sel otot polos pembuluh darah dan berakhir di dalam sel endotel.

Sejumlah stimulus yang dapat meningkatkan ekspresi SOD1 antara lain: *heat shock*, *shear stress*, radiasi sinar X dan UVB, logam berat, H₂O₂, ozon, NO, asam arakidonat, dan xenochemical. Sedangkan sejumlah senyawa yang meningkatkan transkripsi SOD2 adalah sitokin seperti IL-1, IL-4, LPS, IFN- γ .

Karena mitokondria merupakan tempat dimana banyak dihasilkan radikal superoksida, MnSOD mempunyai peran penting dalam mendetoksifikasi sel dari radikal ini. Sebagai tambahan, agen farmakologis dan sitokin yang meningkatkan produksi ROS intraselular seperti paraquat dan tumor necrosis- α (TNF- α), menginduksi ekspresi MnSOD (Quijano *et al.*, 2001).

Tidak seperti ekspresi SOD1 dan SOD di intrasel, ekspresi SOD3 terbatas hanya pada sejumlah jenis sel tertentu. Di jaringan fibroblas, kadar SOD3 ditingkatkan oleh IFN- γ dan IL-1 α . Faktor vasoaktif seperti histamin, vasopressin, oksitosin, endotelin-1, serotonin, dan heparin dapat meningkatkan kadar enzim ini sehubungan dengan perannya dalam proteksi dinding pembuluh. Peningkatan konsentrasi SOD3 juga diketahui menghambat degradasi NO oleh radikal oksigen (Zelko *et al.*, 2002).

2.8 Kacang Tunggak

Tanaman kacang tunggak dalam tata nama (taksonomi) tumbuhan diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	:	Plantae
Divisi	:	Spermatophyta
Subdivisi	:	Angiospermae
Kelas	:	Magnoliopsida
Ordo	:	Rosales
Famili	:	Leguminoceae
Genus	:	Vigna
Spesies	:	<i>Vigna unguiculata</i> (L.)

(Fachruddin, 2007)

2.8.1 Morfologi Kacang Tunggak

Di Indonesia ada yang menyebut kacang tunggak sebagai kacang tolo, kacang tunggak, kacang dadap, atau kacang beras. Kacang tunggak merupakan salah satu jenis kacang-kacangan yang bentuknya mungil, sekitar 2 kali besar biji kacang hijau dan warnanya kuning kecokelatan. Tanaman kacang ini termasuk dalam tumbuhan herbal, lemah, mudah berkembang biak, tumbuh tegak dan memiliki pertumbuhan tercepat di antara tanaman kacang-kacangan lainnya (Fachruddin, 2007).

Tanaman kacang tunggak batangnya pendek dan berbuku-buku. Daunnya agak kasar dengan posisi bersusun tiga dan memiliki tangkai daun yang agak panjang. Bagian lateral daunnya asimetris, sedangkan bagian tengahnya simetris. Bunga berbentuk seperti kupu-kupu, terletak pada ujung tangkai yang panjang. Buahnya berbentuk polong, berwarna hijau, berukuran sekitar 10 cm, dan kaku. Biji kacang tunggak sendiri berbentuk bulat panjang dan agak pipih dengan ukuran 4-6 mm x 7-8 mm. Akar tanaman kacang tunggak menyebar pada kedalaman tanah antara 30 cm - 60 cm. Sifat penting dari akar tanaman kacang tunggak adalah dapat



Gambar 2.3 biji *Vigna unguiculata* (www.cnseed.org)

bersimbiosis dengan bakteri *rhizobium* sp., untuk mengikat nitrogen bebas (N_2) dari udara yang kemudian dibentuk menjadi nodula-nodula (bintil-bintil) akar (Rukmana *et al.*, 2000) .

2.8.2 Penyebaran Pertumbuhan Kacang Tunggak

Kacang tunggak merupakan salah satu hasil panen yang menonjol di daerah bercuaca panas, karena lebih tahan terhadap kekeringan, tanah yang kurang subur, dan keadaan stres asam dibanding kacang-kacangan lainnya. Tanaman ini mampu menyerap 140 mm air dengan cepat selama 66 hari periode hidupnya. Kondisi tanah yang paling ideal bagi pertumbuhan kacang tunggak adalah tanah yang porus, banyak mengandung bahan organik (humus), dapat menahan kelembapan tanah, dan mempunyai pH tanah 5,5 - 6,5. Tanaman kacang tunggak ini tersebar di daerah tropis dan subtropis, meliputi kawasan Asia, Afrika, Eropa Selatan, Amerika Tengah, dan Amerika Latin. Di Indonesia daerah yang potensial untuk pengembangan tanaman kacang tunggak seperti di

pantai utara Jawa, kawasan Indonesia Timur, Sulawesi Selatan, dan daerah transmigrasi Sumatera dan Kalimantan yang bertanah sulfat asam (Rukmana *et al.*, 2000).

2.8.3 Kandungan Kacang Tunggak

Kacang tunggak mengandung sejumlah nutrisi yang dibutuhkan tubuh, yaitu protein 23 %, karbohidrat yang tinggi 60 %, dan lemak 2%. Kacang tunggak juga mengandung asam amino lisin dalam jumlah besar, tapi hanya mengandung asam amino metionin dan sistin dalam jumlah sedikit (Fageria *et al.*, 2002). Kandungan lainnya yaitu zat besi, tembaga, dan magnesium. Kacang ini juga sangat baik bagi ibu hamil karena mengandung asam folat dan fosfor (Febrianindya, 2011). Lebih lanjut kandungan gizi dalam 100g biji kacang tunggak bisa dilihat dalam tabel berikut:

Tabel 2.1 Kandungan Gizi Biji Kacang Tunggak Setiap 100g (Rukmana *et al.*, 2000).

No.	Kandungan Gizi	Jumlah
1	Kalori	342,00 kal
2	Karbohidrat	61,60 g
3	Protein	22,90 g
4	Lemak	1,40 g
5	Kalsium	77,00 g
6	Fosfor	449,00 mg
7	Zat besi	6,50 mg
8	Vitamin B1	0,92 mg
9	Vitamin C	2,00 mg
10	Air	11,00 g

Selain itu, biji kacang tunggak memiliki kandungan senyawa-senyawa flavonoid seperti golongan flavonol (quercetin, kaempferol, dan myricetin) dan turunan isoflavon (genistein dan deidzein). Dengan analisis *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), dinyatakan bahwa kacang tunggak *subspecies unguiculata* mengandung jumlah genistein tertinggi (16,9 ug/g) dan kadar kaempferol yang lebih tinggi (20,3 ug/g) dibandingkan *subspecies* lainnya. Kacang tersebut ternyata memiliki kadar myricetin sebesar 51,3 ug/g dan quercetin sebesar 412,5 ug/g (Wang *et al.*, 2008).

2.8.4 Manfaat Antioksidan dan Antiinflamasi Kacang Tunggak

Senyawa dalam kacang tunggak yang berfungsi sebagai antioksidan dan antiinflamasi misalnya genistein. Sebagai antioksidan, genistein dapat menurunkan kadar lipid peroksidase dan meningkatkan enzim *superoxide dismutase*. Dilaporkan juga bahwa genistein memiliki sifat antioksidan yang disebabkan sifat reaktif terhadap radikal bebas sehingga dapat menghambat perkembangan sel kanker pada fase promosi (Pawiroharsono, 2001). Selain efek antioksidan, genistein juga mempunyai efek antiinflamasi baik *in vivo* maupun *in vitro*. Genistein dilaporkan dapat menghambat produksi molekul-molekul proinflamasi pada kondrosit manusia (Hooshmand *et al.*, 2007) dan menghambat aktivasi kedua faktor transkripsi yang penting untuk iNOS, yaitu STAT-1 dan NF- κ B yang turut menjelaskan efeknya sebagai antiinflamasi (Hamalainen, 2007). Selain itu, genistein mempunyai efek menekan ekspresi mRNA molekul-molekul proinflamasi, seperti TNF- α , MCP-1, dan ICAM-1 pada sel-sel endothel mikrovaskular otak yang terinduksi hemolisis, meskipun tidak berefek terhadap ekspresi VCAM-1 (Lu *et al.*, 2009). Suplementasi genistein tinggi 598 mg/kg

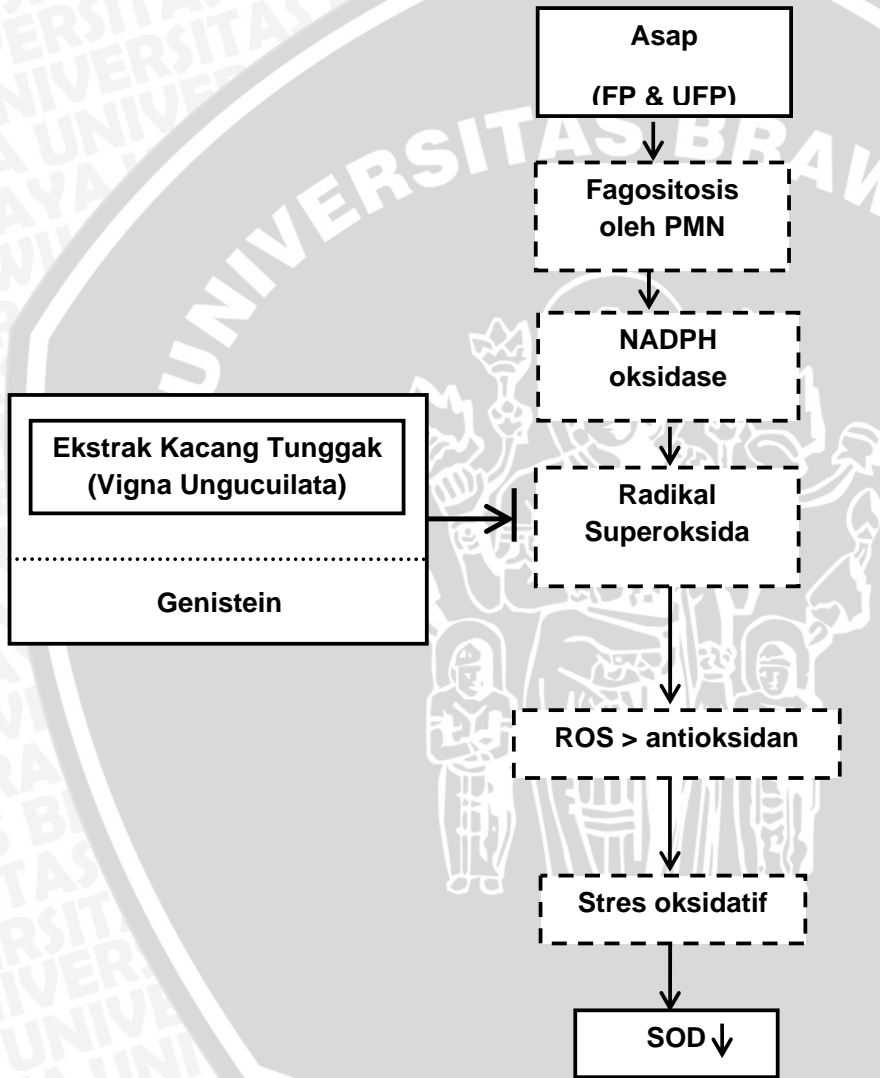
pakan pada tikus yang dilatih berlari selama 4 minggu dapat meningkatkan SOD dari 0,08 menjadi 0,091 U/mg protein RBC. Genistein secara in vitro menghambat pertumbuhan dan penyebaran sel kanker prostat yang bergantung ataupun tidak bergantung pada androgen (Winarsi, 2007).

Senyawa flavonoid aglikon lain yang terkandung dalam kacang tunggak adalah quercetin, kaempferol, dan isorhamnetin (Fatokun, 2002). Quercetin mempunyai efek antiinflamasi yang terjadi melalui mekanisme penghambatan produksi nitrit oksida dan penghambatan siklooksigenase-2 (COX-2). Efek antioksidan juga dimiliki quercetin dengan menangkap radikal oksigen dan perlindungan terhadap peroksidasi lipid (Herowati, 2008).



BAB 3
KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3. 1 Kerangka Konsep

Keterangan:



Asap kendaraan yang dihirup oleh tikus, yang mengandung *particulate matter* (PM) akan memicu fagositosis PM (FP dan UFP) oleh sel PMN (*respiratory burst/oxidative burst*). Pada proses *oxidative burst*, melalui perantara reaksi NADPH oksidase, akan dihasilkan *reactive oxygen species* (ROS), terutama radikal superoksida.

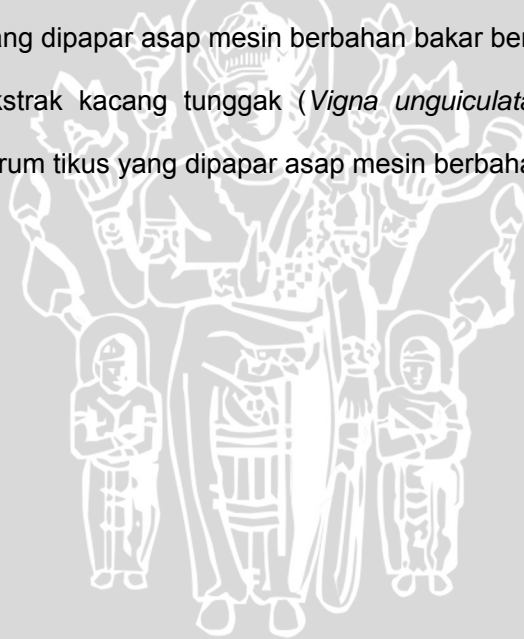
Superoksida dismutase (SOD) merupakan antioksidan lini pertama dalam memerangi radikal superoksida. SOD mengkatalisis dismutasi radikal superoksida menjadi oksigen dan hidrogen peroksida. Produksi radikal superoksida secara terus menerus akan menyebabkan keadaan stress oksidatif. Stress oksidatif adalah suatu kondisi dimana kadar prooksidan melebihi kadar antioksidan sehingga terjadi imbalance status redoks seluler. Stress oksidatif akan menurunkan kadar SOD dalam tubuh.

Genistein pada ekstrak kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) merupakan suatu antioksidan yang menghambat radikal bebas sehingga diharapkan dapat meningkatkan kadar superoksida dismutase (SOD). Kacang tunggak, yang mengandung genistein, diberikan dalam bentuk ekstrak kepada tikus.

Pemberiaan ekstrak kacang tunggak ini diharapkan akan menurunkan terjadinya pembentukan radikal bebas serta meningkatkan kadar antioksidan dalam tubuh tikus. Hal ini akan mengakibatkan terjadinya penurunan stress oksidatif dalam tubuh tikus.

3.2 Hipotesis Penelitian

- 3.2.1 Paparan asap mesin berbahan bakar bensin dapat menyebabkan penurunan kadar SOD serum tikus.
- 3.2.2 Terdapat hubungan antara lama paparan dengan penurunan kadar SOD serum tikus yang dipapar asap mesin berbahan bakar bensin.
- 3.2.3 Pemberian ekstrak kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) meningkatkan kadar SOD serum tikus yang dipapar asap mesin berbahan bakar bensin.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* pada hewan coba tikus wistar (*Rattus norvegicus*) dengan “*control group design*”, yaitu membandingkan hasil yang didapat setelah perlakuan dengan menggunakan kontrol positif dan negatif. Termasuk dalam jenis *post test control group design* karena melakukan pengujian sesudah intervensi.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah tikus *Rattus norvegicus* putih jantan galur Wistar yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2.2 Pemilihan Sampel

4.2.2.1 Kriteria Inklusi

1. Tikus jantan
2. Berat badan tikus 100-200 gram
3. Usia >8 minggu
4. Kondisi sehat (aktif, tidak cacat)

4.2.2.2 Kriteria Eksklusi

1. Bobot tikus menurun hingga berat badannya kurang dari 150 gram
2. Tikus mati dalam masa penelitian

Sampel yang digunakan adalah tikus jenis *Rattus norvegicus*. Jenis kelamin tikus yang digunakan adalah tikus jantan yang sehat karena pada tikus

betina terdapat estrogen yang mempengaruhi metabolisme lemak dan kolesterol (Anshory, 2008).

Tikus dipilih sebagai sampel karena tikus merupakan hewan coba yang tergolong jinak dan mudah perawatannya. Alasan penggunaan tikus sebagai hewan coba adalah sebagai berikut:

- Ukurannya kecil
- Memiliki sensitivitas yang besar terhadap obat
- Lebih terstandarisasi dibanding dengan binatang percobaan lainnya.
- Dapat dibiakkan untuk menjamin keaslian dan keseragaman galur.
- Tidak bisa muntah karena tidak memiliki pusat muntah.

Tikus juga dianggap sebagai prototipe ideal untuk penelitian histopatologi maupun biokimia oleh karena proses metabolisme maupun anatominya tidak jauh berbeda dengan manusia. Adapun pada penelitian ini dipergunakan tikus wistar morfologinya yang besar sehingga diharapkan secara teknis lebih mudah.

Penelitian ini membagi sampel dalam sembilan kelompok perlakuan, yaitu:

Kelompok Perlakuan	Asap	O ₂ (4 menit)	Ekstrak Kacang Tunggak
N	-	-	-
N + O ₄	-	+	-
N + G	-	-	+
A ₂ O ₄ (-)G	2 menit	+	-
A ₂ O ₄ (+)G	2 menit	+	+
A ₃ O ₄ (-)G	3 menit	+	-
A ₃ O ₄ (+)G	3 menit	+	+
A ₄ O ₄ (-)G	4 menit	+	-
A ₄ O ₄ (+)G	4 menit	+	+

4.2.3 Jumlah Sampel

Jumlah replikasi yang digunakan untuk setiap perlakuan memakai rumus :

$$(t-1)(r-1) \geq 15 \text{ (Hanafiah, 2005).}$$

t = jumlah perlakuan

r = jumlah replikasi

15 = nilai konstanta

Pada penelitian ini, jumlah perlakuan adalah 9 ($t = 9$) sehingga jumlah replikasi adalah:

$$(9-1)(r-1) \geq 15$$

$$8r \geq 23 \quad r \geq 23 : 8 \quad r \geq 2.875$$

Jadi pengulangan untuk setiap perlakuan yang dibutuhkan untuk setiap perlakuan minimal 3 ekor. Pada penelitian ini digunakan sampel adalah 36 ekor tikus untuk 9 kelompok perlakuan dan kontrol.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (Independent)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah lama paparan asap mesin berbahan bakar bensin yang diberikan dalam berbagai dosis waktu dan pemberian ekstrak kacang tunggak pada kelompok perlakuan.

4.3.2 Variabel Tergantung (Dependent)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pengukuran kadar SOD serum tikus *Rattus norvegicus* galur wistar.

4.4.3 Variabel Luar

1. Jenis Kelamin tikus :
2. Usia tikus :2,5-3 bulan
3. Berat badan tikus : \pm 200 gram.

4. Waktu pengujian : lama paparan asap mesin berbahan bakar bensin dengan pemberian ekstrak kacang tunggak.
5. Faktor lingkungan laboratorium di mana tikus ditempatkan dan di lakukan pengukuran kadar SOD serum tikus.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk pemeliharaan dan perlakuan terhadap hewan coba. Pengamatan tentang kadar superoksida dismutase (SOD) dan serum tikus *Rattus norvegicus* galur wistar dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

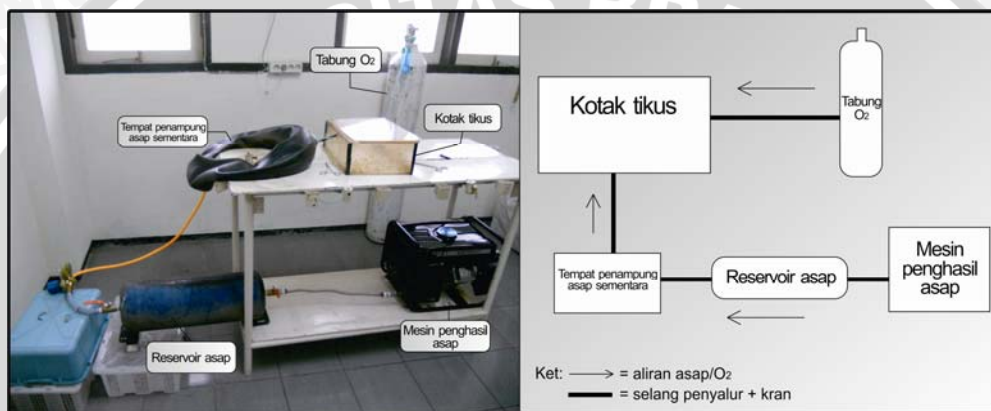
Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah:

1. Bahan untuk makanan tikus *Rattus norvegicus* terdiri dari Comfeed PARS 66,67% (dengan kandungan air 12%, protein 11%, lemak 4%, serat 7%, abu 8%, Ca 1,1 %, Fosfor 0,9%, antibiotic coccidiostat 53%) dan air 33,33%.
2. Asap mesin berbahan bakar bensin yang dipaparkan berasal dari mesin diesel modifikasi, bahan bakar.
3. Kacang tunggak yang telah diekstraksi.
4. Bahan pemeriksaan spektrofotometer
Serum tikus, SOD, spektrofotometer kit unit.
5. Air untuk mencuci *box smoking pump* serta untuk minum tikus.

4.5.2 Alat/Instrumen Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mesin untuk pemberian asap berupa "Pump" buatan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Terdiri atas beberapa kotak, mesin berbahan bakar bensin, alat pengatur banyak sedikitnya asap dan tabung oksigen



Gambar 4.1 Mesin Pump

2. Alat pembuatan pakan hewan coba: timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggiling pakan, dan nampan.
3. Alat untuk membuat ekstrak kacang tunggak :
 - a. Oven
 - b. Blender
 - c. Timbangan (1)
 - d. Gelas Erlenmeyer (2)
 - e. Corong gelas (1)
 - f. Kertas saring (1)
 - g. Labu evaporator(1)
 - h. Labu penampung metanol (1)
 - i. Evaporator (1)

j. Pendingin spiral / rotary evaporator (1)

k. Selang water pump

l. Water pump

m. Water bath

n. Vacum pump (1)

o. Botol hasil ekstrak

3. Alat Untuk Pemberiaan Ekstrak kacang tunggak

- Sonde

4. Alat untuk mengambil sampel

Sprit 5 ml, seperangkat tabung reaksi, kapas.

5. Alat untuk pengukuran kadar SOD

Tabung reaksi, sentrifuge, spektrofotometer

4.6 Definisi Istilah/Operasional

Definisi operasional dari penelitian ini adalah:

- a. Pemaparan asap mesin berbahan bakar bensin menggunakan alat bermesin diesel yang dapat menyalurkan asap hasil pembakaran ke dalam kotak yang diisi tikus-tikus kelompok perlakuan.
- b. Ekstrak kacang tunggak diperoleh dari kacang tunggak yang diekstraksi menggunakan maserasi, hasilnya kemudian diuapkan pada pelarutnya (methanol) menggunakan penangan air dan dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 100°C.
- c. Kadar SOD diukur dari serum tikus menggunakan spektrofotometri pada setiap kelompok perlakuan.

4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

4.7.1 Prosedur Ekstraksi Kacang Tunggak

Untuk mendapatkan kandungan zat aktif genistein dalam kacang tunggak diperlukan suatu proses pengekraksian. Ekstraksi ini dilakukan dengan metode Maserasi. Adapun cara pembuatannya adalah :

1. Proses pengeringan
 - a. Cuci bersih bahan alam (sample basah) yang akan dikeringkan
 - b. Potong kecil-kecil
 - c. Lalu masukkan oven dengan suhu 40-60°C atau dengan panas matahari hingga kering (bebas kandungan air)
2. Proses ekstraksi
 - a. Setelah kering, haluskan dengan blender sampai halus
 - b. Timbang sebanyak 100 gram (sample kering)
 - c. Masukkan 100 gram sample kering ke dalam gelas erlenmeyer ukuran \pm 1 L
 - d. Kemudian rendam dengan metanol sampai volume 900 mL
 - e. Kocok sampai benar-benar tercampur (\pm 30 menit)
 - f. Diamkan 1 malam sampai mengendap
 - g. Ambil lapisan atas campuran metanol (pelarut) dengan zat aktif yang sudah tercampur (bisa dengan cara penyaringan menggunakan kertas saring)
 - h. Lakukan proses perendaman ini sampai 3 kali
3. Proses evaporasi
 - a. Masukkan dalam labu evaporasi 1 L
 - b. Pasang labu evaporasi pada evaporator

- c. Isi water bath dengan air sampai penuh
- d. Pasang semua rangkaian alat termasuk rotary evaporator, pemanas water bath (atur sampai 90°C atau sesuai dengan Titik Didih pelarut), sambungkan dengan aliran listrik
- e. Biarkan larutan metanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu evaporasi
- f. Tunggu sampai aliran metanol berhenti menetes pada labu penampung ($\pm 1,5$ sampai 2 jam untuk 1 labu) ± 900 mL
- g. Hasil yang diperoleh kira-kira $\frac{1}{4}$ dari bahan alam kering
- h. Masukkan hasil ekstraksi ke dalam botol plastik/kaca
- i. Kemudian simpan dalam freezer

4.7.2 Penentuan Dosis Ekstrak Kacang Tunggak

Penghitungan didasarkan pada kandungan genistein dalam ekstrak kacang tunggak yaitu:

$$= 140.7 \text{ ppm}$$

$$= 140.7 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$= 140.7 \text{ mg/1000 ml}$$

Dosis efektif genistein dalam ekstrak kacang tunggak berdasarkan penelitian tentang efek antioksidan ekstrak kacang tunggak pada tikus yang diovarektomi adalah 0.5 mg/kgBB.

4.7.3 Proses Perlakuan pada Tikus Percobaan

1. Semua tikus dilihat umur dan ditimbang berat badannya. Dilakukan randomisasi dengan metode RAL agar setiap tikus mempunyai peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan.

2. Tikus *Rattus norvegicus* galur wistar dibagi menjadi 9 kelompok, 3 kelompok kontrol dan 6 kelompok perlakuan. Masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. Pembagian kelompok dilakukan secara acak (*simple random sampling*). Pembagian kelompok adalah sebagai berikut :

a. Kelompok kontrol negatif (N)

Sampel dengan kondisi tanpa paparan asap mesin berbahan bakar bensin, tanpa pemberian oksigen, dan tanpa pemberian ekstrak kacang tunggak.

b. Kelompok N + O₄

Sampel dengan kondisi tanpa paparan asap mesin berbahan bakar bensin, diberikan oksigen 4 menit perhari.

c. Kelompok N + G

Sampel dengan kondisi tanpa paparan asap mesin berbahan bakar bensin, diberikan ekstrak kacang tunggak perhari

d. Kelompok A₂O₄(-)G

Sampel dengan paparan asap mesin berbahan bakar bensin selama dua menit dan oksigen empat menit perhari selama 4 minggu tanpa ekstrak kacang tunggak.

e. Kelompok A₂O₄(+)G

Sampel dengan paparan asap mesin berbahan bakar bensin selama dua menit dan oksigen empat menit perhari selama 4 minggu dan diberi ekstrak kacang tunggak.

f. Kelompok A₃O₄(-)G

Sampel dengan paparan asap mesin berbahan bakar bensin selama tiga menit dan oksigen empat menit perhari selama 4 minggu tanpa ekstrak kacang tunggak.

g. Kelompok $A_3O_4(+)$ G

Sampel dengan paparan asap mesin berbahan bakar bensin selama tiga menit dan oksigen empat menit perhari selama 4 minggu dan diberi ekstrak kacang tunggak.

h. Kelompok $A_4O_4(-)$ G

Sampel dengan paparan asap mesin berbahan bakar bensin selama empat menit dan oksigen empat menit perhari selama 4 minggu tanpa ekstrak kacang tunggak.

i. Kelompok $A_4O_4(+)$ G

Sampel dengan paparan asap mesin berbahan bakar bensin selama empat menit dan oksigen empat menit perhari selama 4 minggu dan diberi ekstrak kacang tunggak.

3. Persiapan hewan uji

- Tikus ditempatkan dalam kandang terpisah (1 ekor per kandang).
- Sebelum perlakuan, semua kelompok tikus percobaan diadaptasikan pada kondisi laboratorium tempat percobaan, kandang, waktu makan dan eksplorasi terhadap pakan tikus selama 7 hari. Tiap tikus diberikan pakan standar yang terdiri dari 66% PARS dan 33% terigu sejumlah 40 gram secara ad libitum.

4. .Pemberian ekstrak kacang tunggak tikus

Bahan:

- Ekstrak kacang tunggak

Alat:

- Sonde

Cara kerja:

Pemberian ekstrak kacang tunggak pada kelompok tikus 30 menit sebelum perlakuan melalui alat sonde sesuai dengan dosis yang sudah ditentukan secara per oral. Sonde dipasang pada ujung spuit kemudian dimasukkan ke dalam mulut tikus Wistar sehingga mencapai esophagus bahkan sampai lambung.

5. Pemaparan asap menggunakan bantuan alat pump diesel :

Cara pemaparan:

- a. Tikus ditimbang berat badannya dengan neraca Ohaus setiap kali sebelum pemaparan.
- b. Tempat pemaparan dibersihkan dari kotoran dan asap.
- c. Peralatan yang akan digunakan untuk pemaparan diperiksa terlebih dahulu dan dipastikan dapat berfungsi dengan baik.
- d. Kelompok kontrol
 1. Tikus kelompok kontrol N + O₄ dimasukkan ke dalam kotak tikus, kemudian kotak dialiri oksigen 10 mmHg melalui selang.
 2. Tikus kelompok kontrol N + G diberikan ekstrak kacang tunggak 2ml/hari.
- e. Untuk kelompok perlakuan A₂O₄(+)G, A₃O₄(+)G, A₄O₄(+)G sebelum dilakukan pemaparan, tikus diberikan ekstrak kacang tunggak 30 menit sebelumnya. Selanjutnya dua ekor tikus (satu kelompok perlakuan) dimasukkan ke dalam kotak dan segera ditutup. Dalam

penelitian ini, satu kelompok perlakuan dibagi menjadi 2 tahap pemaparan, masing-masing 2 ekor tikus.

- f. Pemaparan asap kendaraan dilakukan dengan cara menyalakan mesin diesel dan kran penyalur asap dan O_2 sesuai dengan waktu yang telah ditentukan untuk masing-masing kelompok perlakuan (hingga maksimal 4 menit) bertujuan untuk menciptakan kondisi terpapar polusi asap yang sebenarnya.
- g. Setelah itu mesin dan kran penyalur dimatikan, lalu tutup kotak dibuka dan tikus dipindahkan ke kandang semula.
- h. Setiap pemaparan asap kendaraan berikutnya, kotak selalu dibersihkan lebih dahulu dari sisa asap kendaraan sebelumnya.

4.7.4 Pengukuran Kadar Superoksida Dismutase (SOD) dengan Metode Spektrofometri

Prinsip pemeriksaan kadar SOD adalah sebagai berikut. Reaksi antara *xanthine* dan *xanthine oxidase* menghasilkan radikal superoksida. Radikal superoksida akan mereduksi NBT (*nitroblue tetrazolium*) menjadi formazan berwarna ungu. SOD dapat menghambat reduksi NBT melalui reaksinya dengan radikal superoksida yang menghasilkan O_2 dan H_2O . Pengukuran dilakukan dengan metode kolorimetri menggunakan spektrofotometer. Pengukuran kadar SOD dilakukan secara tidak langsung, karena yang diukur dengan spektrofotometer adalah absorbansi formazan. Kemudian ditentukan konsentrasi SOD dengan menggunakan kurva standar SOD.

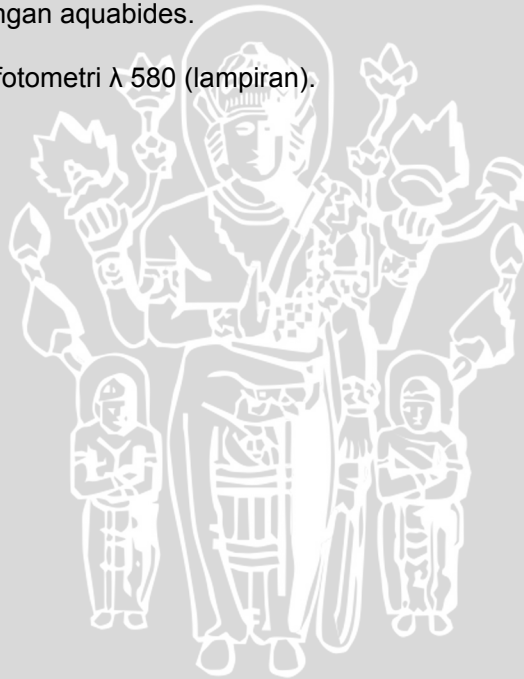
Langkah-langkah pengukuran kadar SOD serum tikus secara terperinci ialah sebagai berikut

Komposisi :

- Serum tikus 200 μ L
- EDTA 100 mM 200 μ L + 500 μ L Buffer Vortex
- NBT 25 unit 100 μ L
- Xanthine 25 unit 100 μ L
- XO 1 unit 100 μ L

+ PIIS menjadi 1 mL

1. Diinkubasi pada suhu 37^o C kemudian di sentrifuge selama 30 menit lalu saring apabila ada koloid.
2. Dijadikan 3 cc dengan aquabides.
3. Dibaca di spektrofotometri λ 580 (lampiran).

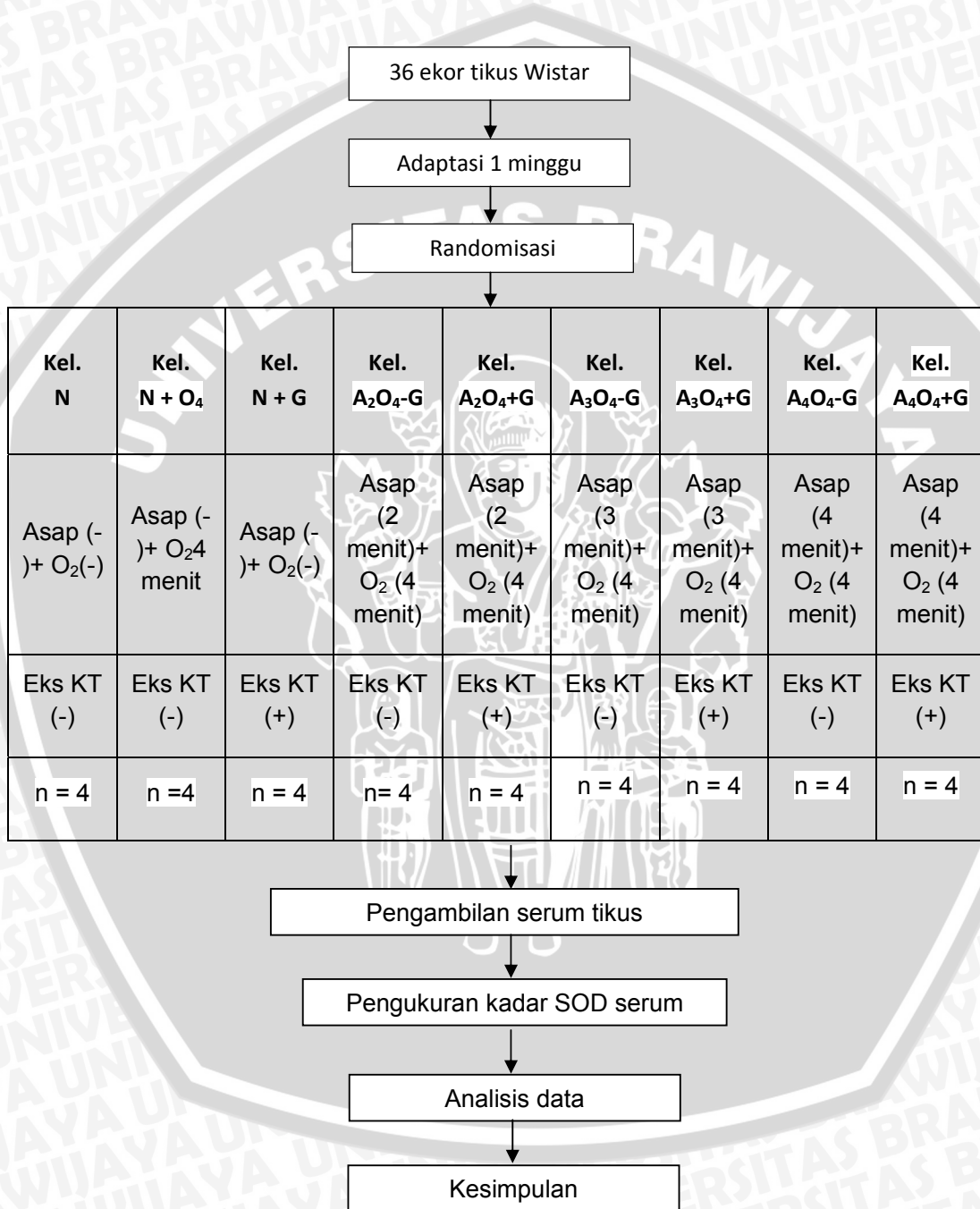


4.8 Pengolahan dan Analisis Data

Data hasil perhitungan kadar SOD serum masing-masing kelompok yang dilihat rata-ratanya disajikan dalam bentuk tabel dan grafik kemudian dianalisis secara deskriptif. Data kadar SOD serum yang telah dikumpulkan, diolah dengan cara tabulasi. Berdasarkan tabulasi tersebut, dilakukan uji statistic (dengan menggunakan bantuan *software* SPSS 16.0) sebagai berikut (Dahlan, 2011):

- Menilai distribusi normalitas data secara analitis dengan uji *Kolmogorov-Smirnov* atau *Shapiro-Wilk*. Uji *Kolmogorov-Smirnov* digunakan untuk sampel yang besar (lebih dari 50) sedangkan *Shapiro-Wilk* untuk sampel yang sedikit (kurang atau sama dengan dari 50).
- Uji homogenitas untuk menilai atau menguji apakah data yang diperoleh dari setiap kelompok memiliki varian homogen. Jika varians data sama, maka hasil dapat dilanjutkan dengan uji *One Way Anova*. Karena syarat untuk kelompok tidak berpasangan adalah varians data harus sama ($p > 0,05$).
- Uji *One Way ANOVA* digunakan untuk mengetahui perbandingan antara masing – masing kelompok.
- Uji *Post Hoc* digunakan untuk menilai apakah ada perbedaan bermakna pada kelompok dari hasil tes *ANOVA*.

4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Skema Alur Penelitian

Keterangan:
Eks KT: Ekstrak kacang tunggak 2mL/hari

BAB V

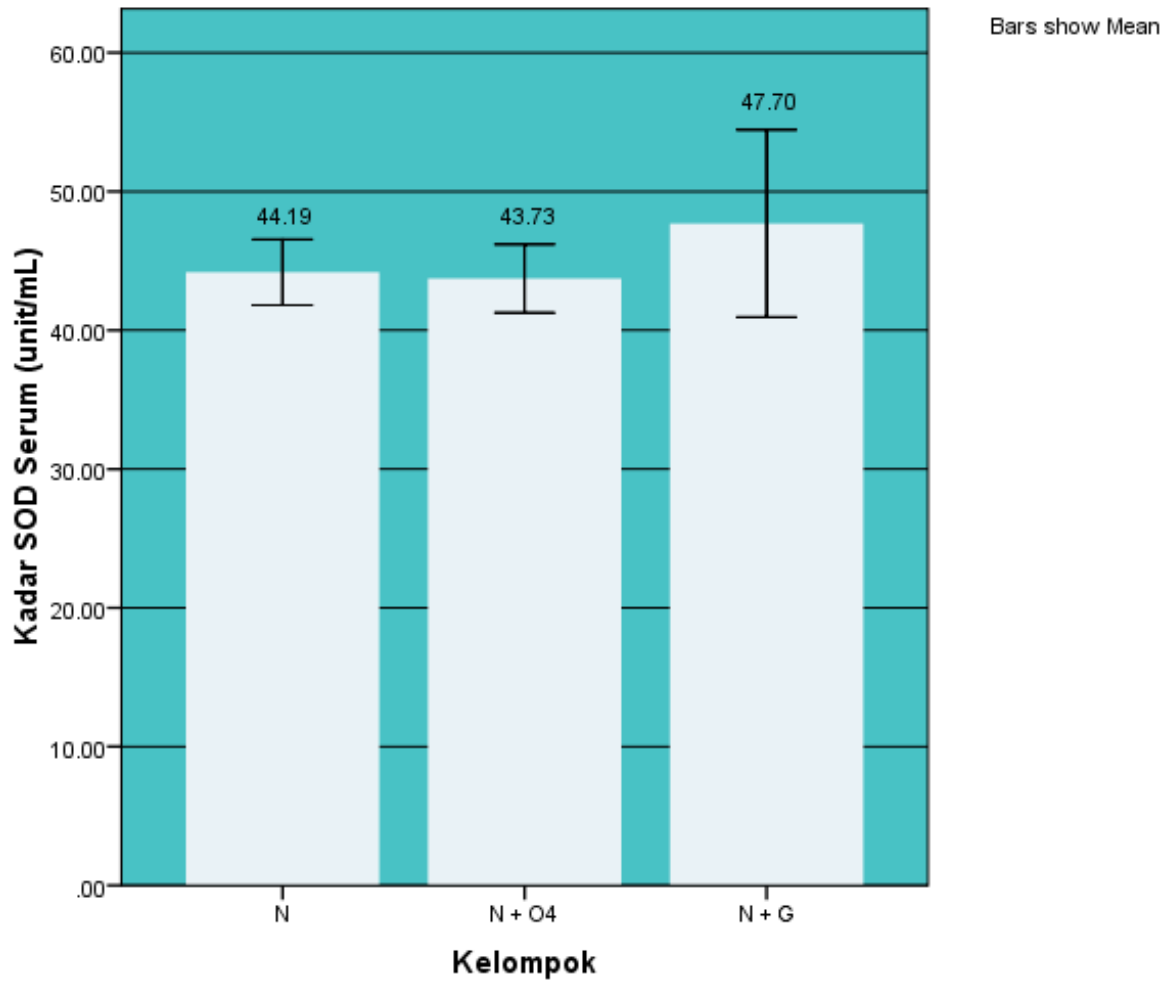
HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

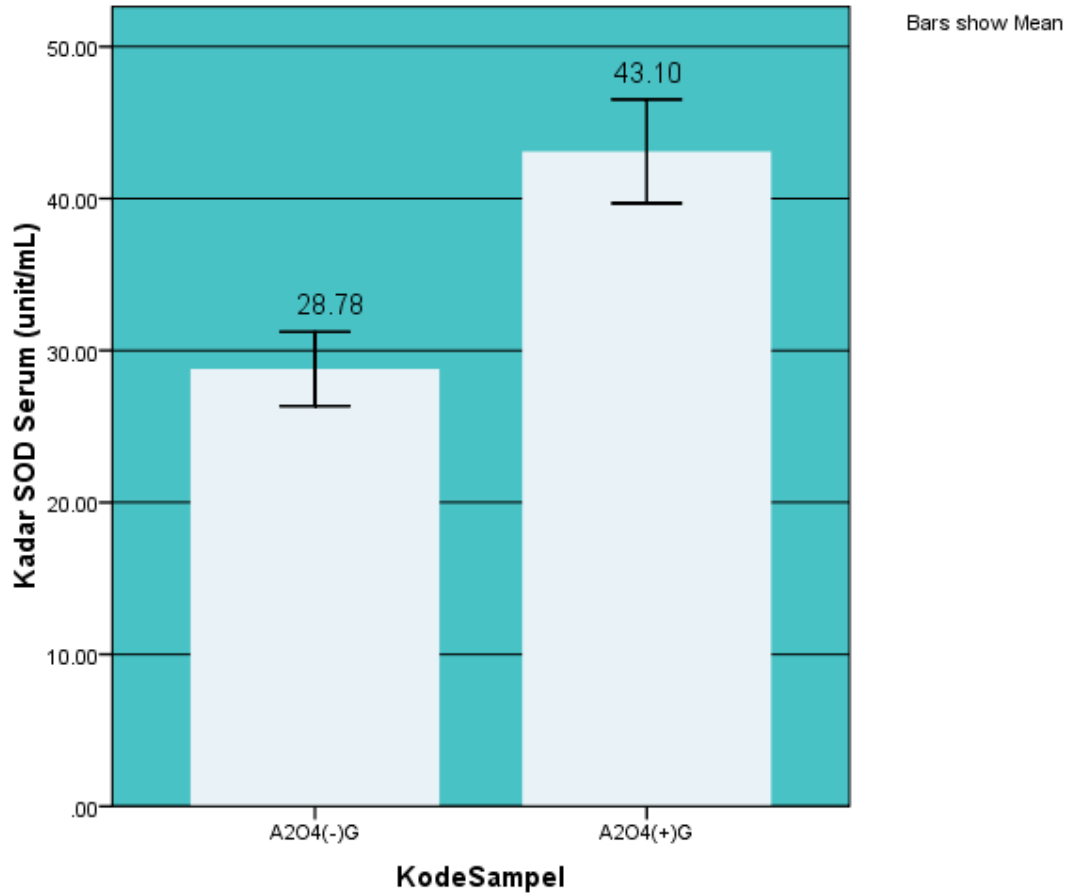
Setelah hewan coba diberi perlakuan selama tiga puluh hari, dilakukan pembedahan dan pengambilan darah hewan coba melalui jantung. Dari sampel darah tersebut dilakukan pengukuran kadar SOD dengan menggunakan spektrofotometer. Hasil penghitungan kadar SOD serum ditampilkan pada lampiran, sedangkan rerata kadar SOD serum ditampilkan dalam tabel 5.1 dan grafik 5.1 dan 5.2. Rerata kadar SOD serum didapatkan dengan cara menjumlahkan kadar SOD serum pada masing-masing kelompok perlakuan lalu dibagi dengan jumlah sampel pada kelompok tersebut.

Tabel 5.1 Rerata Kadar SOD Serum

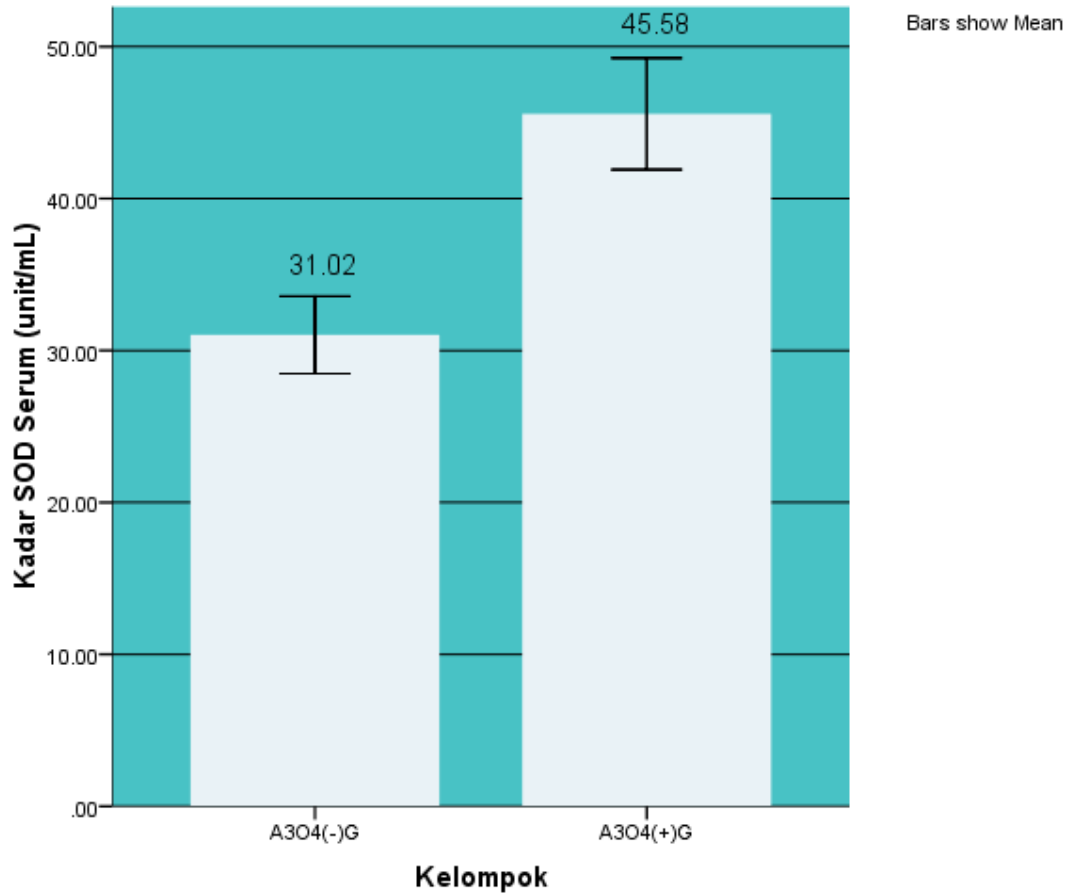
Kelompok Perlakuan	Keterangan	Rerata
N	Tanpa asap, oksigen dan ekstrak	44.19 ± 4.74
N + O ₄	Diberi oksigen selama 4 menit	43.73 ± 4.94
N + G	Diberi ekstrak kacang tunggak	47.70 ± 13.49
A ₂ O ₄ (-)G	Diberi asap 2 menit + oksigen 4 menit tanpa ekstrak kacang tunggak	28.78 ± 4.89
A ₂ O ₄ (+)G	Diberi asap 2 menit + oksigen 4 menit dengan ekstrak kacang tunggak	43.10 ± 6.82
A ₃ O ₄ (-)G	Diberi asap 3 menit + oksigen 4 menit tanpa ekstrak kacang tunggak	31.02 ± 5.10
A ₃ O ₄ (+)G	Diberi asap 3 menit + oksigen 4 menit dengan ekstrak kacang tunggak	45.58 ± 7.35
A ₄ O ₄ (-)G	Diberi asap 4 menit + oksigen 4 menit tanpa ekstrak kacang tunggak	31.33 ± 10.77
A ₄ O ₄ (+)G	Diberi asap 4 menit + oksigen 4 menit dengan ekstrak kacang tunggak	43.53 ± 11.30



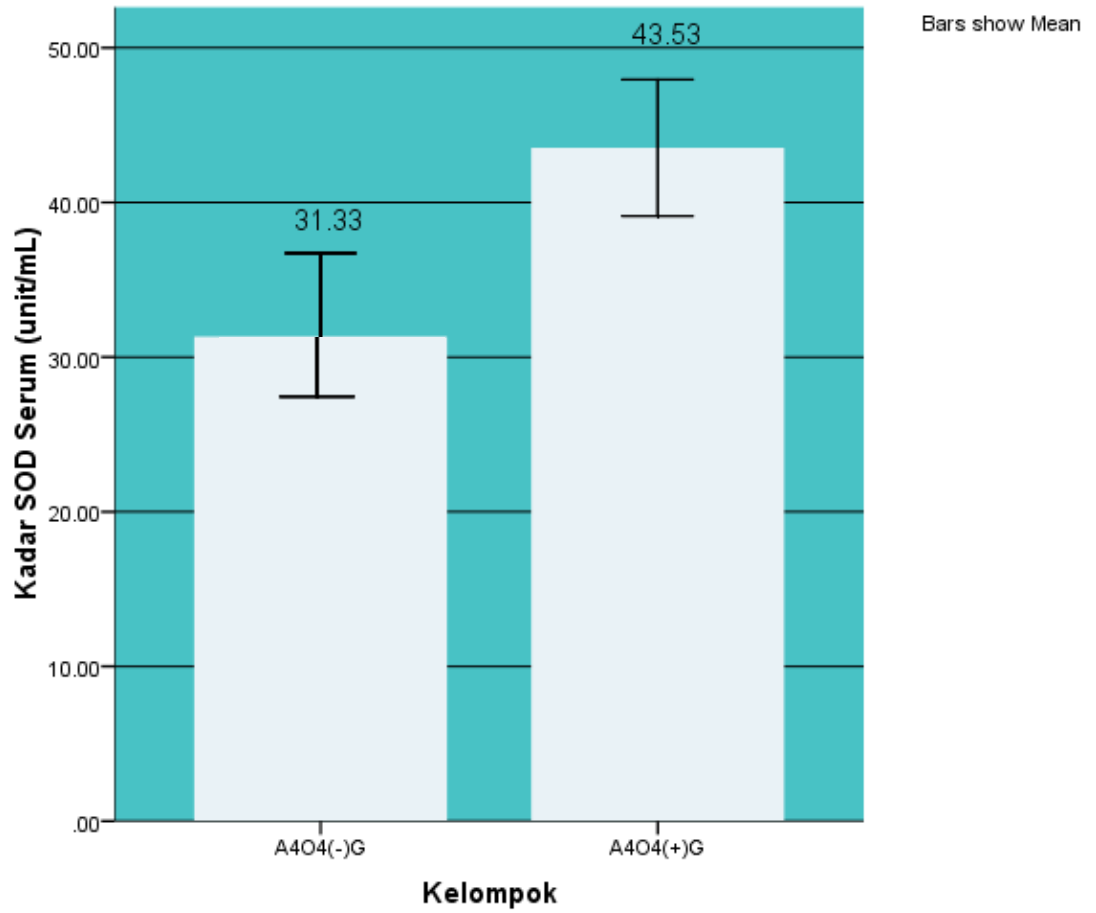
Gambar 5.1 Diagram Rerata Kadar SOD Serum Kelompok Tanpa Paparan Asap (n = 4). Kelompok N tidak memiliki perbedaan signifikan dengan kelompok N + O4 ($p = 0.936$) dan kelompok N + G ($p = 0.539$)



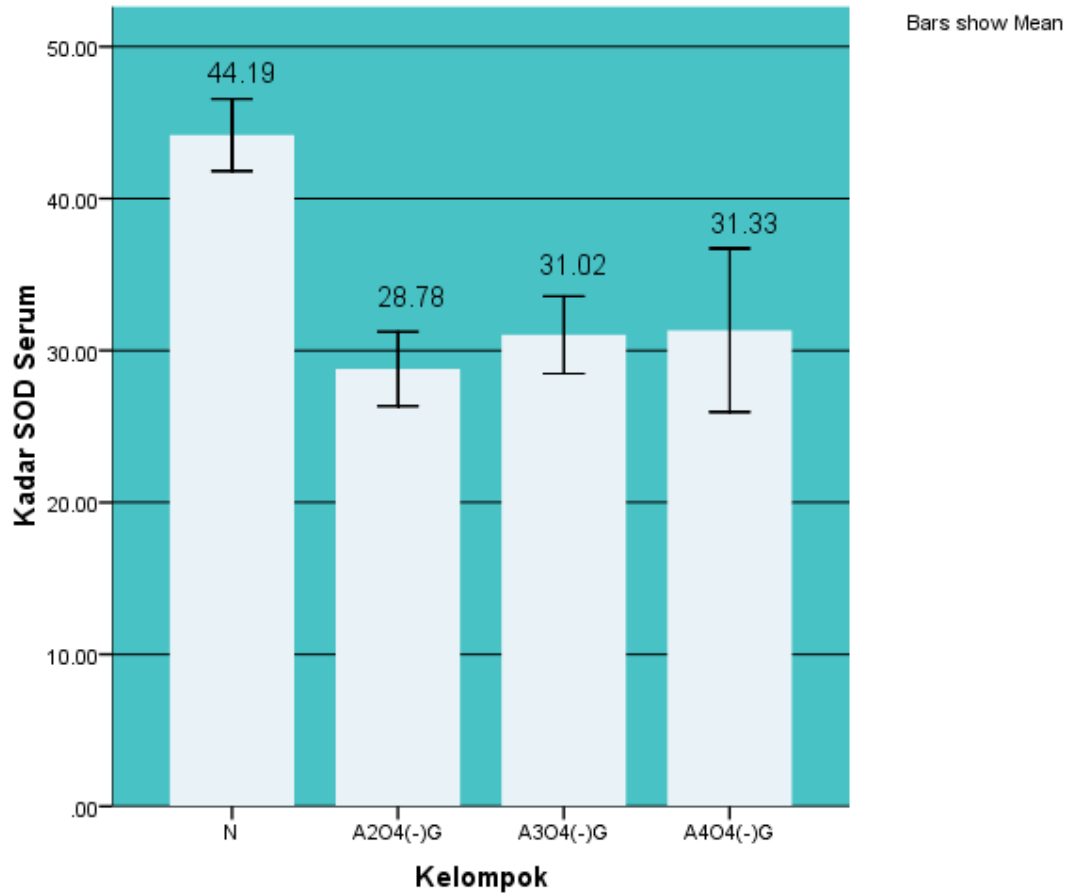
Gambar 5.2 Diagram Rerata Kadar SOD Serum Kelompok Paparan Asap 2 menit Tanpa Ekstrak Kacang Tunggak dan Dengan Ekstrak Kacang Tunggak (n = 4)
Kelompok A204(-)G memiliki perbedaan signifikan dengan kelompok A204(+)G (p = 0.017)



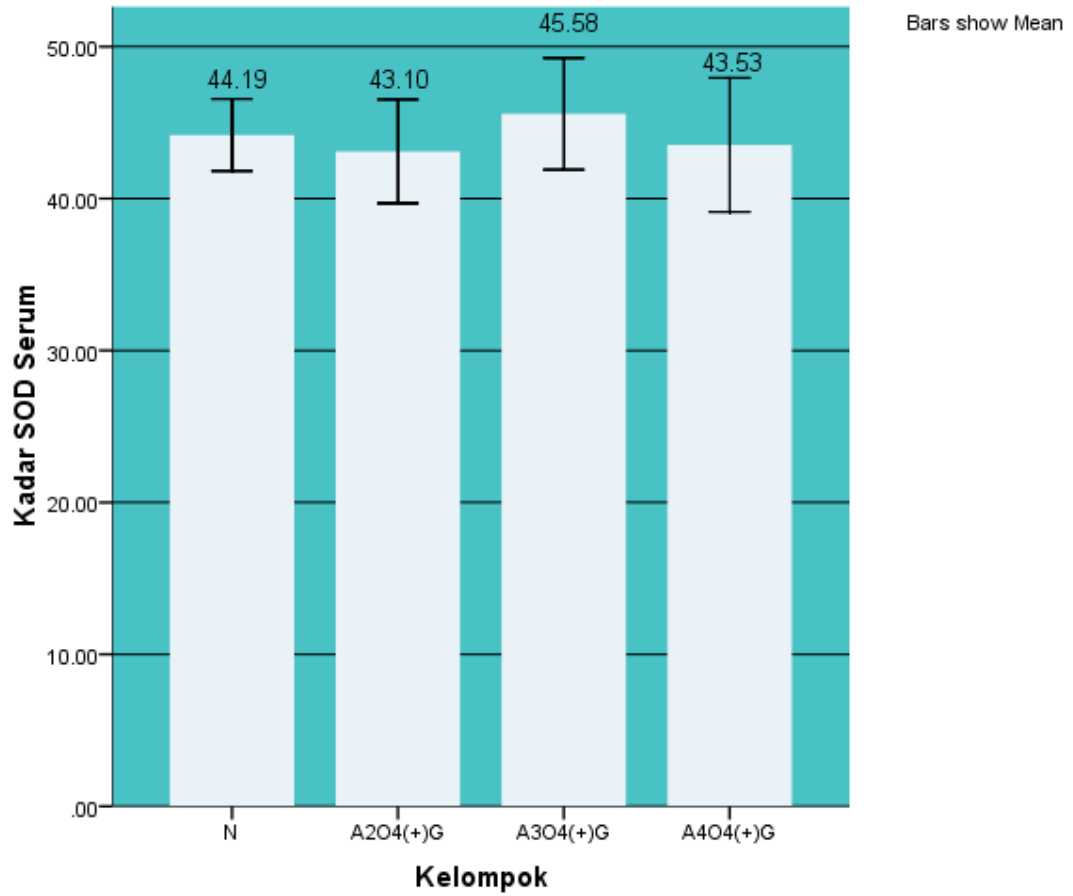
Gambar 5.3 Diagram Rerata Kadar SOD Serum Kelompok Paparan Asap 3 menit Tanpa Ekstrak Kacang Tunggak dan Dengan Ekstrak Kacang Tunggak (n = 4). Kelompok A3O4(-)G memiliki perbedaan signifikan dengan dan kelompok A3O4(+G) (p = 0.016)



Gambar 5.4 Diagram Rerata Kadar SOD Serum Kelompok Paparan Asap 4 menit Tanpa Ekstrak Kacang Tunggak dan Dengan Ekstrak Kacang Tunggak (n = 4). Kelompok A404(-)G memiliki perbedaan signifikan dengan kelompok A404(+G) (p = 0.04)



Gambar 5.5 Diagram Rerata kadar SOD serum Kelompok Kontrol Negatif dan Kelompok Paparan Asap Tanpa Ekstrak Kacang Tunggak (n = 4). Kelompok N memiliki perbedaan signifikan dengan kelompok A2O4(-)G, A3O4(-)G, dan A4O4(-)G) (p = 0.011; p = 0.027; p = 0.031)



Gambar 5.6 Diagram Rerata kadar SOD serum Kelompok Kontrol Negatif dan Kelompok Paparan Asap Dengan Ekstrak Kacang Tunggak (n = 4).

Kelompok N tidak memiliki perbedaan signifikan dengan kelompok A2O4(+G), A3O4(+G), dan A4O4(+G) ($p = 0.849$; $p = 0.808$; $p = 0.908$)

5.2 Analisis Data

Proses analisis data penelitian ini dilakukan dengan menggunakan program *SPSS 16.0 for Windows*. Variabel penelitian merupakan skala numerik dengan sampel tidak berpasangan dan terdiri atas lebih dari 2 kelompok. Bila data memiliki distribusi normal dan varians homogen, analisis dapat dilanjutkan dengan uji komparatif parametrik *One Way Anova*.

Pada uji normalitas Saphiro-Wilk didapatkan nilai $p = 0,618$ ($p > 0,05$) yang menunjukkan bahwa distribusi data normal. Setelah itu, dilakukan uji homogenitas dan didapatkan $p = 0.517$ ($p > 0.05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa varian data sama.

Setelah uji normalitas dan homogenitas, dilakukan uji *One Way ANOVA* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan kadar SOD yang bermakna antar kelompok perlakuan. Dari uji *One Way ANOVA* didapatkan nilai $p = 0,009$ ($p < 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada paling tidak 2 kelompok perlakuan. Analisis dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* menggunakan uji *Least Significant Difference (LSD)* untuk mengetahui letak perbedaan. Hasil uji LSD ditampilkan pada tabel 5.2

Tabel 5.2 Hasil Uji LSD Terhadap Kadar SOD Serum

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
P1	-	0.936**	0.539**	0.011*	0.849**	0.027*	0.808**	0.031*	0.908**
P2	0.936**	-	0.488**	0.013*	0.912**	0.033*	0.746**	0.037*	0.972**
P3	0.539**	0.488**	-	0.002*	0.423**	0.006*	0.710**	0.007*	0.467**
P4	0.011*	0.013*	0.002*	-	0.017*	0.694**	0.006*	0.655**	0.014*
P5	0.849**	0.912**	0.423**	0.017*	-	0.042*	0.665**	0.047*	0.940**
P6	0.027*	0.033*	0.006*	0.694**	0.042*	-	0.016*	0.957**	0.035*
P7	0.808**	0.746**	0.710**	0.006*	0.665**	0.016*	-	0.018*	0.720**
P8	0.031*	0.037*	0.007*	0.655**	0.047*	0.957**	0.018*	-	0.040*
P9	0.908**	0.972**	0.467**	0.014*	0.940**	0.035*	0.720**	0.040*	-

Keterangan:

* terdapat perbedaan yang bermakna

** tidak terdapat perbedaan yang bermakna

P1= N, P2= N + O₄, P3= N + G, P4= A₂O₄(-)G, P5= A₂O₄(+)G, P6= A₃O₄(-)G, P7= A₃O₄(+)G, P8= A₄O₄(-)G, P9= A₄O₄(+)G

Dari hasil uji analisis statistik dapat disimpulkan bahwa:

- Pada kelompok kontrol negatif (N) tidak terdapat perbedaan kadar SOD serum yang signifikan dibandingkan dengan kelompok N + O₄ dan kelompok N + G (p = 0.936; p = 0.539)
- Pada kelompok kontrol negatif (N) terdapat perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan kelompok A₂O₄(-)G (p=0.011), kelompok A₃O₄(-)G (p = 0.027), dan kelompok A₄O₄(-)G (p = 0.031)
- Pada kelompok A₂O₄(+)G yang dipapar asap dua menit, oksigen empat menit, dan diberi ekstrak kacang tunggak 2mL/hari, terdapat peningkatan kadar SOD serum yang signifikan dibandingkan dengan kelompok A₂O₄(-)G (p = 0.017)

- Pada kelompok $A_3O_4(+)$ G yang dipapar asap tiga menit, oksigen empat menit, dan diberi ekstrak kacang tunggak 2mL/hari, terdapat peningkatan kadar SOD serum yang signifikan dibandingkan dengan kelompok $A_3O_4(-)$ G ($p = 0.016$)
- Pada kelompok $A_4O_4(+)$ G yang dipapar asap empat menit, oksigen empat menit, dan diberi ekstrak kacang tunggak 2mL/hari, terdapat peningkatan kadar SOD serum yang signifikan dibandingkan dengan kelompok $A_4O_4(-)$ G ($p = 0.040$)
- Pada kelompok $A_2O_4(-)$ G tidak dijumpai perbedaan kadar SOD serum yang bermakna dibandingkan dengan kelompok $A_3O_4(-)$ G dan $A_4O_4(-)$ G ($p=0.694$; $p = 0.655$)



BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh (genistein) ekstrak kacang tunggak (*Vigna Unguiculata*) terhadap kadar SOD serum hewan coba yang dipapar asap mesin berbahan bakar bensin. Hewan coba yang digunakan adalah 36 ekor tikus Wistar jantan yang dibagi dalam 9 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok yang dipapar O₂ empat menit, kelompok yang diberi ekstrak genistein, tiga kelompok yang dipapar O₂ empat menit tanpa ekstrak kacang tunggak dengan masing-masing kelompok dipapar asap dengan waktu yang berbeda, yaitu dua menit, tiga menit, dan empat menit, serta tiga kelompok yang dipapar O₂ empat menit dan diberi ekstrak kacang tunggak 2 mL/hari dengan masing-masing kelompok dipapar asap selama dua, tiga, dan empat menit.

6.1 Pengaruh paparan asap terhadap kadar SOD serum

Hasil penghitungan kadar SOD serum menunjukkan bahwa rerata kadar SOD serum kelompok kontrol negatif (44.19 ± 4.74) lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok A₂O₄(-)G (28.78 ± 4.89) yang dipapar asap dua menit tanpa ekstrak kacang tunggak, kelompok A₃O₄(-)G (31.02 ± 5.10) yang dipapar asap tiga menit tanpa ekstrak kacang tunggak, dan kelompok A₄O₄(-)G (31.33 ± 10.7) Dari analisis statistik *Post Hoc* LSD didapatkan nilai signifikansi sebesar $p = 0.011$, $p = 0.027$, $p = 0.031$ antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok yang dipapar asap dengan variasi waktu yang berbeda.

Pembakaran yang tidak sempurna dari mesin diesel menghasilkan bermacam-macam gas dan partikel yang padat maupun cair. Dibandingkan dengan mesin berbahan bakar bensin, mesin diesel menghasilkan lebih sedikit karbon monoksida, tetapi menghasilkan jauh lebih banyak nitrogen oksida, aldehida, dan yang paling penting partikel jelaga submikron yang dapat merugikan kesehatan (Sydbom *et al.*, 2001). Partikel dalam asap kendaraan atau yang disebut sebagai DEP (*Diesel Exhaust Particulate*) terdiri dari *Fine* dan *Ultrafine*, yaitu fraksi *particulate matter* (PM) dengan diameter <2.5 and $<0.1\mu\text{m}$. DEP yang terinhalasi akan masuk dan terdeposit dengan mudah di saluran nafas dimana partikel-partikel yang berukuran sangat kecil ini memicu reaksi inflamasi dari sel target, yaitu makrofag, sel endothel, sel epitel, dan sitokin proinflamasi lain. Telah diketahui bahwa DEP mengandung metal transisi dan komponen organik siklus redoks pada permukaan partikel yang merupakan pemicu produksi ROS pada sel di berbagai tempat (Araujo *et al.*, 2008).

6.2 Pengaruh lama paparan terhadap kadar SOD serum

Dari hasil analisis statistik *Post Hoc LSD* didapatkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok $\text{A}_2\text{O}_4(-)\text{G}$ dengan kelompok $\text{A}_3\text{O}_4(-)\text{G}$ ($p = 0.694$) dan $\text{A}_4\text{O}_4(-)\text{G}$ ($p = 0.655$). Dapat disimpulkan bahwa perbedaan lama paparan tidak berpengaruh terhadap kadar SOD serum tikus. Hal ini mungkin dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain perbedaan durasi pengasapan yang tidak terlalu jauh. Terdapat peningkatan rerata kadar SOD serum pada kelompok yang dipapar asap tanpa ekstrak kacang tunggak. Rerata kadar SOD serum kelompok $\text{A}_2\text{O}_4(-)\text{G}$ (28.78 ± 4.89) lebih rendah dibandingkan dengan kelompok $\text{A}_3\text{O}_4(-)$ (31.02 ± 5.10) dan kelompok $\text{A}_4\text{O}_4(-)\text{G}$ (31.33 ± 10.7).

Semakin lama pemaparan asap, kadar SOD serum semakin meningkat. Diduga paparan asap mesin berbahan bakar bensin menyebabkan peningkatan radikal superoksida dalam serum, namun belum sampai pada taraf stress oksidatif. Berdasarkan hipotesis tingkatan stress oksidatif, tingkatan stress oksidatif paling bawah dikaitkan dengan induksi antioksidan dan enzim pendetoksifikasi. (Nel, 2006).

6.3 Pengaruh ekstrak kacang tunggak terhadap kadar SOD serum

Rerata kadar SOD serum pada kelompok yang dipapar asap dua menit tanpa ekstrak kacang tunggak $A_2O_4(-)G$ (28.78 ± 4.89) lebih rendah dibandingkan dengan kelompok yang dipapar asap dua menit disertai ekstrak kacang tunggak $A_2O_4(+)G$ (43.10 ± 6.82). Berdasarkan hasil analisis statistik *Post Hoc LSD*, terdapat perbedaan signifikan antara kelompok $A_2O_4(-)G$ dengan kelompok $A_2O_4(+)G$ ($p = 0.017$).

Rerata kadar SOD serum kelompok yang dipapar asap tiga menit tanpa ekstrak kacang tunggak $A_3O_4(-)G$ (31.02 ± 5.10) lebih rendah dibandingkan dengan kelompok yang dipapar asap tiga menit disertai ekstrak kacang tunggak $A_3O_4(+)G$ (45.58 ± 7.35). Berdasarkan hasil analisis statistik *Post Hoc LSD*, terdapat perbedaan signifikan antara kelompok $A_3O_4(-)G$ dengan kelompok $A_3O_4(+)G$ ($p = 0.016$).

Rerata kadar SOD serum kelompok yang dipapar asap empat menit tanpa ekstrak kacang tunggak $A_4O_4(-)G$ (31.33 ± 10.77) lebih rendah dibandingkan dengan kelompok yang dipapar asap disertai ekstrak kacang tunggak $A_4O_4(+)G$ (43.53 ± 11.30). Berdasarkan hasil analisis statistik *Post Hoc LSD*, terdapat

perbedaan signifikan antara kelompok A₄O₄(-)G dengan kelompok A₄O₄(+)G (p = 0.040).

Hasil penghitungan rerata kadar SOD serum menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan (p > 0.05) antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok yang dipapar asap disertai dengan ekstrak kacang tunggak dengan durasi pengasapan masing-masing kelompok selama dua menit (p = 0.849), tiga menit (p = 0.808), dan empat menit (p = 0.908). Dapat diartikan bahwa rerata kadar SOD serum pada kelompok yang dipapar asap disertai dengan ekstrak kacang tunggak mendekati rerata kadar SOD serum kelompok kontrol negatif.

Genistein merupakan suatu derivat isoflavon yang memiliki efek antioksidan penting antara lain mempengaruhi ekspresi gen. Genistein yang banyak terkandung dalam diet protein kedelai memiliki banyak manfaat kardioprotektif, diantaranya dapat menurunkan kolesterol LDL, inhibisi sitokin proinflamatori, menginduksi protein untuk adhesi sel, mencegah oksidasi partikel LDL, serta inhibisi agregasi platelet dan memperbaiki reaktivitas vaskular (Rimbach *et al.*, 2008). Mekanisme antioksidan genistein meliputi antara lain, supresi pembentukan ROS dengan cara inhibisi enzim atau mengkelasi *trace element* yang terlibat dalam proses pembentukan radikal bebas, sebagai scavenger ROS, dan up-regulasi enzim antioksidan (Pietta, 2000). Genistein juga telah diketahui secara signifikan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan seperti SOD, katalase (CAT), dan glutathione peroxidase (GPx).

Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) meningkatkan kadar SOD serum pada *Rattus norvegicus* strain wistar yang dipapar asap kendaraan bermotor. Hal ini didukung

oleh penelitian oleh Mahn *et al* (2005), dimana tikus yang diberi diet rendah protein kedelai terdapat penurunan ekspresi gen antioksidan dan kadar eNOS disertai dengan gangguan reaktivitas vaskular dan peningkatan tekanan darah pada tikus. Selanjutnya tikus diberikan diet kaya protein kedelai dan menunjukkan peningkatan eNOS dan enzim antioksidan dua sampai tiga kali serta perbaikan relaksasi endothel dan penurunan tekanan darah.

Kelemahan dari penelitian ini adalah karena menggunakan ekstrak kacang tunggak, maka tidak menutup kemungkinan terdapat peran dari senyawa selain genistein yaitu quercetin dan myricetin, yang merupakan senyawa flavonoid terbanyak dalam kacang tunggak.



BAB 7

PENUTUP

7.1 KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian mengenai pengaruh ekstrak kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) terhadap kadar Superoksida Dismutase (SOD) serum pada tikus yang dipapar asap mesin berbahan bakar bensin, maka dapat disimpulkan bahwa:

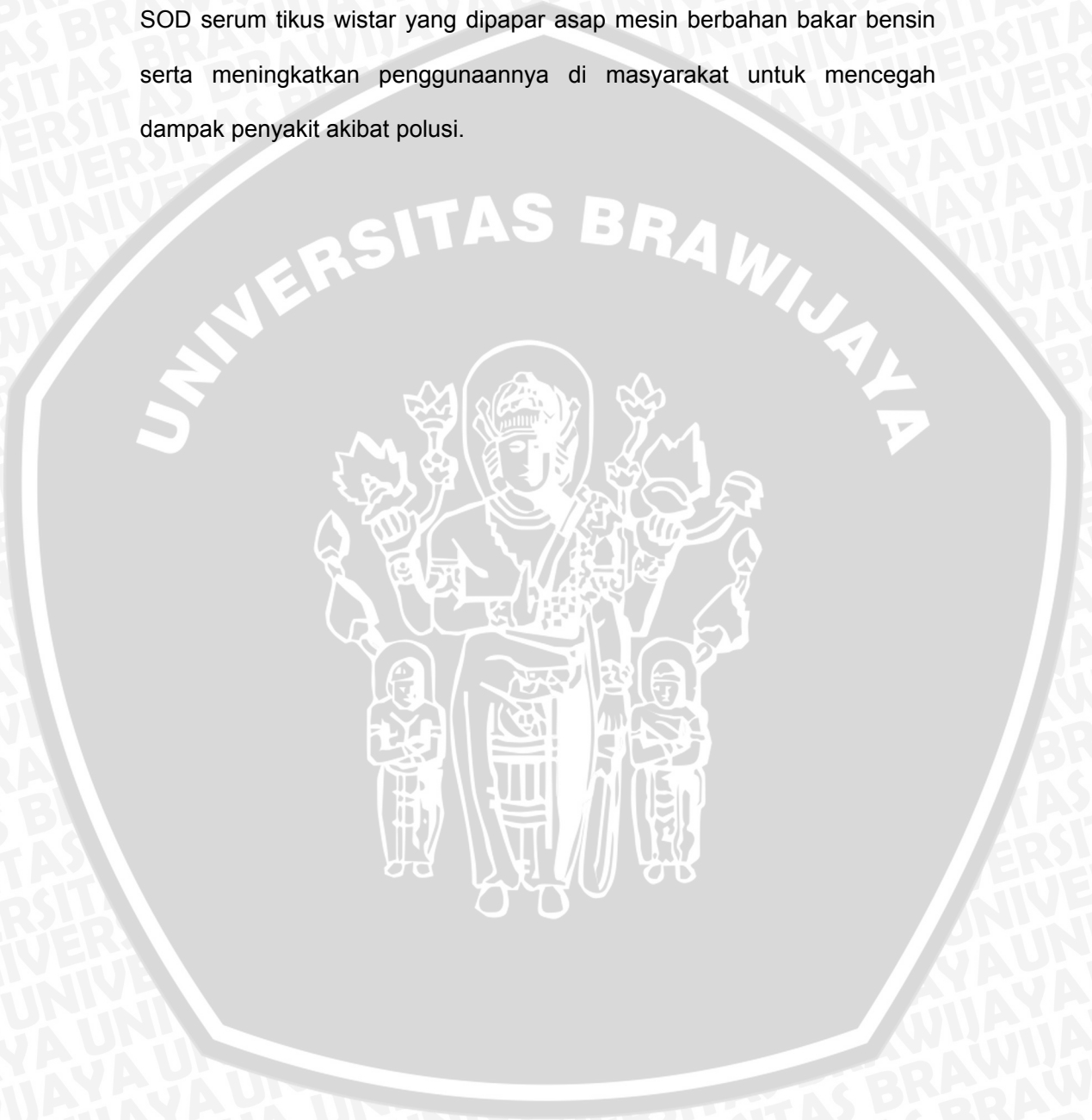
1. Paparan asap mesin berbahan bakar bensin dapat menyebabkan penurunan kadar SOD serum tikus wistar.
2. Perbedaan lama waktu paparan 2 menit, 3 menit, dan 4 menit tidak berpengaruh terhadap penurunan kadar SOD serum tikus wistar.
3. Pemberian ekstrak kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) dapat meningkatkan kadar SOD serum tikus wistar yang dipapar asap mesin berbahan bakar bensin secara signifikan.

7.2 SARAN

Beberapa hal yang perlu dilakukan sebagai tindak lanjut penelitian ini:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan variasi waktu paparan asap dengan perbandingan durasi yang lebih lama disertai dengan modifikasi alat pengasapan dengan pengatur tekanan yang stabil dan variasi model pengasapan agar tikus tahan terpapar dalam waktu yang cukup lama.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme molekular kacang tunggak dalam menghambat penurunan kadar SOD serum tikus wistar yang dipapar asap mesin berbahan bakar bensin.

3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai berbagai jenis ekstrak kacang tunggak yang efektif terhadap penghambatan penurunan kadar SOD serum tikus wistar yang dipapar asap mesin berbahan bakar bensin serta meningkatkan penggunaannya di masyarakat untuk mencegah dampak penyakit akibat polusi.



DAFTAR PUSTAKA

- Araujo, Jesus A., Berenice Barajas, Michael Kleinman, Xuping Wang, Brian J. Bennett, Ke Wei Gong, Mohamad Navab et al. 2008. Ambient particulate pollutants in the ultrafine range promote early atherosclerosis and systemic oxidative stress." *Circulation research* 102, no. 5: 589-596.
- Arianto, Arif. 2011 . Kendaraan Bermotor Di Indonesia Terbanyak Di ASEAN . [Http://Www.Tempo.Co/Read/News/2011/08/19/124352572/Kendaraan-Bermotor-Di-Indonesia-Terbanyak-Di-ASEAN.](http://www.Tempo.Co/Read/News/2011/08/19/124352572/Kendaraan-Bermotor-Di-Indonesia-Terbanyak-Di-ASEAN) Minggu, 15 Januari 2012 pukul 14.41 WIB
- Arief, S. 2007. Radikal Bebas.www.pediatrik.com/buletin/06224113752-x0zu6l.pdf. Diakses tanggal 17 Januari 2012
- Celia Quijano, Daniel Hernandez-Saavedra, Laura Castro, Joe M. McCord, Bruce A. Freeman, and Rafael Radi. 2001. Reaction of Peroxynitrite with Mn-Superoxide Dismutase. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 276, No. 15, Issue of April 13, pp. 11631 11638.
- Chen, Chung Yen, Golde I. Holtzman, and Raga M. Bakhit. 2002. High-genistein isoflavone supplementation modulated erythrocyte antioxidant enzymes and increased running endurance in rats undergoing one session of exhausting exercise—a pilot study. *Pakistan J Nutr* 1: 1-7.
- Cozzi, Emily, Surovi Hazarika, Howard W. Stallings, Wayne E. Cascio, Robert B. Devlin, Robert M. Lust, Christopher J. Wingard, and Michael R. Van Scott. 2006. Ultrafine particulate matter exposure augments ischemia-reperfusion injury in mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 291, no. 2: H894-H903.
- Crapo, J. D. 2003. Oxidative stress as an initiator of cytokine release and cell damage. *European Respiratory Journal* 22, no. 44 suppl: 4s-6s.
- Davies, Kelvin JA. 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB life* 50, no. 4-5: 279-289.
- Fachruddin, Lisdiana. 2007. Budi Daya Kacang-kacangan. Yogyakarta: Kanisius
- Fageria, N. K.,dkk. 2002. Growth and Mineral Nutrition of Field Crops <http://books.google.co.id/books?id=3vFI4EpmC1gC&pg=PA472&dq=feature+%22Vigna+unguiculata%22&lr=#PPA472,M1.2>nd Edition Revised and Expanded

- Fatokun, C. A. 2002. Challenges And Opportunities For Enhancing Sustainable Cowpea Production. Nigeria: International Institute of Tropical Agriculture
- Febrianindya, Flora. 2011. Kacang Tunggak, Si Mungil Yang Kaya Nutrisi . [Http://www.Detikfood.Com/Read/2011/11/16/100618/1768313/482/Kacang-Tunggak-Si-Mungil-Yang-Kaya-Nutrisi](http://www.Detikfood.Com/Read/2011/11/16/100618/1768313/482/Kacang-Tunggak-Si-Mungil-Yang-Kaya-Nutrisi). Kamis, 19/01/2012 19:21 WIB.
- Flora, Swaran JS. 2009. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2, no. 4: 191-206.
- Forman, Henry Jay, and Martine Torres. 2008. Signaling by the respiratory burst in macrophages. *IUBMB life* 51, no. 6: 365-371.
- Fukai, Tohru, and Masuko Ushio-Fukai. 2011. "Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases." *Antioxidants & redox signaling* 15, no. 6: 1583-1606.
- Gutteridge, John, and Barry Halliwell. 2006. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences* 899, no. 1: 136-147.
- Hanafiah, K.A., 2005. Rancangan Percobaan : Teori dan Aplikasi. Ed. Rev. 10. Jakarta: Raja Grafindo Persada.
- Herowati, Rina, Rahmana Emran Kartasasmita, I Ketut Adnyana, Nuraini Harmastuti, Tutus Gusdinar Kartawinata. 2008. Aktivitas Antiinflamasi Kuersetin-3-monoasetat Hasil Asetilasi Selektif Kuersetin. *Artocarpus* Vol. 8 No. 2 September: 60 – 67
- Heistad, Donald D., Yoshinobu Wakisaka, Jordan Miller, Yi Chu, and Ricardo Pena-Silva. 2009. Novel aspects of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society* 73, no. 2: 201.
- Hua Cai and David G. Harrison. 2000. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. *Circulation Research*, 87:840-844
- Hooshmand S., Soung Do Y., Lucas E. A., Madihally S. V., Levenson C. W. 2007. Genistein Reduces The Production Of Proinflammatory Molecules In Human Chondrocytes. *J. Nutr. Biochem.*, 18 : 609-614.

Igor N. Zelko, Thomas J. Mariani, and Rodney J. Folz. 2002. Superoxide Dismutase Multigene Family: A Comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) Gene Structures, Evolution, and Expression. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 33, No. 3, pp. 337–349

Kumalaningsih, Sri. 2006. *Antioksidan Alami*. Surabaya : Trubus Agrisarana

Lu, Hua, Ji-Xin Shi, Dong-Mei Zhang, Hui-Lin Chen, Meng Qi And Hong-Xia Yin. 2009. Genistein, A Soybean Isoflavone, Reduces The Production Of Pro-Inflammatory And Adhesion Molecules Induced By Hemolysate In Brain Microvascular Endothelial Cells. *Acta Neurol. Belg*, 109, 32-37

Mahn, Katharina, Consuelo Borrás, Greg A. Knock, Paul Taylor, Imran Y. Khan, David Sugden, Lucilla Poston et al. 2005. Dietary soy isoflavone induced increases in antioxidant and eNOS gene expression lead to improved endothelial function and reduced blood pressure in vivo. *The FASEB journal* 19, no. 12: 1755-1757.

Mason, Robert J., V. Courtney Broaddus, Thomas Martin, Talmadge King Jr, Dean Schraufnagel, John F. Murray, and Jay A. Nadel. 2010. *Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine E-Book: 2-Volume Set*. Saunders.

Pawiroharsono, Suyanto . 2001. Prospek dan Manfaat Isoflavon untuk Kesehatan. <http://www.tempo.co.id/medika/arsip/042001/pus-2.htm>

Peretz, A., Sullivan, J. H., Leotta, D. F., Trenga, C. A., Sands, F. N., Allen, J., Carlsten, C., Wilkinson, C. W., Gill, E. A., and Kaufman, J. D. 2008. Diesel exhaust inhalation elicits acute vasoconstriction in vivo. *Environ. Health Perspect.* 116, 937–942.

Pietta, Pier-Giorgio. 2000. Flavonoids as antioxidants." *Journal of natural products* 63, no. 7: 1035-1042.

Ratnam, D. Venkat, D. D. Ankola, V. Bhardwaj, D. KUMAR Sahana, and M. N. V. Kumar. 2006."Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective." *Journal of Controlled Release* 113, no. 3: 189-207.

Rimbach, Gerald, Christine Boesch-Saadatmandi, Jan Frank, Dagmar Fuchs, Uwe Wenzel, Hannelore Daniel, Wendy L. Hall, and Peter D. Weinberg. 2008. Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease—A

molecular perspective. *Food and Chemical Toxicology* 46, no. 4: 1308-1319.

Robert D. Brook, Sanjay Rajagopalan, C. Arden Pope III, Jeffrey R. Brook, Aruni Bhatnagar, Ana V. Diez-Roux, Fernando Holguin, Yuling Hong, Russell V. Luepker, Murray A. Mittleman, Annette Peters, David Siscovick, Sidney C. Smith, Jr, Laurie, Whitsel and Joel D. Kaufman. 2010. Particulate Matter Air Pollution and Cardiovascular Disease : An Update to the Scientific Statement From the American Heart Association *Circulation*, 121: 2331-2378.

Rukmana, Rahmat dan Y. Y. Oesman. 2000. *Kacang Tunggak Budi Daya dan Prospek Usaha Tani*. Yogyakarta: Kanisius

Sagai, Masaru, Hiroki Saito, Takamichi Ichinose, Masahiko Kodama, and Yoki Mori. 1993. Biological effects of diesel exhaust particles. I. in vitro production of superoxide and in vivo toxicity in mouse." *Free Radical Biology and Medicine* 14, no. 1: 37-47.

Scandalios, J. G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38, no. 7: 995-1014.

Sessa, William C., and Kevin M. Mullane. 2012. Release of a neutrophil-derived vasoconstrictor agent which augments platelet-induced contractions of blood vessels in vitro." *British journal of pharmacology* 99, no. 3: 553-559.

Slauch, James M. 2011. How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question." *Molecular microbiology* 80, no. 3: 580-583.

Sun, Q., Yue, P., Ying, Z., Cardounel, A. J., Brook, R. D., Devlin, R., Hwang, J. S., Zweier, J. L., Chen, L. C., and Rajagopalan, S. 2008. Air pollution exposure potentiates hypertension through reactive oxygen species mediated activation of Rho/ROCK. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1760–1766.

Sydbom, A., A. Blomberg, S. Parnia, N. Stenfors, T. Sandström, and S. E. Dahlen. 2001. Health effects of diesel exhaust emissions. *European Respiratory Journal* 17, no. 4: 733-746.

Tornqvist, H., Mills, N. L., Gonzalez, M., Miller, M. R., Robinson, S. D., Megson, I. L., MacNee, W., Donaldson, K., Soderberg, S., Newby, D. E., et al. 2007.

Persistent endothelial dysfunction in humans after diesel exhaust inhalation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 176, 395–400.

Urch, B., Silverman, F., Corey, P., Brook, J. R., Lukic, K. Z., Rajagopalan, S., and Brook, R. D. 2005. Acute blood pressure responses in healthy adults during controlled air pollution exposures. *Environ. Health Perspect.* 113, 1052–1055.

Valko, M; Leibfritz, D; Moncol, J; Cronin, MTD; Mazur, M; Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY & CELL BIOLOGY* 39: 44-84.

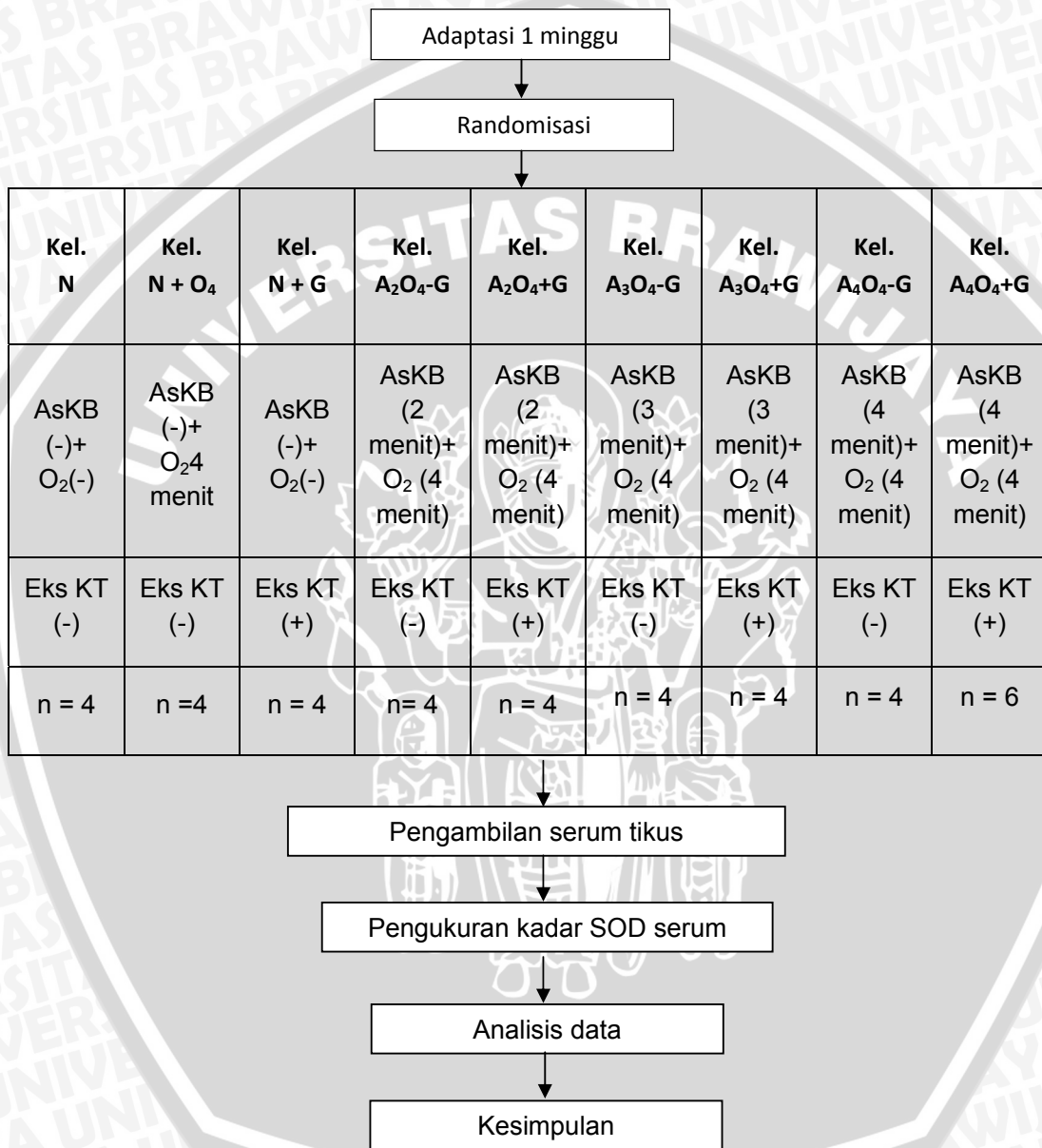
Vedavanam K, Sriyanta S, O'Reilly J, Raman A, Wiseman H. 1999. Antioxidant action and potential antidiabetic properties of anisoflavonoid-containing soybean phytochemical extract (SPE). *Phytothes Res* 13:601-608.

Wang, M. L., A. G. Gillaspie, J. B. Morris, R. N. Pittman, J. Davis and G. A. Pederson. 2008. Flavonoid Content In Different Legume Germplasm Seeds Quantified by HPLC. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 6, pp: 62-69

Winarsi, Hery. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius

Yumin Hu, Daniel G. Rosen, Yan Zhou, Li Feng, Gong Yang, Jinsong Liu, and Peng Huang. 2005. Mitochondrial Manganese-Superoxide Dismutase Expression in Ovarian Cancer. *The Journal Of Biological Chemistry* VOL. 280, NO. 47, pp. 39485–39492

Lampiran 1. Diagram alur penelitian



Keterangan:
Eks KT: Ekstrak kacang tunggak 2mL/hari

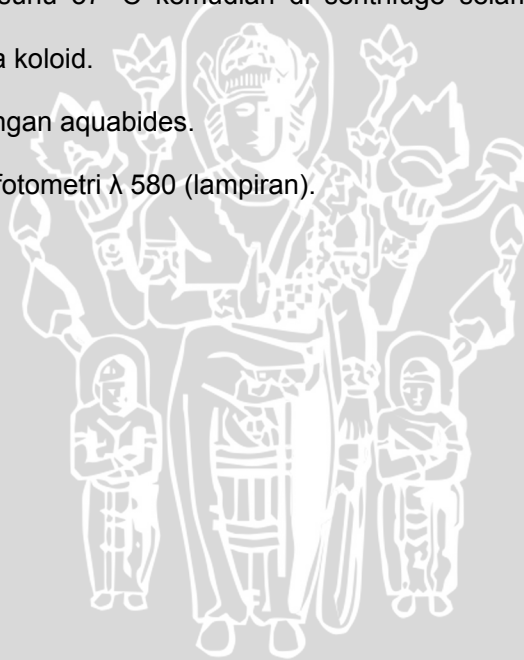
Lampiran 2. Metode Pengukuran SOD

Komposisi :

- Serum tikus 200 μ L
- EDTA 100 mM 200 μ L + 500 μ L Buffer Vortex
- NBT 25 unit 100 μ L
- Xanthine 25 unit 100 μ L
- XO 1 unit 100 μ L

+ PBS menjadi 1 mL

4. Diinkubasi pada suhu 37⁰ C kemudian di sentrifuge selama 30 menit lalu saring apabila ada koloid.
5. Dijadikan 3 cc dengan aquabides.
6. Dibaca di spektrofotometri λ 580 (lampiran).



Lampiran 3. Penggunaan Spektrofotometri

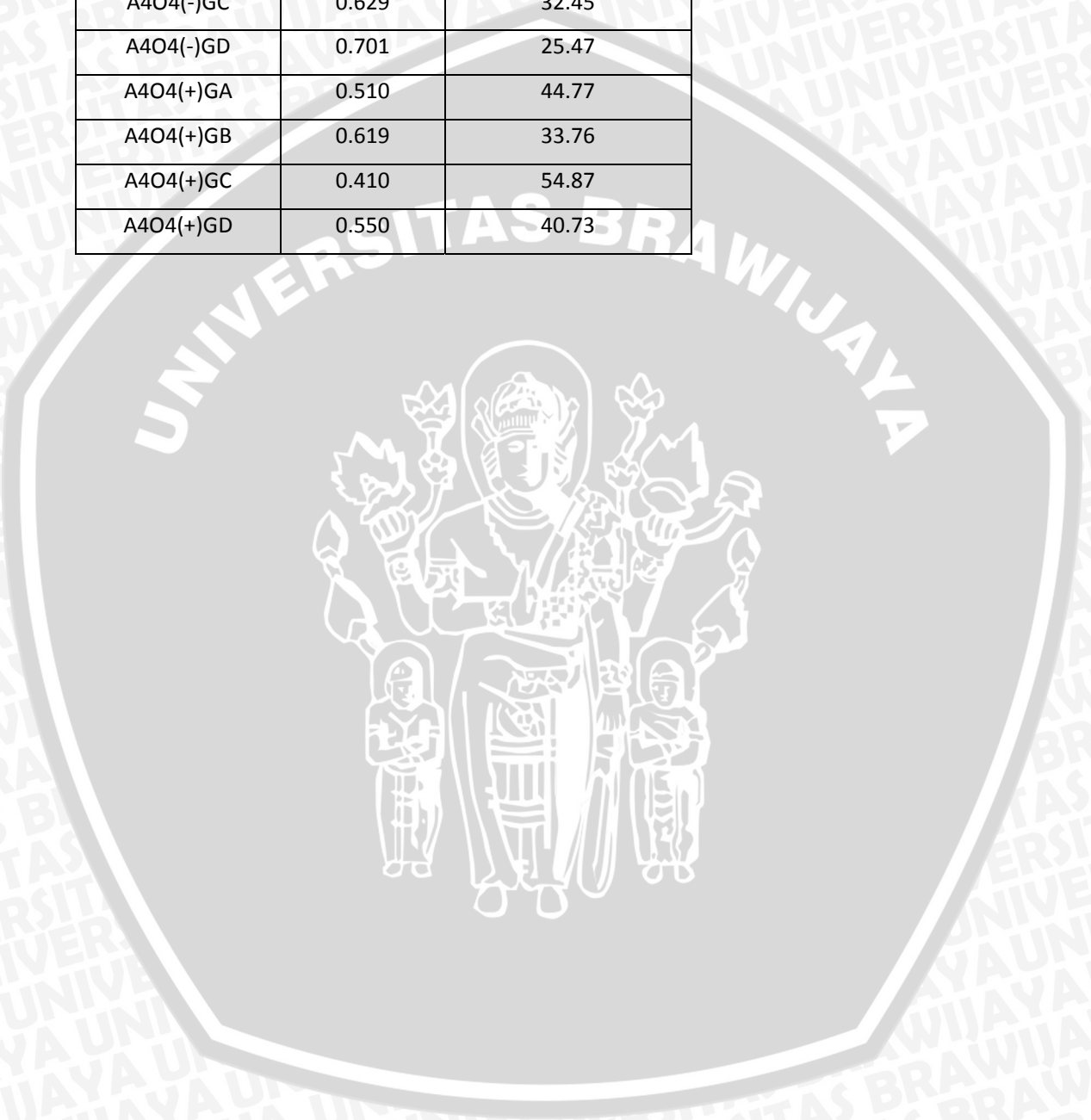
1. Dipilih MODE I, maka akan muncul Photometric Mode Display.
2. Panjang gelombang pengukuran ditentukan dengan menekan GO TO WL.
3. Larutan blanko diisi ke dalam 2 kuvet, kemudian dimasukkan ke dalam sel pengukuran.
4. AUTOZERO ditekan untuk meng-nol-kan absorbansi.
5. Kuvet no 2 diambil dari sel pengukuran, dibuang isinya dan diganti dengan sampel yang akan diukur absorbansinya.
6. Dimasukkan kembali ke dalam sel pengukuran, tekan START/STOP untuk melakukan pengukuran.
7. Berikut untuk sampel-sampel yang lain.
8. Hasil pengukuran dicatat atau disimpan.



Lampiran 4. Hasil Penghitungan Kadar SOD Serum

Kode Sample	Absorbansi	Kadar SOD (unit/mL)
N.A	0.461	49.72
N.B	0.536	42.14
N.C	0.497	46.08
N.D	0.569	38.81
N+O4	0.513	44.46
N+O4	0.454	50.42
N+O4	0.553	40.42
N+O4	0.561	39.62
N+G1	0.367	59.21
N+G2	0.412	54.67
N+G3	0.475	48.30
N+G4	0.670	28.61
A2O4(-)GA	0.712	24.36
A2O4(-)GB	0.704	25.17
A2O4(-)GC	0.647	30.93
A2O4(-)GD	0.610	34.67
A2O4(+)GA	0.570	38.71
A2O4(+)GB	0.540	36.69
A2O4(+)GC	0.505	45.27
A2O4(+)GD	0.441	51.74
A3O4(-)GA	0.701	26.47
A3O4(-)GB	0.698	26.78
A3O4(-)GC	0.598	35.88
A3O4(-)GD	0.607	34.97
A3O4(+)GA	0.416	54.26
A3O4(+)GB	0.490	46.79
A3O4(+)GC	0.509	44.87
A3O4(+)GD	0.593	36.38

A4O4(-)GA	0.741	21.43
A4O4(-)GB	0.498	45.98
A4O4(-)GC	0.629	32.45
A4O4(-)GD	0.701	25.47
A4O4(+)GA	0.510	44.77
A4O4(+)GB	0.619	33.76
A4O4(+)GC	0.410	54.87
A4O4(+)GD	0.550	40.73



Lampiran 5. Analisis Data Kadar SOD Serum

Uji Normalitas

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Konsentrasi	.095	36	.200*	.976	36	.618

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances			
Konsentrasi SOD Serum			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.918	8	27	.517

Uji OneWay ANOVA

ANOVA					
Konsentrasi SOD Serum					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1701.095	8	212.637	3.339	.009
Within Groups	1719.393	27	63.681		
Total	3420.488	35			

Post Hoc Test

Multiple Comparisons

Konsentrasi SOD serum

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
N	N + O4	.45750	5.64275	.936	-11.1205	12.0355
	N + G	-3.51000	5.64275	.539	-15.0880	8.0680
	A2O4(-)G	15.40500*	5.64275	.011	3.8270	26.9830
	A2O4(+)G	1.08500	5.64275	.849	-10.4930	12.6630
	A3O4(-)G	13.16250*	5.64275	.027	1.5845	24.7405
	A3O4(+)G	-1.38750	5.64275	.808	-12.9655	10.1905
	A4O4(-)G	12.85500*	5.64275	.031	1.2770	24.4330
	A4O4(+)G	.65500	5.64275	.908	-10.9230	12.2330
N + O4	N	-.45750	5.64275	.936	-12.0355	11.1205
	N + G	-3.96750	5.64275	.488	-15.5455	7.6105
	A2O4(-)G	14.94750*	5.64275	.013	3.3695	26.5255
	A2O4(+)G	.62750	5.64275	.912	-10.9505	12.2055
	A3O4(-)G	12.70500*	5.64275	.033	1.1270	24.2830
	A3O4(+)G	-1.84500	5.64275	.746	-13.4230	9.7330
	A4O4(-)G	12.39750*	5.64275	.037	.8195	23.9755
	A4O4(+)G	.19750	5.64275	.972	-11.3805	11.7755
N + G	N	3.51000	5.64275	.539	-8.0680	15.0880
	N + O4	3.96750	5.64275	.488	-7.6105	15.5455
	A2O4(-)G	18.91500*	5.64275	.002	7.3370	30.4930
	A2O4(+)G	4.59500	5.64275	.423	-6.9830	16.1730
	A3O4(-)G	16.67250*	5.64275	.006	5.0945	28.2505
	A3O4(+)G	2.12250	5.64275	.710	-9.4555	13.7005
	A4O4(-)G	16.36500*	5.64275	.007	4.7870	27.9430
	A4O4(+)G	4.16500	5.64275	.467	-7.4130	15.7430



A2O4(-)G	N	-15.40500*	5.64275	.011	-26.9830	-3.8270
	N + O4	-14.94750*	5.64275	.013	-26.5255	-3.3695
	N + G	-18.91500*	5.64275	.002	-30.4930	-7.3370
	A2O4(+G	-14.32000*	5.64275	.017	-25.8980	-2.7420
	A3O4(-)G	-2.24250	5.64275	.694	-13.8205	9.3355
	A3O4(+G	-16.79250*	5.64275	.006	-28.3705	-5.2145
	A4O4(-)G	-2.55000	5.64275	.655	-14.1280	9.0280
	A4O4(+G	-14.75000*	5.64275	.014	-26.3280	-3.1720
A2O4(+G	N	-1.08500	5.64275	.849	-12.6630	10.4930
	N + O4	-.62750	5.64275	.912	-12.2055	10.9505
	N + G	-4.59500	5.64275	.423	-16.1730	6.9830
	A2O4(-)G	14.32000*	5.64275	.017	2.7420	25.8980
	A3O4(-)G	12.07750*	5.64275	.042	.4995	23.6555
	A3O4(+G	-2.47250	5.64275	.665	-14.0505	9.1055
	A4O4(-)G	11.77000*	5.64275	.047	.1920	23.3480
	A4O4(+G	-.43000	5.64275	.940	-12.0080	11.1480
A3O4(-)G	N	-13.16250*	5.64275	.027	-24.7405	-1.5845
	N + O4	-12.70500*	5.64275	.033	-24.2830	-1.1270
	N + G	-16.67250*	5.64275	.006	-28.2505	-5.0945
	A2O4(-)G	2.24250	5.64275	.694	-9.3355	13.8205
	A2O4(+G	-12.07750*	5.64275	.042	-23.6555	-.4995
	A3O4(+G	-14.55000*	5.64275	.016	-26.1280	-2.9720
	A4O4(-)G	-.30750	5.64275	.957	-11.8855	11.2705
	A4O4(+G	-12.50750*	5.64275	.035	-24.0855	-.9295
A3O4(+G	N	1.38750	5.64275	.808	-10.1905	12.9655
	N + O4	1.84500	5.64275	.746	-9.7330	13.4230
	N + G	-2.12250	5.64275	.710	-13.7005	9.4555
	A2O4(-)G	16.79250*	5.64275	.006	5.2145	28.3705
	A2O4(+G	2.47250	5.64275	.665	-9.1055	14.0505
	A3O4(-)G	14.55000*	5.64275	.016	2.9720	26.1280
	A4O4(-)G	14.24250*	5.64275	.018	2.6645	25.8205
	A4O4(+G	2.04250	5.64275	.720	-9.5355	13.6205



A4O4(-)G	N	-12.85500*	5.64275	.031	-24.4330	-1.2770
	N + O4	-12.39750*	5.64275	.037	-23.9755	-.8195
	N + G	-16.36500*	5.64275	.007	-27.9430	-4.7870
	A2O4(-)G	2.55000	5.64275	.655	-9.0280	14.1280
	A2O4(+)G	-11.77000*	5.64275	.047	-23.3480	-.1920
	A3O4(-)G	.30750	5.64275	.957	-11.2705	11.8855
	A3O4(+)G	-14.24250*	5.64275	.018	-25.8205	-2.6645
	A4O4(+)G	-12.20000*	5.64275	.040	-23.7780	-.6220
A4O4(+)G	N	-.65500	5.64275	.908	-12.2330	10.9230
	N + O4	-.19750	5.64275	.972	-11.7755	11.3805
	N + G	-4.16500	5.64275	.467	-15.7430	7.4130
	A2O4(-)G	14.75000*	5.64275	.014	3.1720	26.3280
	A2O4(+)G	.43000	5.64275	.940	-11.1480	12.0080
	A3O4(-)G	12.50750*	5.64275	.035	.9295	24.0855
	A3O4(+)G	-2.04250	5.64275	.720	-13.6205	9.5355
	A4O4(-)G	12.20000*	5.64275	.040	.6220	23.7780

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



Lampiran 6. Dokumentasi Penelitian



Hewan Coba



Kelompok Tikus



Ekstraksi Kacang Tunggak



Euthanasia tikus



Pengambilan Sampel Darah



Sampel Darah dalam Tabung

Lampiran 7

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Arum Gladys K.
NIM : 0910710041
Program Studi : Program Studi Pendidikan Dokter
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari dapat di buktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, Rabu 06 Februari 2013

Yang membuat pernyataan,

(Arum Gladys K.)

NIM. 0910710041