

**PENGARUH PEMBERIAN KEFIR SUSU SAPI TERHADAP KADAR  
HEMOGLOBIN PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) BUNTING  
YANG DIPAPAR ASAP ROKOK**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kebidanan**



**Oleh:**

**Frista Eva Rosemarr**

**NIM: 145070607111004**

**PROGRAM STUDI S1 KEBIDANAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

PENGARUH PEMBERIAN KEFIR SUSU SAPI TERHADAP KADAR HEMOGLOBIN PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) BUNTING YANG DIPAPAR ASAP ROKOK

Oleh

Fitria Eva Rosemary

NIM.145070607111004

Telah diuji pada Hari Rabu Tanggal 12 Mei 2018 dan dinyatakan lulus oleh

Penguji-I,

Dr. rer. nat Tri Yudianti Mardiana Raras, M.App.Sc., Ph.D.  
NIP. 196611051993032001

Pembimbing-I/Penguji-II,

Pembimbing-II/Penguji-III,

dr. Ely Mayangsari, M.Biomed  
NIP. 198405162009122005

Lili Indahwati, SST, M.Keb  
NIK. 2016116303232001



**PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Frista Eva Rosemarry

NIM : 145070607111004

Program Studi : S1 Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

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

Malang, 13 Maret 2018

(Frista Eva Rosemarry)  
NIM 145070607111004

**CURICULUM VITAE****IDENTITAS DIRI**

Nama : Frista Eva Rosemarry  
Tempat/Tanggal Lahir : Surabaya, 18 February 1996  
Jenis Kelamin : Perempuan  
Agama : Islam  
Pekerjaan : Mahasiswi Universitas Brawijaya  
Status : Belum Menikah  
Alamat Tempat Asal : Jalan Gundih III/5 RT. 07 RW 01 Kelurahan Gundih,  
Kecamatan Bubutan, Surabaya, 60172.  
Alamat Tempat Kost : Jalan Bendungan Wlingi No. 16 Kelurahan  
Sumpersari Kecamatan Lowokwaru, Malang.  
Nomer Telepon : 08994270460  
Email : fr135ta.eva18@gmail.com  
Kewarganegaraan : Indonesia

**LATAR BELAKANG PENDIDIKAN FORMAL**

2000-2002 :TK Alizah Kota Surabaya

2002-2008	:SDS Ta'miriyah Kota Surabaya
2008-2011	:SMPN 2 Kota Surabaya
2011-2014	:SMAN 21 Kota Surabaya
2014-Sekarang	:Program Studi Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

### **PENGALAMAN ORGANISASI**

1. Staff Anggota PMR SMA Negeri 21 Surabaya tahun 2013-2014
2. Staff Danus PHW JATIM IKAMABI tahun 2015-2016

### **PENGALAMAN KEPANITIAN**

1. Panitia Lokasi PEMIRA tahun 2014
2. Wakil Koordinator Sie Danus Lokakarya PKM Maba tahun 2015
3. Staff Sie PDDM GEJALA tahun 2015
4. Koordinator Sie Acara Competition Mision tahun 2016
5. Wakil Koordinator Sie Danus Lokakarya PKM Maba tahun 2016

## ABSTRAK

Rosemarry, Frista Eva. 2018. **Pengaruh Pemberian Kefir Susu Sapi terhadap Kadar Hemoglobin pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Bunting yang Dipapar Asap Rokok**. Tugas Akhir, Program Studi S1 Kebidanan, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Elly Mayangsari, M.Biomed (2) Lilik Indahwati, SST., M.Keb.

Asap rokok memiliki kandungan zat-zat yang berbahaya seperti karbon monoksida yang dapat mengakibatkan kenaikan kadar hemoglobin sebagai kompensasi karena hipoksia yang disebabkan oleh pengikatan antara oksigen dan hemoglobin terganggu. Antioksidan yang ada di dalam kefir dapat mengaktifkan sistem antioksidan dalam tubuh sehingga mampu mencegah oksidasi, mengurangi radikal superoksida, hidrosil dan peroksida. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian kefir susu sapi terhadap kadar hemoglobin pada tikus putih bunting yang dipapar asap rokok. Penelitian ini menggunakan eksperimen laboratorium dengan rancangan penelitian *Randomized Post Test only Control Grup design* dengan menggunakan 25 ekor tikus putih yang dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kontrol positif, kontrol negatif, perlakuan 1 (dosis kefir 0,375 ml/hari), perlakuan 2 (dosis kefir 0,75 ml/hari), dan perlakuan 3 (dosis kefir 1,5 ml/hari). Pemberian kefir susu sapi dan asap rokok pada hewan coba dilakukan selama 14 hari yaitu dimulai hari ke-5 sampai hari ke-18 kebuntingan. Pada hari ke-19 kebuntingan dilakukan pembedahan selanjutnya dilakukan pengujian kadar hemoglobin. Hasil penelitian ini menunjukkan hasil uji *one way ANOVA* memiliki nilai  $p=0,003$  ( $p<0,05$ ) yang artinya bahwa terdapat perbedaan yang signifikan semua kelompok perlakuan. Hasil dari uji *d-type effect size* didapatkan bahwa dosis kefir susu sapi yang efektif yaitu pada dosis 0,75 dan 1,5 ml/hari. Penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian kefir susu sapi dapat mencegah terjadinya peningkatan kadar hemoglobin pada tikus (*Rattus norvegicus*) bunting yang diberi paparan asap rokok.

Kata kunci: asap rokok, kefir susu sapi, kadar hemoglobin

## ABSTRACT

Rosemarry, Frista Eva. 2018. **Influence Giving Cow Milk Kefir to Hemoglobin Level in White Rat (*Rattus novergicus*) Pregnant Exposed Cigarette Smoke.** Undergraduate thesis, Midwifery Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University, Malang. Supervisor Chairman: (1) dr. Elly Mayangsari, M.Biomed (2) Lilik Indahwati, SST., M.Keb.

Cigarette smoke contains harmful substances such as carbon monoxide which can lead to increase hemoglobin levels as a compensation due to hypoxia caused by binding disturbed between oxygen and hemoglobin. Antioxidants in Kefir can activate the antioxidant system in the body so as to prevent oxidation, and also reduce superoxide radicals, hydroxyl and peroxide. This study aims to prove the effect of giving cow milk Kefir toward hemoglobin levels in pregnant white rat exposed to cigarette smoke. This research used laboratory experiment with Randomised Post Test only Control Group design with 25 white rats divided into 5 groups: positive control, negative control, treatment 1 (0,375 ml/day), treatment 2 (dose of kefir 0,75 ml/day), and treatment 3 (1,5 ml/day). Giving cow milk kefir and cigarette smoke in rat for 14 days starting from the 5th day to the 18th day of pregnancy. On the day after termination of the pregnancies, each group were tested their hemoglobin level. This research shows one way ANOVA has  $p = 0,003$  ( $p < 0,05$ ) which means there are significant differences in The result of d-Type Effect Size Test showed that the effective dosage of cow milk kefir was 0,75 and 1,5 ml/day. This study can be concluded the influence of giving Kefir cow milk prevents increasing level of hemoglobin in pregnant white rat exposed to cigarette smoke.

Keywords: Cigarette smoke, kefir, hemoglobin levels

## KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala kekuatan dan kemudahan yang telah diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian serta penyusunan tugas akhir yang berjudul “Pengaruh Pemberian Kefir Susu Sapi terhadap Kadar Hemoglobin pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Bunting yang Dipapar Asap Rokok”.

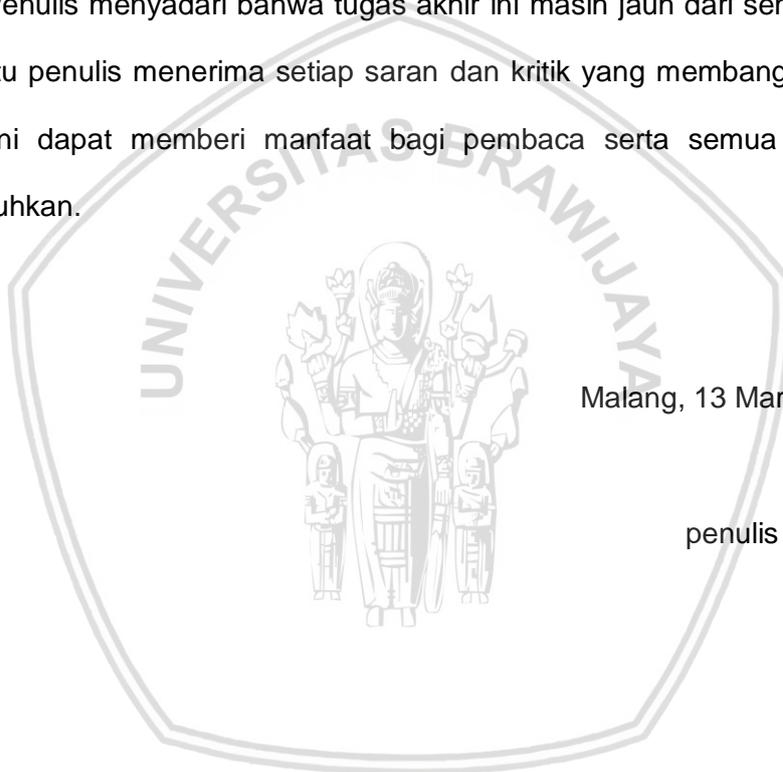
Ketertarikan penulis akan topik ini didasari oleh fakta bahwa tingkat konsumsi masyarakat terhadap rokok semakin meningkat. Pada ibu hamil jika terpapar terus menerus oleh asap rokok sangat mempengaruhi kondisi dan hasil kehamilannya. Para peneliti masih sedikit meneliti kefir pada tikus bunting. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa kefir susu sapi dapat mempengaruhi kadar hemoglobin pada tikus *Rattus norvegicus* bunting yang dipapar asap rokok.

Dengan selesainya tugas akhir ini, penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. dr. Elly Mayangsari, M.Biomed selaku dosen pembimbing I yang telah memberikan bimbingan, masukan dan saran sehingga tulisan ini dapat diselesaikan.
2. Lilik Indahwati, SST., M.Keb selaku pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, masukan dan saran sehingga tulisan ini dapat diselesaikan.
3. Dr.rer.nat Tri Yudani Mardining Raras, M.App.Sc., Ph.D. selaku penguji I yang telah memberikan bimbingan, masukan dan saran sehingga tulisan ini dapat diselesaikan.

4. Linda Ratna Wati, SST., M.Kes selaku Ketua Program Studi S1 Kebidanan yang telah membimbing penulis menuntut ilmu di Program Studi S1 Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
5. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan penulis kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Penulis menyadari bahwa tugas akhir ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis menerima setiap saran dan kritik yang membangun. Semoga tulisan ini dapat memberi manfaat bagi pembaca serta semua pihak yang membutuhkan.



Malang, 13 Maret 2018

penulis

## DAFTAR ISI

Halaman

Judul .....	i
Halaman Pengesahan .....	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan .....	iii
Kata Pengantar .....	iv
Abstrak .....	vi
Abstrack .....	vii
Daftar Isi .....	viii
Daftar Tabel .....	ix
Daftar Gambar .....	xii
Daftar Singkatan .....	xiii
Daftar Lampiran .....	xiv

**BAB 1. PENDAHULUAN**

1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1 Manfaat Akademik.....	4
1.4.2 Manfaat Praktis.....	4

**BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA**

2.1 Asap Rokok .....	5
2.1.1 Kandungan Asap Rokok .....	5
2.1.2 Radikal Bebas dalam Asap Rokok.....	9
2.1.3 Stres Oksidatif dalam Sel Darah Merah .....	11
2.2 Hemoglobin dalam Kehamilan .....	13

2.3	Bahaya Asap Rokok pada Kehamilan .....	15
2.4	Antioksidan .....	16
2.5	Kefir.....	19
2.5.1	Bibit Kefir .....	20
2.5.2	Kandungan Kefir .....	21
2.5.3	Manfaat Kefir .....	22
2.5.4	Kefir sebagai Antioksidan.....	23
2.6	Tikus .....	24
2.6.1	Sistem Reproduksi Tikus Betina .....	25
2.6.2	Fisiologi Tikus Bunting.....	27
2.6.3	Fisiologi Hemoglobin pada Tikus Bunting Normal .....	29

### **BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

3.1	Kerangka Konsep.....	30
3.2	Hipotesis Penelitian .....	33

### **BAB 4. METODE PENELITIAN**

4.1	Rancangan Penelitian .....	34
4.2	Populasi dan Subyek Penelitian.....	34
4.2.1	Kriteria Inklusi .....	35
4.2.2	Kriteria Eksklusi .....	35
4.2.3	Pembagian Kelompok Hewan Coba .....	35
4.2.4	Prosedur dan Teknik Pengambilan Sampel .....	36
4.3	Variabel Penelitian.....	36
4.3.1	Variabel Bebas .....	36
4.3.2	Variabel Tergantung.....	36
4.4	Lokasi dan Waktu Penelitian .....	36
4.4.1	Lokasi .....	36
4.4.2	Waktu Penelitian.....	36
4.5	Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian.....	37
4.5.1	Bahan Penelitian .....	37
4.5.2	Alat Penelitian.....	37
4.6	Definisi Operasional .....	38
4.7	Prosedur Penelitian .....	40
4.7.1	Aklimatisasi Hewan Coba .....	40
4.7.2	Prosedur Penghamilan Hewan Coba .....	40
4.7.3	Penentuan Dosis Kefir Susu Sapi.....	40
4.7.4	Prosedur Pemeliharaan Hewan Coba .....	41
4.7.5	Pemberian Kefir Susu Sapi pada Hewan Coba.....	42

4.7.6	Prosedur Pemaparan Asap Rokok pada Hewan Coba .....	42
4.7.7	Prosedur Pembedahan dan Pengambilan Kadar Hemoglobin ...	43
4.7.8	Prosedur Pengukuran Kadar Hemoglobin .....	43
4.8	Alur Penelitian .....	45
4.9	Analisis Data.....	46
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN</b>		
5.1	Hasil Penelitian .....	49
5.2	Analisa Data .....	50
5.3	Analisis <i>d-Type Effect Size</i> .....	52
<b>BAB 6 PEMBAHASAN</b>	.....	<b>53</b>
<b>BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN</b>		
7.1	Kesimpulan .....	60
7.2	Saran .....	60
Daftar Pustaka	.....	61
Lampiran	.....	66



## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Kadar Normal Hemoglobin Ibu Hamil selama Kehamilan .....	13
Tabel 2.2 Hasil Pengukuran TPC dan Protein pada Kefir Susu Sapi .....	22
Tabel 2.3 Kadar Normal Hemoglobin pada Tikus Tidak Bunting dan Tikus Bunting .....	29
Tabel 5.1 Hasil Pengukuran Rata-Rata Kadar Hemoglobin Induk Tikus yang Dipapar Asap Rokok dan Kefir .....	49
Tabel 5.2 Hasil Uji Tukey HSD .....	51
Tabel 5.3 Hasil <i>D-Type Effect Size</i> Kadar Hemoglobin antara Kelompok Kontrol Positif dan Perlakuan .....	49



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Karboksihemoglobin .....	7
Gambar 2.2 Radikal Bebas pada Asap Rokok.....	10
Gambar 2.3 Bibit Kefir .....	20
Gambar 5.1 Grafik Rata-Rata Kadar Hemoglobin pada Induk Tikus yang Dipapar Asap Rokok dan Kefir .....	50



## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Rokok tembakau dapat membunuh sekitar 6 juta orang setiap tahun diantaranya lebih dari 5 juta orang dari kematian merupakan perokok aktif dan 600.000 orang dari orang perokok pasif (WHO, 2016). Persentase rokok di ASEAN yaitu Indonesia (46,16%), Filipina (16,62%), Vietnam (14,11%), Myanmar (8,73%), Thailand (7,74%), Malaysia (2,9%), Kamboja (2,07%), Laos (1,23%), Singapura (0,39%), dan Brunei (0,04%) (KEMENKES, 2016). Menurut *Global Adult Tobacco Survey Indonesian Report 2011*, prevalensi paparan asap rokok pada perokok pasif di rumah yang tidak merokok 71,7% (WHO, 2012).

Perokok pasif akan menimbulkan dampak yaitu terjadinya penyakit jantung koroner, peningkatan kolesterol darah, berat bayi lahir rendah (BBLR), keguguran, dan bayi mati (KEMENKES, 2011). Asap rokok dari hasil pembakaran rokok mengandung nikotin dapat menimbulkan kerusakan lebih pada janin dan dapat bersifat permanen (Mund *et al.*, 2013).

Asap rokok adalah aerosol yang sangat kompleks yang terdiri dari beberapa ribu zat yang didistribusikan gas dan partikel. Ada lebih dari 4000 bahan kimia dalam asap rokok tembakau, terdapat 250 yang diketahui berbahaya bagi kesehatan seperti nikotin yang bersifat adiktif, tar yang bersifat karsinogenik dan juga terdapat formalin, dan lebih dari 50 yang diketahui menyebabkan kanker (WHO, 2016).

Karbon monoksida yang terdapat pada asap rokok dapat menghasilkan karbosi-hemoglobin. Karbosi-hemoglobin ini dapat menembus plasenta sehingga aliran oksigen ke janin akan terganggu sehingga terjadi hipoksia pada janin (Roderique *et al.*, 2012). Selain itu, kandungan nikotin menyebabkan vasokonstriksi pada tali pusat sehingga menurunkan aliran darah selama kehamilan (Aycicek *et al.*, 2011).

Radikal bebas adalah spesies kimia bebas yang memiliki elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas bersifat sangat reaktif dapat mengubah sifat biomolekul seperti lipid, protein, dan asam nukleat yang mengakibatkan kerusakan pada sel, organ, dan jaringan (Amrstorng, 1994).

Kandungan asap rokok dapat meningkatkan beban oksidan, menurunkan perlindungan oksidan, dan menghasilkan ROS (Halliwell *et.al.*, 2006). Ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan dalam proses oksidan disebut stres oksidatif (Lyras *et al.*, 1997). Asap rokok bisa menyebabkan stress oksidatif atau kerusakan oksidatif pada molekul biologis yang sangat penting seperti sel darah merah (Halliwell *et al.*, 2006).

Salah satu cara untuk mencegah kerusakan pada tubuh akibat radikal bebas yaitu dengan pemberian antioksidan. Antioksidan dapat melindungi sel dari kerusakan akibat radikal bebas. Ada 2 jenis antioksidan yaitu antioksidan enzimatis yang diproduksi oleh tubuh dan antioksidan non enzimatis yang berasal dari luar tubuh sebagai antioksidan pemutus rantai (Kopaei *et al.*, 2013). Kefir susu sapi salah satu contoh dari antioksidan non enzimatis.

Kefir susu sapi adalah susu sapi yang difermentasi dengan bibit kefir yang terdiri dari campuran yang spesifik dan kompleks dari mikroorganisme yang hidup dalam hubungan simbiosis. Minuman kefir mempunyai banyak manfaat dalam

kesehatan tubuh seperti anti kanker, hipokolesterolemik, anti hipertensi, antioksidan, anti inflamasi, imunomodulator, dan anti mikroba (Rosa, 2014). Pada wanita hamil kefir susu sapi juga bermanfaat yaitu dapat meningkatkan penyerapan nutrisi, meningkatkan kekebalan tubuh, membantu tubuh untuk adaptasi dengan perubahan hormon dan mencegah infeksi (John *et al.*, 2015).

Pada bibit kefir terdapat berbagai mikroorganisme yang tertanam pada matriks polisakarida berlendir. Mikroflora yang terdapat pada bibit kefir seperti *Lactobacillus breris*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus kefi*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Kluyveromices lactis*, *Kluyveromices marxianus*, dan *Pichia fermentans* (Angulo *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 2005).

Dalam penelitian Guven *et al.* (2003) menyebutkan bahwa kefir susu sapi dapat memberikan efek antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan vitamin E (Guven *et al.*, 2003). Sejauh pengetahuan peneliti, penelitian kefir susu sapi pada kehamilan masih belum pernah dilakukan, maka dari itu peneliti tertarik melakukan penelitian pada kefir susu sapi pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) bunting dipapar asap rokok. Dengan pemberian kefir susu sapi diharapkan ada mengurangi dampak negatif dalam kehamilan.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh pemberian kefir susu sapi terhadap kadar hemoglobin pada tikus (*Rattus norvegicus*) bunting yang dipapar asap rokok?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1 Tujuan Umum**

Membuktikan bahwa pemberian kefir susu sapi dapat mempengaruhi kadar hemoglobin tikus (*Rattus norvegicus*) bunting yang dipapar asap rokok.

#### **1.3.2 Tujuan Khusus**

1. Mengukur kadar hemoglobin pada tikus bunting yang tidak diberikan kefir susu sapi dan tidak dipapar asap rokok.
2. Mengukur kadar hemoglobin pada tikus bunting yang tidak diberikan kefir susu sapi dan dipapar asap rokok.
3. Mengukur kadar hemoglobin pada tikus bunting yang diberikan kefir susu sapi dengan berbagai dosis dan dipapar asap rokok.
4. Mengklasifikasi dosis optimal kefir susu sapi sebagai antioksidan.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

#### **1.4.1 Manfaat Akademik**

Menambahkan pengetahuan dan sebagai dasar penelitian manfaat susu kefir dalam dunia kebidanan.

#### **1.4.2 Manfaat Praktis**

Dengan adanya penelitian ini diharapkan memberikan manfaat kepada masyarakat tentang pengaruh susu kefir sebagai antioksidan pada kehamilan yang terpapar asap rokok dan kefir susu sapi dapat diproduksi dan dipasarkan di masyarakat.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Asap Rokok

##### 2.1.1 Kandungan Asap Rokok

Asap rokok terdiri dari aerosol yang mengandung tetesan cairan yaitu fase partikel yang ditunda dalam fase gas dan uap yang dihasilkan oleh proses pembakaran, pirolisis, pirosintesis, distilasi, sublimasi, dan kondensasi. Toksik yang terdapat pada asap rokok dilarutkan dalam tetesan atau uap, dimana rata-rata diameter tetesan dalam sub micrometer ( $d_p = 0.1-1\mu\text{m}$ ) (Kleinstreuer *et al.*, 2013).

Tembakau dan kertas terbakar menghasilkan lebih dari 4000 senyawa kimia dalam bentuk gas, uap, dan partikulat seperti karbon monoksida, hidrogen sianida, fenol, ammonia, formaldehida, benzene, pyrene notrosamines, nikotin, dan tar (Shah *et al.*, 2012). Terdapat 250 zat yang diketahui berbahaya bagi kesehatan seperti nikotin yang bersifat adiktif, tar yang bersifat karsinogenik dan juga terdapat formalin, dan lebih dari 50 yang diketahui menyebabkan kanker (WHO, 2016). Banyak kelas kimia organik yang terdapat pada asap rokok termasuk hidrokarbon jenuh atau tak jenuh, alkohol, aldehida, keton, asam karbosilat, ester, fenol, nitril, terpenoid, dan alkaloid (Halliwell *et al.*, 2006). Komponen toksik utama dari asap rokok yaitu karbon monoksida (CO), nikotin, dan tar (Bell *et al.*, 2007).

Asap rokok terbagi menjadi dua yaitu asap rokok muncul dari ujung mulut rokok saat menghisap disebut *mainstream cigarette smoke*, sedangkan asap rokok yang berasal dari pembakaran ujung rokok disebut *sidestream cigarette* (Behera *et al.*, 2014). Pada *sidestream cigarette smoke* memiliki dampak 3 kali lebih berbahaya dibandingkan dengan *mainstream cigarette smoke* (Depkes, 2011).

Hampir keseluruhan kandungan yang terdapat pada tembakau teridentifikasi, termasuk sejumlah isotop radioaktif dan radikal bebas (Edwards, 2016). Setiap isapan rokok mengandung  $10^{16}$  oksidan dan  $10^{14}$  radikal bebas yang akan masuk semuanya ke dalam paru (Halliwell dan Gutteridge, 2000). Pada saat asap rokok terhirup, terdapat 8% dari kandungan pada asap rokok yang ikut terhirup, terdapat  $10^9$  dari  $10^{10}$  partikel  $\text{cm}^3$  pada asap rokok, dengan 50-90% tertinggal di dalam paru setelah ekspirasi (Edwards, 2016).

Beberapa kandungan rokok yang bersifat toksik yaitu:

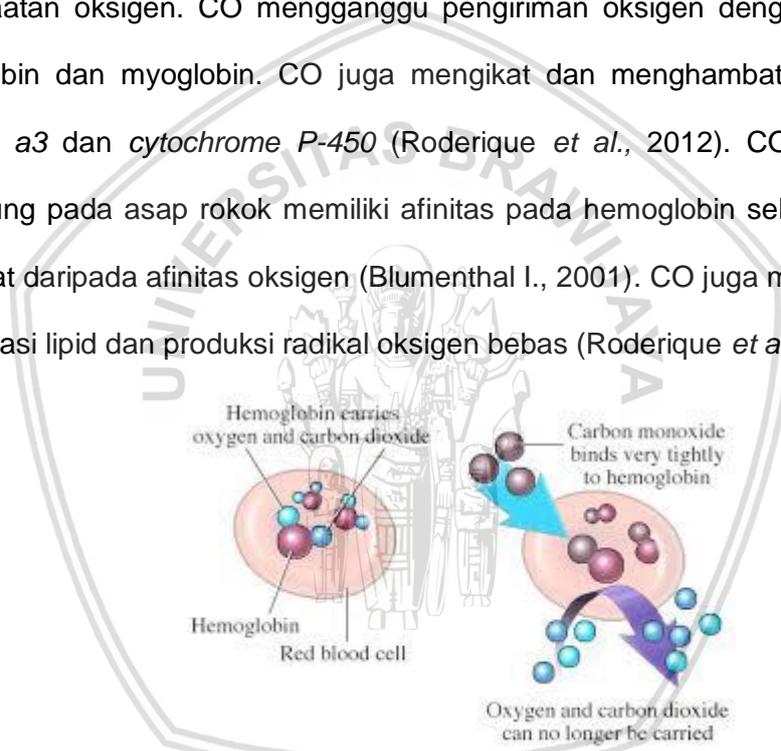
#### 1. Nikotin

Nikotin (*Nicotiana tabacum*) adalah alkaloid alami yang ditemukan di tanaman tembakau. Di dalam rokok mengandung sebanyak 20,9 mg dan hanya sekitar 2 mg yang dapat diserap oleh tubuh (Cadwell, 2001). Ketika nikotin dihirup dengan cepat memasuki aliran darah, melewati darah ke otak sebagai barrier, dan mencapai di sistem saraf pusat untuk menstimulus (Tweed *et al.*, 2012). Nikotin dimetabolisme di hati oleh sitokrom P450 enzim CYP2A6 dan CYP2B6 untuk membentuk berbagai metabolisme, 70 sampai 80% dari yang diubah menjadi kotinin yang kemudian diekskresikan melalui urin (Tweed *et al.*, 2012). Nikotin menyebabkan peningkatan pelepasan katekolamin ke dalam aliran darah yang akan meningkatkan denyut nadi dan tekanan darah, pelepasan asam lemak bebas

darah, dan mobilisasi gula darah. Nikotin juga menyebabkan penurunan suhu kulit, gairah, dan relaksasi. Pada tingkat sel, efek nikotin yaitu peningkatan sintesis dan pelepasan dari neurotransmitter dan hormone, induksi dari stres oksidatif, dan pencegahan apoptosis (Tweed *et al.*, 2012).

## 2. Gas Karbon Monoksida

Karbon monoksida (CO) akan menghambat transportasi, pengiriman, dan pemanfaatan oksigen. CO mengganggu pengiriman oksigen dengan mengikat hemoglobin dan myoglobin. CO juga mengikat dan menghambat *cytochrome oxidase a3* dan *cytochrome P-450* (Roderique *et al.*, 2012). CO pada yang terkandung pada asap rokok memiliki afinitas pada hemoglobin sekitar 210 kali lebih kuat daripada afinitas oksigen (Blumenthal I., 2001). CO juga menyebabkan peroksidasi lipid dan produksi radikal oksigen bebas (Roderique *et al.*, 2012).



**Gambar 2.1 Karboksihemoglobin (Universitas Bilkent, 2009)**

Karbon monoksida akan berikatan dengan hemoglobin dengan menggeser oksigen sehingga menghasilkan karboksihemoglobin yaitu bentuk tidak aktif dari hemoglobin yang tidak memiliki kapasitas untuk membawa oksigen sehingga menyebabkan penurunan kemampuan hemoglobin dan gangguan pengiriman oksigen ke jaringan. Untuk mengimbangi menurunnya kemampuan mengirimkan oksigen sehingga tubuh merespon mempertahankan banyaknya kadar hemoglobin dibandingkan dengan tubuh yang tidak terpapar asap rokok (Shah *et*

*al.*, 2012). Meningkatnya kadar hemoglobin dalam tubuh mengakibatkan darah menjadi lebih kental dan menurunkan curah jantung (Behrman *et al.*, 2000).

CO dapat melewati plasenta secara pasif dan difusi. Kapasitas difusi CO di seluruh plasenta meningkat berdasarkan usia kehamilan dan berat janin karena disebabkan oleh laju aliran darah plasenta dan konsentrasi hemoglobin ibu. Kadar karboksihemoglobin terakumulasi dalam sirkulasi janin yang disebabkan oleh disosiasi CO yang lambat dari hemoglobin ibu. Hipoksia pada jaringan janin terjadi melalui dua mekanisme yaitu menurunkan difusi oksigen ke dalam sirkulasi janin dan dengan toksisitas langsung saat CO melewati plasenta. Karboksihemoglobin dalam sirkulasi maternal meningkatkan afinitas ikatan hemoglobin sehingga menggantikan oksigen dari tempat pengikatan hemoglobin sehingga menyebabkan penurunan transportasi oksigen yang melewati plasenta secara signifikan dan janin tidak dapat meningkatkan curah jantung untuk kompensasi penurunan saturasi oksigen. Meskipun saat CO belum melewati plasenta, janin sudah menderita hipoksia karena kadar oksigen yang berkurang dalam sirkulasi maternal. Kadar karboksihemoglobin pada janin kira-kira 10-15% lebih tinggi daripada sirkulasi maternal (Roderique *et al.*, 2012).

### 3. Tar

Tar adalah zat yang berasal dari hasil pembakaran tembakau yang bersifat racun dan merusak paru-paru melalui berbagai proses biokimiawi. Tar menyebabkan membungkus silia yang terdapat pada sel epitel baru sehingga partikel yang beracun tidak dapat ditangkap oleh silia tersebut dan menyebabkan rusaknya mukosa rongga mulut, merubah warna gigi, gusi, serta mengurangi kepekaan pengecap di mulut (Ferlay *et al.*, 2008).

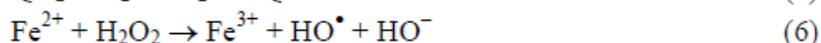
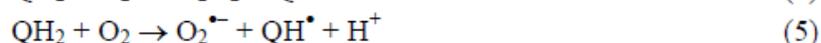
### 2.1.2 Radikal Bebas dalam Asap Rokok

Radikal bebas merupakan molekul atau fragmen molekul yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan dalam orbital atom atau molekul (Valko *et al.*, 2007). Elektron yang tidak berpasangan ini memiliki tingkat reaktifitas yang cukup besar pada radikal bebas (Valko *et al.*, 2007). Radikal bebas akan mengisi orbit eksterna yang tunggal dengan elektron yang lain. Saat radikal bebas mendekati target molekul yang memiliki elektron satu atau lebih menyebabkan tertariknya keluar elektron dari target molekul tadi (lorio, 2007). Radikal bebas yang melekat dan menarik keluar pada molekul lain akan menyebabkan kerusakan atau mengubah struktur atau fungsi molekul tersebut (Tamboyang, 2000).

Radikal bebas oksigen biasanya disebut juga *Reactive Oxygen Species* (ROS). ROS (*Reactive Oxygen Species*) diproduksi oleh tubuh akibat hasil dari metabolisme sel normal dan faktor lingkungan (Birben *et al.*, 2012). ROS endogen berasal dari rantai pernafasan di mitokondria, reaksi imun, enzim seperti *xanthine oxidase* dan *nitric oxide synthase*, dan *transition metal mediated oxidation*. ROS yang eksogen yaitu radikal bebas yang berasal dari lingkungan seperti asap rokok, radiasi, pestisida, polusi, limbah industry, dan ozon (Pandey and Rizvi, 2011). Terdapat 3 ROS utama yang secara fisiologi signifikan yaitu anion superoksida ( $O_2^\bullet$ ), hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), dan radikal hidroksil ( $HO^\bullet$ ) (Birben *et al.*, 2012). Anion superoksida dibentuk dengan penambahan 1 elektron ke molekul oksigen dengan proses dimediasi oleh oksidase Nikotin Adenin Dinukleotida Fosfat (NAD(P)H), *xanthine oxidase*, atau sistem transpor elektron mitokondria (Birben *et al.*, 2012). Anion Superoksida merupakan ROS primer dan dapat berinteraksi

dengan molekul lain untuk menghasilkan ROS sekunder, baik secara langsung atau umum melalui enzim atau proses katalisis logam (Valko *et al.*, 2007).

Asap rokok *mainstream* di bagi menjadi partikel fase padat (tar) dan fase gas (gas beracun, senyawa organik yang mudah menguap, radikal bebas). Asap rokok *sidestream* dibagi menjadi dalam fase padat dan gas yang mengandung konsentrasi senyawa beracun dan karsinogenik yang lebih tinggi. (Valavanidis *et al.*, 2009). Radikal bebas dan oksidan pada fase gas dalam keadaan stabil di mana mereka terbentuk dan hancur dan konsentrasinya meningkat seiring usia asap (Valavanidis *et al.*, 2009). Asap rokok merupakan salah satu faktor yang dapat meningkatkan produksi radikal bebas (Phaniendra *et al.*, 2015). Beberapa komponen yang larut dalam air dari *Aqueous Cigarette Tar (ACT)* dapat menghasilkan anion superoksida ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), dan radikal hidroksil reaktif ( $HO^{\bullet}$ ), yang menyebabkan kerusakan oksidatif pada lipida membran sel, protein, enzim, dan DNA (Valavanidis *et al.*, 2008). Hal ini menyebabkan kerusakan pada jaringan dengan berbagai kondisi penyakit, seperti penyakit kardiovaskuler, diabetes mellitus, katarak, radang sendi, asma, penyakit neurogeneratif, dan perkembangan penyakit dapat berkembang sangat cepat (Phaniendra *et al.*, 2015)



**Gambar 2.2 Radikal bebas pada asap rokok (Valavanidis *et al.*, 2009)**

Tar rokok memiliki konsentrasi tinggi pada radikal bebas stabil yang diidentifikasi sebagai radikal semiquinon ( $QH^{\bullet}$ ) dan radikal pusat karbon ( $-C^{\bullet}$ ) oleh

EPR (Valavanidis *et al.*, 2009). Matriks tar polimeric terdapat sistem quinone (Q), semiquinone (QH•), dan hydroquinone (QH<sub>2</sub>) (Valavanidis *et al.*, 2009). Mekanisme berikut telah diidentifikasi radikal QH• berikatan dengan O<sub>2</sub> sehingga membentuk O<sub>2</sub>• yang dapat dismutase untuk membentuk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Fe<sup>2+</sup> (tar pada rokok mengandung konsentrasi besi yang tinggi) dapat menghasilkan melalui reaksi feton yang sangat mengoksidasi radikal hidroksil (HO•). Radikal bebas yang stabil diidentifikasi sebagai radikal *o*- dan *p*-benzosemiquinon yang berperan dalam kerusakan DNA melalui pembentukan radikal HO• (Valavanidis *et al.*, 2009).

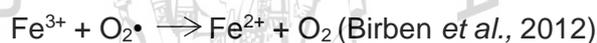
Kandungan radikal bebas pada asap rokok mungkin dapat menurunkan antioksidan eksogen dan endogen seperti vitamin D, GPx, karoten, SOD dan dapat disfungsi dari monosit dan sel otot polos vaskuler (Phaniendra *et al.*, 2015). Menurunnya kadar antioksidan disebabkan tubuh perlu antioksidan yang cukup untuk proses memperbaiki tubuh dari oksidan sehingga terjadi ketidakseimbangan antara antioksidan dan oksidan di dalam tubuh (Watson dan Mark, 2001). Kondisi stress oksidatif terjadi ketika keseimbangan antara oksigen dan antioksidan terganggu karena penurunan antioksidan dan atau banyaknya kadar ROS (Pandey and Rizvi, 2011).

### 2.1.3 Stres Oksidatif dalam Sel Darah Merah

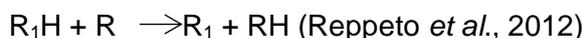
Radikal anion superoksida terbentuk dengan proses reduksi molekul oksigen dimediasi oleh NAD(P)H oksidase dan *xanthine oxidase* atau non enzimatis oleh senyawa reaktif redoks seperti senyawa *semi-ubiquinone* dari rantai transport mitokondria (Valko *et al.*, 2007). Mitokondria merupakan tempat utama yang memproduksi radikal anion superoksida sehingga sistem dari sel dapat menghasilkan adenosin trifosfat. Elektron yang ditransfer melalui rantai

transfer elektron mitokondria untuk mengurangi oksigen dalam air, tapi sekitar 1 sampai 3 % dari semua elektron bocor dari sistem dan menghasilkan radikal anion superoksida. NADPH oksidase ditemukan dalam leukosit polimorfonuklear, monosit, dan makrofag dengan adanya proses fagositosis akan menghasilkan radikal anion superoksida yang akan menyebabkan aktifitas bakterisida (Birben *et al.*, 2012).

Radikal anion superoksida dihilangkan dengan Superoksida Dismutase (SOD) akan menjadi hidroksi peroksida (Valko *et al.*, 2007). ROS akan dinetralkan oleh sistem oksidan sitosol yaitu hidrogen peroksida masuk ke dalam sel darah merah yang cepat beraksi dengan katalase yang dapat menghasilkan oksigen tanpa proses oksidasi pada hemoglobin sehingga menghasilkan kadar oksigen tinggi (Mohanty *et al.*, 2014).



Radikal anion superoksida yang berikatan dengan *ferric* ( $\text{Fe}^{3+}$ ) pada hemoglobin menghasilkan oksigen dan *ferrous* ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Jika  $\text{Fe}^{2+}$  terpapar oksigen yang tinggi secara terus menerus akan mengalami oksidasi yang lambat sehingga menghasilkan methemoglobin. Methemoglobin adalah hemoglobin yang terlalu kuat mengikat oksigen sehingga hemoglobin sulit melepaskan oksigen ke jaringan tubuh. Dalam kondisi normal kadar methemoglobin lebih rendah 1% daripada total hemoglobin, tetapi jika mengalami stres oksidatif maka kadar methemoglobin semakin tinggi (Pandey and Rizvi, 2011). Pada proses ini memproduksi oksigen yang tinggi tetapi hemoglobin terlalu kuat mengikat oksigen, sehingga tubuh merespon untuk meningkatkan kadar hemoglobin untuk memenuhi pengakutan oksigen ke seluruh tubuh (Mohanty *et al.*, 2014).



Sel darah merah memiliki membran plasma yang kaya akan rantai *polyunsaturated fatty acid* (PUFA). Proses peroksida lipid dengan PUFA berikatan dengan ROS atau pelepasan atom hydrogen (H) yang menyebabkan kerusakan pada PUFA (Repetto *et al.*, 2012). Kerusakan PUFA pada sel darah merah akan menyebabkan kerusakan sel darah merah dan merusak fungsinya (Mohanty *et al.*, 2014).

## 2.2 Hemoglobin dalam Kehamilan

Hemoglobin merupakan protein utama dalam sel darah merah, padat dalam sitoplasma, dan 90% berat kering dari sel darah merah (Pandey and Rizvi, 2011). Kadar hemoglobin kondisi fisiologi anemia pada trimester pertama akhir kehamilan <11 g/dl, pada trimester kedua kehamilan <10 g/dl, pada trimester ketiga kehamilan batasannya lebih rendah dari trimester sebelumnya (John *et al.*, 2014).

**Tabel 2.1 Kadar Normal Hemoglobin Ibu Hamil selama Kehamilan (Rodger, 2006)**

Gestation in weeks	Hemoglobin
12	11.0
16	10.6
20	10.5
24	10.5
28	10.7
32	11.0
36	11.4
40	11.9

Berkembangnya volume plasma menyebabkan fisiologi anemia pada kehamilan. Berkembangnya volume plasma menyebabkan menurunnya

hematokrit, konsentrasi hemoglobin, jumlah sirkulasi eritrosit tetapi jumlah menurunnya hemoglobin tidak absolut atau menurunnya tidak absolut jumlah eritrosit dalam sirkulasi. Fisiologi anemia pada kehamilan bertujuan untuk menurunkan viskositas darah ibu sehingga meningkatkan perfusi plasenta dan memfasilitasi persiapan oksigen dan nutrisi ke janin. Dimulai sekitar minggu ke-6 kehamilan, volume plasma meningkat secara tidak proposional terhadap massa sel darah merah. Umumnya mencapai nilai maksimal sekitar usia minggu ke-23 tetapi dapat meningkat terus hingga akhir minggu ke-37. Volume plasma lebih tinggi 40% pada wanita hamil daripada wanita yang tidak hamil. Menurunnya hematokrit, konsentrasi hemoglobin, jumlah sirkulasi eritrosit biasanya terlihat pada usia minggu ke-7 sampai minggu ke-8. Penurunannya berlanjut pada minggu ke-16 sampai minggu ke-22 ketika ekuilibrium terbentuk baru (John *et al*, 2014).

Pada wanita yang tidak hamil, konsentrasi hemoglobin yang normatif tinggi yaitu 15,5-16 g/dl, konsentrasi hemoglobin ringan tinggi adalah 16-17 g/dl, dan konsentrasi hemoglobin yang cukup tinggi adalah >17 g/dl. Selama kehamilan konsentrasi hemoglobin yang tinggi akan lebih menurun karena adanya perubahan fisiologis pada konsentrasi hemoglobin selama kehamilan. Konsentrasi hemoglobin yang tinggi menyebabkan viskositas (kekentalan) darah yang tinggi yang mengakibatkan pengiriman oksigen terganggu ke jaringan dan gangguan fungsi mental akibat komplikasi serebrovaskuler. Selain itu karena aliran darah yang buruk menyebabkan resiko tromboembolisme meningkat (Yip, 2000).

Konsentrasi hemoglobin meningkat biasanya hasil dari 2 mekanisme yaitu peningkatan produksi sel darah merah sebagai mekanisme kompensasi ketika kapasitas pembawa oksigen untuk memenuhi permintaan jaringan (dengan meningkatnya massa sel darah merah) atau volume plasma yang kontriksi akan

menyebabkan volume sel darah merah yang meningkat (tanpa meningkatkan massa sel darah merah). Merokok yang menyebabkan sebagian hemoglobin tidak berfungsi sebagai hasil dari pengikatan dengan karbon monoksida (Yip, 2000).

### 2.3 Bahaya Asap Rokok pada Kehamilan

Merokok saat hamil menghasilkan resiko yang serius kepada ibu dan janin. Pada ibu merokok selama kehamilan signifikan meningkatnya resiko penyakit kardiovaskuler dan *pulmonary* (Greaves *et al.*, 2011). Dalam kehamilan akan meningkatkan resiko komplikasi kehamilan dan menyebabkan hasil janin yang buruk seperti berat badan lahir rendah, kematian janin, abortus spontan, menurunkan pertumbuhan janin, lahir prematur, solusio plasenta, dan *sudden infant death syndrome* (Greaves *et al.*, 2011). Abortus spontan dan komplikasi pada plasenta disebabkan oleh plasenta dan ketuban mengalami percepatan degenerasi (Sinclair, 2009). Ibu hamil yang terpapar asap rokok menyebabkan menurunnya 20% asam folat dalam tubuh ibu sehingga mengakibatkan janin juga kekurangan nutrisi asam folatnya (Mangoenprasodjo, 2005).

Efek toksik yang terdapat saat merokok pada sel janin disebabkan oleh metabolik zat dalam asap rokok (Soothill *et al.*, 1996). Kadar hemoglobin tinggi disebabkan karboksihemoglobin dapat menembus ke plasenta sehingga pengiriman oksigen ke janin akan menurun dan terganggu sehingga menyebabkan menurunkan pertumbuhan janin dan meningkatkan resiko komplikasi hipoksia (Soothill *et al.*, 1996). Nikotin yang ada di tubuh dapat melepaskan asetikolin, hormon antidiuretik, norepinefrin, dan epinefrin dapat menyebabkan takikardi, peningkatan curah jantung, peningkatan tekanan darah, perubahan metabolisme lemak dan karbohidrat, dan vasokonstriksi perifer. Vasokonstriksi

menyebabkan menurunkan aliran darah uteroplasenta selama kehamilan (Aycicek *et al.*, 2011). Nikotin juga dapat menembus plasenta sehingga dapat menyebabkan ketidakseimbangan sirkulasi uteroplasenta yang mengakibatkan berkurangnya suplai nutrisi ke janin (Zdravkovic, 2005).

## 2.4 Antioksidan

Mekanisme pertahanan terhadap stres oksidatif akibat oksidatif bebas yaitu melibatkan mekanisme pencegahan, mekanisme perbaikan, pertahanan fisik, dan pertahanan antioksidan (Valko *et al.*, 2007). Antioksidan adalah zat apapun yang secara signifikan menunda atau mencegah oksidasi pada DNA, lemak, protein, dan karbohidrat yang dapat dioksidasi pada konsentrasi rendah (Sachdeva *et al.*, 2014).

Sistem pertahanan antioksidan adalah sistem perlindungan yang sangat efisien untuk melindungi sel dan organ dari stres oksidatif yang disebabkan oleh ROS yang melibatkan komponen yang berasal dari endogen dan eksogen yang berfungsi untuk menetralkan radikal bebas (Sachdeva *et al.*, 2014). Sistem pertahanan antioksidan bentuk kehidupan dibagi menjadi 4 sub kelas yaitu (Storey, 2004):

1. Pertahanan antioksidan primer, sifat enzimatis atau non-enzimatis, yang berhubungan langsung dengan ROS.
2. Bantuan pertahanan yang mendukung fungsi sistem antioksidan primer (contoh: mendaur ulang atau mensintesis substrat enzim antioksidan).
3. Protein/enzim kompleks logam (misalnya ferritin, transferrin, ceruloplasmin, metallothionein) dan senyawa dengan berat molekul rendah yang mencegah atau

meminimalkan partisipasi besi atau tembaga (atau logam berat lainnya) pada radikal bebas.

4. Sistem perbaikan enzimatik yang memperbaiki biomolekul (DNA, lemak, protein, karbohidrat) yang rusak oleh ROS. Kelompok pertahanan terakhir terdiri dari jumlah yang besar enzim yang memperbaiki DNA yang teroksidasi. Selain itu, beberapa enzim yang baru ditemukan juga memberikan perbaikan pada protein yang teroksidasi.

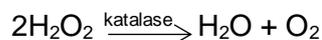
Berdasarkan sifat antioksidan, sistem antioksidan pada manusia dapat dikelompokkan menjadi 2 kelompok yang lebih luas yaitu:

#### 1. Antioksidan Enzimatik

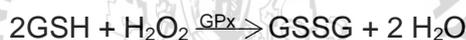
Pertahanan antioksidan endogen intraseluler primer melalui sistem enzim. Pertahanan antioksidan enzimatik meliputi superoksida dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), dan katalase (CAT) (Sachdeva *et al.*, 2014). Superoksida dimustases (SODs) terdapat 3 isoform. Mangan yang mengandung SOD (MnSOD) adalah protein tetramerik yang terlokalisasi dalam matriks mitokondria yaitu berperan penting untuk menangkap  $O_2\cdot$  yang muncul dari rantai transport elektron. Seng dan tembaga yang mengandung SOD (ZnCuSOD) adalah protein dimer yang terbatas pada area kecil di sitoplasma sel yaitu berperan untuk menghilangkan  $O_2\cdot$  yang dimunculkan oleh retikulum endoplasma dan oksidase sitosolik. SOD ekstraseluler ditemukan di ruang ekstraseluler sebagai protein tetramerik yang mengkatalisis penurunan superoksida menjadi  $H_2O_2$  (Sachdeva *et al.*, 2014).



Katalase (CAT) adalah protein tetramerik besar berada di peroksisom dan mitokondria yang mengeluarkan  $\text{H}_2\text{O}_2$  dengan mengkatalisis konversi menjadi air (Sachdeva *et al.*, 2014).



Glutathione peroxidase (GPx) adalah kelompok enzim yang bergantung pada selenium. GPx memiliki 4 isoform yaitu GPx1 sitosolik, Gpx plasma, fosfolipid-hidroperoksida (PHGPx), dan GPx-GI gastrointestinal. Semua GPx memerlukan glutathione (GSH) sebagai kofaktor dan enzim sekunder: glutathione reduktase dan glukosa-6-fosfat dehydrogenase (G-6-PDH) untuk berfungsi. G-6-PDH menghasilkan NADPH untuk mendaur ulang glutathione (Sachdeva *et al.*, 2014).



## 2. Antioksidan Non-enzimatik

Antioksidan non-enzimatik dapat digolongkan menjadi dua kelompok yaitu antioksidan endogen dan eksogen. Protein pengikat logam transisi adalah antioksidan endogen primer ekstraseluler yang ditemukan di plasma manusia yaitu albumin, ceruloplasmin, hepatoglobin, dan transfer. Mereka mengikat dengan logam transisi dan mengendalikan produksi radikal bebas katalis logam. Albumin dan ceruloplasmin adalah masing-masing mengasingkan ion besi dan tembaga. Hepatoglobin berikatan dengan hemoglobin sedangkan ferritin dan menstransfer mengikat dengan besi bebas. Bilirubin, ubiquinon, glutathione, lipoik, dan asam urat adalah antioksidan endogen yang non protein yang menghambat proses oksidasi dengan menangkap ROS. Banyak antioksidan eksogen yang efektif yang berasal dari makanan dan minuman (Sachdeva *et al.*, 2014).

## 2.5 Kefir

Nama kefir berasal dari Slavic keif yang berarti “kesejahteraan” atau “hidup dengan baik”. Kefir berasal dari Kaukasus, Tibet, atau Pegunungan Mongolia yang lebih dari 2000 tahun sebelum masehi bibit kefir telah diturunkan secara tradisional dari generasi ke generasi diantara suku Kaukasus (Rosa, 2014). Kefir diproduksi dengan proses fermentasi asam laktat dan alkohol oleh bakteri mesofilik dan ragi (John and Sirirat, 2015). Kefir berbeda dengan fermentasi lainnya karena diproduksi dari bibit kefir yang terdiri dari campuran bakteri asam laktat dan asam asetat yang spesifik dan kompleks, dan ragi laktosafer yang hidup dalam asosiasi simbiotik (Rosa, 2014). Sebagian besar mikroorganisme yang berada di kefir yaitu bakteri yang tidak pathogen, terutama *Lactobacillus sp.* dan ragi. Kefir diperkaya dengan vitamin, minyak esensial, asam amino, karbon dioksida, alkohol, dan aceton yang menunjukkan manfaat bagi kesehatan (John and Sirirat, 2015). Kefir dapat difermentasi dengan menggunakan susu sapi, susu kambing, susu domba, susu kerbau, dan susu kedelai (Farnworth, 2005).

Menurut penelitian Damiana *et al* (2014) menunjukkan bahwa pada kelompok dosis normal kefir (0,7 ml/hari) dan dosis tinggi kefir (3,5ml/hari) yang diberikan pada tikus betina tidak membahayakan hewan selama pertumbuhannya, hematologi dan kimia darah pada tikus, serta potensi pathogenesis pada jaringan berada dalam batas normal. Hasil tersebut menunjukkan kefir yang diberikan dengan dosis tinggi (3,5ml/hari) pada tikus betina adalah aman (Damiana *et al.*, 2014).

### 2.5.1 Bibit Kefir



Gambar 2.3 Bibit Kefir (Farnworth, 2005)

Bibit kefir adalah komponen yang terpenting untuk pembuatan kefir (Hui *et al*, 2014). Bibit kefir berbentuk butiran agar-agar yang berukuran sekitar 1-2 mm sampai 3-6 mm, terkadang berdiameter 2-15 mm dengan permukaan yang tidak beraturan, kasar, dan berbelit-belit. Bibit kefir terdiri dari 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> cfu/ml bakteri asam laktat, 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> cfu/ml ragi, dan 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> cfu/ml bakteri asam asetat. Mikrofloral dasar pada kefir terdiri dari bakteri asam laktat seperti lactobacilli (termofilik dan mesofilik), leuconostoc, streptococci (homofermentatif dan heterofermentatif), lactococci dan bakteri asam asetat serta ragi (Sarkar, 2008). Semua disatukan dalam polisakarida larut air yang disebut kefiran yang terdiri dari glukosa dan galaktosa (Sarkar, 2008). Bibit kefir diidentifikasi menjadi heterofermentatif (*Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus parakefir*, dan *Lactobacillus brevis*) dan homofermentatif (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus kefirgranum*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, dan *Lactobacillus casei*) (Sarkar, 2008). Bibit kefir mengandung bakteri asam laktat (44,5%), lactobacilli (28%), dan ragi (35%) (Sarkar, 2008).

Bibit kefir terdiri dari 4,4% lemak, 45,7% mukopolisakarida, 12,1% abu, 34,3% protein total (1,6% larut air, 27% tidak larut air, dan 5,6% asam amino bebas), vitamin B, vitamin K, triptofan, kalsium, fosfat, dan magnesium (Rosa, 2014). Polisakarida yang terkandung pada bibit kefir besar sekitar 0,2-0,7% dan memberikan sedikit tekstur bertali pada akhir produksi (Hui *et al.*, 2014).

### 2.5.2 Kandungan Kefir

Komposisi gizi pada kefir bervariasi dan dipengaruhi oleh konsentrasi lipid pada susu, asal bibit kefir yang digunakan, waktu atau suhu fermentasi, dan kondisi penyimpanannya. Kefir susu mengandung laktat, formic, propionate, asam suksinat, CO<sub>2</sub>, etanol, aldehyd, aseton dan isoamil alkohol, dan berbagai folat. pH kefir bervariasi antara 4,2-4,6, kadar etanol antara 0,5–2%, asam laktat antara 0,8-1%, dan CO<sub>2</sub> antara 0,08-0,2% (Rosa, 2014).

Selama fermentasi, laktosa pada susu terdegradasi menjadi asam yang menyebabkan pengurangan pH dan peningkatan konsisten karena sekitar 30% dari laktosa dari susu dihidrolisis oleh enzim  $\beta$ -galaktosidase yang akan mengubah laktosa menjadi glukosa dan galaktosa. Glukosa akan diubah oleh bakteri asam laktat pada kefir menjadi asam laktat. Kadar amonia, serin, lisin, alanin, triptofan, valin, metionin, fenilalanin, treonin, dan isoleusin lebih tinggi pada kefir susu dibandingkan dengan susu yang tidak difermentasi (Rosa, 2014).

Kandungan lemak (mono-, di-, tri-gliserida, asam lemak bebas, dan steroid) pada kefir bervariasi tergantung dari jenis susu yang digunakan fermentasi, Kefir merupakan sumber makanan penting dari beberapa mineral dan vitamin, seperti mineral, kalsium, fosfor, kalium, magnesium, seng, tembaga, mangan, besi, kobalt,

dan molibdenum, sedangkan selama fermentasi mengandung piridoksin, vitamin B12, asam folat, biotin thiamin, dan peningkatan kadar riboflavin (Rosa, 2014).

**Tabel 2.2 Hasil Pengukuran TPC dan Protein pada Kefir Susu Sapi**

	Hari ke-1	Hari ke-5
<b>TPC</b>	3,8 x 10 <sup>7</sup> kol/gr	2,6 x 10 <sup>7</sup> kol/gr
<b>Protein</b>	4,88%	4,91%

Sumber: Balai Penelitian dan Konsultasi Industri Laboratorium, 2017

### 2.5.3 Manfaat Kefir

Manfaat susu kefir mempunyai manfaat dalam kesehatan tubuh seperti anti kanker, hipokolesterolemik, anti hipertensi, antioksidan, anti inflamasi, imunomodulator, dan anti mikroba (Rosa, 2014). Pada ibu hamil kefir susu sapi juga bermanfaat yaitu dapat meningkatkan penyerapan nutrisi, meningkatkan kekebalan tubuh, membantu tubuh untuk adaptasi dengan perubahan hormon dan mencegah infeksi. Selain itu kefir pada ibu hamil juga dapat mencegah pertumbuhan bakteri beta streptococcus yang berlebih yaitu bakteri yang dapat menginfeksi seperti sepsis, meningitis, dan pneumonia (John *et al.*, 2015).

#### 1. Kefir sebagai Anti Mikroba

Kefir dapat melawan *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *Shigella flexneri*, dan *Y. enterocolitica*. Kefir memiliki aktivitas antimikroba dikaitkan dengan produksi asam organik, peptida, karbon dioksida, hydrogen peroksida, etanol, dan diasetil (Leite, 2013).

## 2. Kefir dapat Menurunkan Kolesterol

Bakteri asam laktat menghambat penyerapan kolesterol eksogen di usus karena sel bakteri akan mengikat dan menggabungkan dengan kolesterol. Tingginya jumlah bakteri asam laktat pada kefir menunjukkan dapat menurunkan kolesterol hingga 33% (Rosa, 2014).

## 3. Kefir sebagai Immunomodulator

Kefir dalam tubuh sangat efektif menghancurkan patogen yang berbahaya, termasuk bakteri dan virus. Kefir juga dapat menghancurkan tumor dan melawan sel kanker (Gaware *et al.*, 2011).

## 4. Kefir sebagai Melindungi *Gastrointestinal Tract* (GIT)

Konsumsi kefir dapat meningkatkan jumlah bakteri asam laktat pada mukosa usus yang akan menyebabkan pengurangan populasi enterobakteria dan clostridia. Kefir juga efektif dalam perawatan pasca operasi pada pasien gangguan gastrointestinal (Leite, 2013).

## 5. Kefir sebagai Anti Hipertensi

Kefir dapat menghasilkan penurunan tekanan darah karena adanya penghambatan aktivitas enzim pengubah angiotensin (ACE) oleh peptida pada kefir (Rosa, 2014).

### 2.5.4 Kefir sebagai Antioksidan

Aktivitas antioksidan pada kefir masih belum jelas, diketahuinya efek merugikan dari *Reactive Oxygen Species* (ROS) pada *in vivo* kontrol oleh mekanisme antioksidan spektrum luas. Guven *et al* (2003) menjelaskan bahwa kefir memiliki antioksidan yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan vitamin E

dalam mencegah kerusakan oksidatif (Guven *et al.*, 2003). Kefir memiliki aktifitas antioksidan yang ditunjukkan dalam penelitian yang dilakukan oleh Liu dkk (2005) melalui tes DPPH untuk mengikat radikal bebas yaitu susu kefir memiliki kemampuan substansi donor proton yang lebih tinggi dibandingkan dengan susu biasa sehingga kefir dapat menjadi perlindungan untuk melawan proton radikal bebas dimana penangkapan proton radikal bebas merupakan mekanisme penting antioksidan. Efek penangkapan superoksida pada kefir merupakan cara kerja kefir sebagai antioksidan. Kefir susu memiliki kemampuan untuk membersihkan radikal superoksida lebih tinggi dibandingkan susu tanpa kefir. Kefir juga memiliki aktifitas antioksidan yang tinggi dengan menghambat peroksidasi lemak yang kemungkinan dapat disebabkan oleh kontribusi dari komponen sel dari mikroorganisme bibit kefir dan peptida yang dihasilkan oleh fermentasi kefir susu sapi (Liu *et al.*, 2005).

Pada proses fermentasi kefir juga menghasilkan asam laktat yang membuat kefir bersifat sinergis dengan memberikan ion H<sup>+</sup> pada radikal bebas sehingga akan meningkatkan jumlah aktivitas antioksidan primer. Aktivitas sinergesis dapat sebagai donor hidrogen pada radikal bebas sehingga dapat meregenerasi antioksidan primer dan meningkatkan kestabilan antioksidan (Pratimasari, 2009). Bakteri *Lactococcus spp* di dalam kefir mampu mengaktivasi enzim antioksidan superoksida dismutase (SOD) mempunyai pengaruh positif terhadap anion superoksida (Kesenkes *et al.*, 2011).

## 2.6 Tikus

Hewan percobaan adalah hewan yang sengaja untuk dipelihara dan ditenakkan yang digunakan untuk sebagai hewan model berfungsi mempelajari dan mengembangkan berbagai macam bidang ilmu dalam skala penelitian atau

pengamatan laboratorium (Malole dan Pramono, 1989). Tikus putih (*Rattus norvegicus*) merupakan salah satu hewan percobaan yang sering dipakai penelitian. Temperatur dan kelembapan merupakan salah satu faktor untuk kelangsungan hidup tikus putih. Temperatur yang cocok untuk tikus putih yaitu 19-23°C dan kelembapan pada tikus putih yaitu 40-70% (Wolfenson dan Lloyd, 2013).

Masa hidup tikus putih yang berada di laboratorium berdasarkan keturunannya dan asupannya. Masa hidup maksimal dari keturunan Wistar yaitu tikus jantan sekitar 1200 hari (3,2 tahun) dan tikus betina 1400 hari (3,8 tahun). Masa hidup tengah tikus putih di laboratorium yaitu tikus jantan 850 hari dan tikus betina 900 hari (Hubrecht dan James, 2010). Masa dewasa pada kelamin tikus dimulai pada usia 50-60 hari yaitu vagina mulai terbuka pada usia 35-90 hari dan testis turun/keluar pada usia 20-50 hari (Malole dan Pramono, 1989).

Sifat reproduksi tikus sama dengan mamalia besar yang memiliki interval generasi yang pendek dan berukuran kecil sehingga memudahkan dalam pemeliharaan serta efisien dalam pemberian makanan tikus (10 gram/100 gramBB). Berat badan tikus betina dewasa sekitar 250-300 gram, sedangkan berat badan tikus jantan dewasa sekitar 450-520 gram (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Lama kehamilan pada tikus betina selama 21-23 hari (Russel *et al.*, 2008). Tikus memiliki jumlah anak sekitar 6-12 ekor per kelahiran dengan berat lahir sekitar 5-6 gram. Usia kematangan seksual pada tikus yaitu di usia 2-3 bulan (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

### **2.6.1 Sistem Reproduksi Tikus Betina**

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina memiliki waktu kawin pada siklus estrus. Siklus estrus adalah suatu kegiatan fisiologik pada tikus betina memiliki ciri khusus yang ditandai dengan keinginan untuk kawin yang berlangsung selama 4-

5 hari dan segera sesudah beranak (*post partum* estrus). Cara mengetahui tahapan siklus estrus dilakukan ulas vagina atau papsmear. Berdasarkan histologi vagina, siklus estrus dibagi menjadi empat fase yaitu fase proestrus, fase estrus, fase metestrus, dan fase diestrus (Samsuria, 2009).

Fase proestrus (fase persiapan) adalah fase yang mengawali estrus dan berlangsung selama 12 jam. Fase ini terjadi involusi fungsional corpus luteum serta pembengkakan pada praovulasi folikel. Folikel ovary yang matur akan meningkat sekresi estrogen di dalam darah yang akan menyebabkan peningkatan pertumbuhan uterus dan frekuensi mitosis endometrium selama fase folikuler. Gambaran epitel vagina didominasi oleh sel-sel epitel berinti yang muncul secara tunggal atau berbentuk lapisan (Hayatin, 2007).

Fase estrus adalah periode birahi dan keinginan untuk kopulasi (betina bersedia kawin dengan tikus jantan) dimungkinkan hanya pada fase ini. Setiap siklus berlangsung selama 12 jam dan estrus dimulai pada malam hari. Kondisi ini berakhir 9 sampai 15 jam dipengaruhi oleh FSH. Fase ini folikel ovary tumbuh dengan cepat dan terjadi sekresi estrogen yang tinggi. Estrus juga terjadi pada fase folikuler. Uterus mengalami pembesaran progresif dan menjadi bengkak disebabkan akumulasi cairan lumen. Cairan yang menumpuk di dalam uterus menyebabkan uterus menjadi kontraktif. Mukosa vagina mengalami banyak mitosis dalam pembentukan sel-sel baru sehingga penumpukkan sel-sel tersebut pada lapisan permukaan menjadi squamosal dan menanduk. Sel-sel menanduk akan terkelupas ke dalam lumen vagina pada saat pemeriksaan preperat ulas vagina yang dipakai sebagai petunjuk fase estrus. Saat memasuki fase estrus mulai berakhir di dalam lumen vagina terdapat massa seperti keju yang mengandung sel-sel menanduk dengan inti berdegenerasi, tetapi ditemukan

sedikit leukosit. Ovulasi terjadi selama fase estrus dan di dahului oleh perubahan histologik di dalam folikel yang menunjukkan adanya luteinisasi awal. Cairan lumen banyak yang hilang sebelum ovulasi. Jika mengalami kebuntingan, maka siklus terganggu selama masa gestasi (Pardede, 2007).

Fase mestrus adalah fase selanjutnya dari fase estrus dan berlangsung selama 6-15 jam yang ditandai dengan tumbuhnya sel-sel granulosa folikel dengan cepat yang dipengaruhi oleh *luteinizing hormone* (LH) dari adenohyphofisa. Fase ini bisa diketahui ditandai dengan dominasi sel-sel tanduk dan leukosit jika dilihat dengan menggunakan metode ulas vagina (Pardede, 2007).

Fase diestrus adalah fase yang paling lama diantara fase-fase siklus estrus lainnya yaitu selama 60-70 jam. Fase ini kontraksi uterus menurun, endometrium menebal, kelenjar-kelenjar mengalami hipertropi, dan mukosa vagina menipis, warna pucat, dan leukosit yang bermigrasi semakin banyak. Fase ini bisa diketahui ditandai jumlah leukosit banyak pada ulas vagina (Hayatin, 2007).

### **2.6.2 Fisiologi Tikus Bunting**

Proses fertilisasi pada tikus terjadi di saluran telur. Fertilisasi dimulai dengan pengikatan spermatozoa diikuti dengan reaksi akrosom dan penetrasi spermatozoa melalui *zona pellucida*, kemudian spermatozoa menyatu dengan sel telur. Migrasi sperma melalui saluran telur tikus tergantung pada estradiol dan progesteron. Setelah pembuahan, embrio sel tunggal (zigot) mengalami proses mitosis berkembang menjadi dua sel dan empat sel pada hari pertama, kemudian berkembang menjadi delapan sel pada hari kedua, dan menjadi 16 sel pada hari ketiga setelah pembuahan. Embrio berkembang menjadi ke tahap morula pada hari keempat. Pada proses mitosis menghasilkan bentuk blastokista pada hari kelima kebuntingan. Blastokista terdiri dari lapisan sel trofektoderm (membentuk

plasenta) dan massa sel dalam (membentuk embrio). Blastokista dapat berfungsi untuk implantasi setelah keluar dari *zona pellucida* (Hamid and Zakaria, 2013).

Pada proses implantasi terjadi selama 6 jam dengan tiga tahap yaitu *apposition*, *adhesion*, dan *invasion*. Embrio masuk ke dalam rahim segera menempel pada epitelium uterus. Setelah keluar dari *zona pellucida* terjadi penutupan lumen uterus sehingga membawa blastokista menempel ke epitelium luminal. Blastokista menempel pada sisi anti mesometrial endometrium dan massa sel bagian mengarah ke sisi mesometrium. Sel-sel epitel yang bersentuhan dengan blastokista mengalami apoptosis dan difagosit oleh sel-sel polytene (sel-sel dari dinding blastokista) untuk memfasilitasi penetrasi pada epitelium. Penetrasi pada tikus terjadi ketika sel-sel trofoblas menggantikan epitelium uterus yang mendasari dan menembus lamina basal epitel dan stroma. Trofoblas berpindah ke stroma endometrium dan menembus pembuluh endometrium superfisial (Hamid and Zakaria, 2013).

Setelah trofoblas menembus stroma endometrium, sel-sel stroma mengalami perbedaan yang luas untuk membentuk desidua. Pada tikus desidualisasi membutuhkan estrogen dan progesterone sehingga mempengaruhi endometrium melalui reseptor estrogen dan reseptor progesterone. Tanda pertama terjadinya implantasi adalah peningkatan permeabilitas pada pembuluh darah uterus di lokasi apposes blastokista. Peningkatan permeabilitas pada pembuluh darah bertepatan dengan reaksi perlekatan antara blastokista dengan epitel uterus. Implantasi pada tikus dimulai pada hari ke 5 dan selesai pada hari ke 7 kebuntingan. Plasent pada tikus bersifat discoid (jaringan janin dan ibu menempel pada daerah sirkuler) dan hemokorial (trofoblas janin mengincasi

pembuluh maternal dan kontak langsung dengan darah ibu). Kehamilan tikus berlangsung selama 21-23 hari kebuntingan (Hamid and Zakaria, 2013).

### 2.6.2 Fisiologi Hemoglobin pada Tikus Bunting Normal

Kadar hemoglobin pada tikus bunting dengan usia kehamilan hari ke-7 yaitu 15,2 g/dL. Hal ini disebabkan terjadinya hemodilusi pada tikus. Hemodilusi terjadi pada pertengahan organogenesis. Kemudian terjadi peningkatan volume plasma pada trimester ke-2 sehingga terjadi penurunan yang progresif dalam konsentrasi hemoglobin yang terjadi sampai sekitar usia kehamilan 20 hari pada tikus bunting yaitu 12,0 g/dL (Urasoko *et al.*, 2009). Kadar hemoglobin pada tikus bunting usia kehamilan 18-19 hari yaitu dengan interval 12-14,3 g/dL dengan rata-rata 12,9 g/dL (Teresa *et al.*, 2004).

**Tabel 2.3 Kadar Normal Hemoglobin pada Tikus Tidak Bunting dan Tikus Bunting (Urasoko *et al.*, 2009)**

	Rata-Rata Kadar Hemoglobin(g/dL)
Tidak bunting	16,0
Kebuntingan hari ke-7	15,2
Kebuntingan hari ke-13	13,6
Kebuntingan hari ke-17	13,4
Kebuntingan hari ke-20	12,0

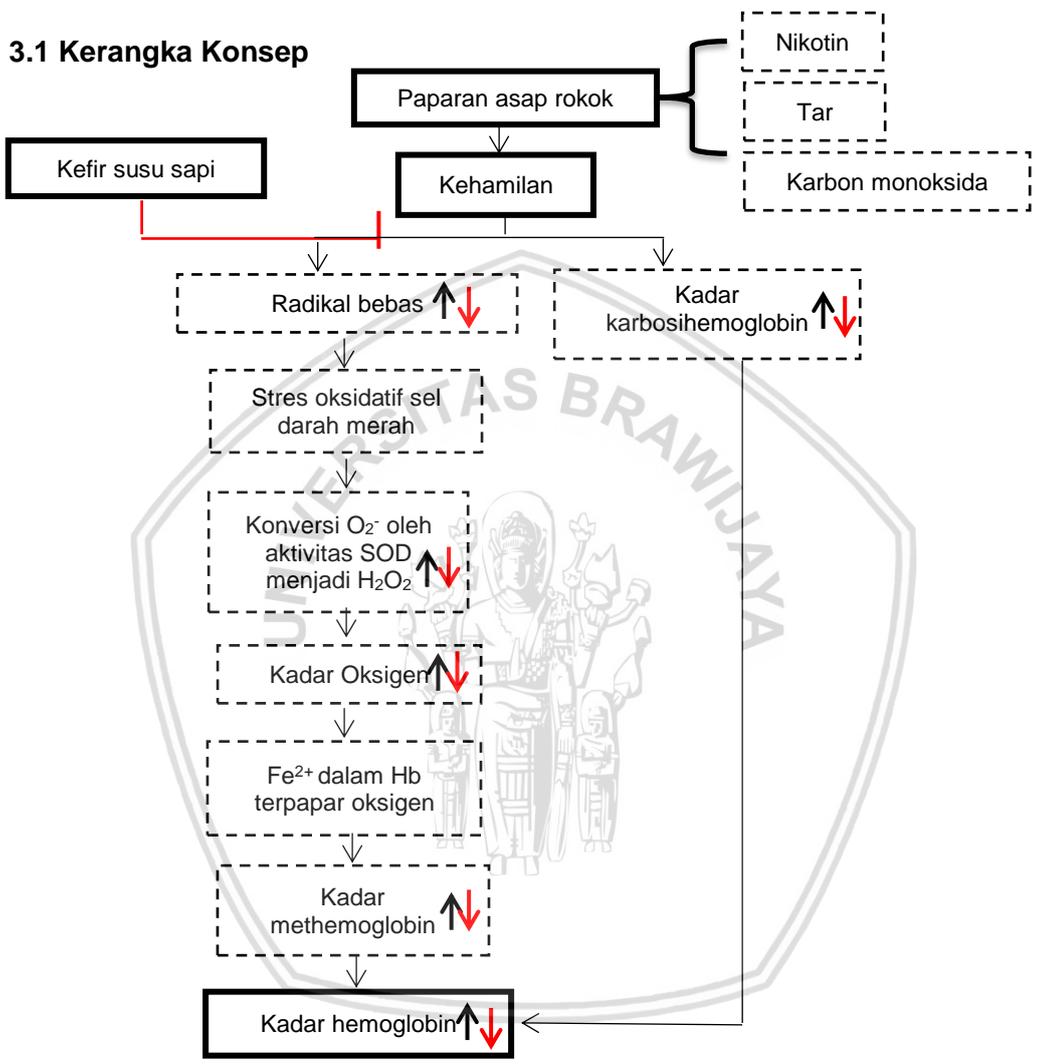
Keterangan:

1. Kebuntingan hari ke-7 : Periode implantasi.
2. Kebuntingan hari ke-13 dan ke-17 : Periode organogenesis
3. Kebuntingan hari ke-20 : Mendekati Waktu Persalinan

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan:

- : Variabel yang diukur dalam penelitian
- : Menyebabkan
- ↑ : Hasil mekanisme stres oksidatif
- | (red line) : Menghambat
- ↓ : Hasil penghambatan oleh kefir
- { : Kandungan



Penjelasan Kerangka Konsep:

Asap rokok mengandung komponen yang berbahaya yang mengakibatkan terjadinya peningkatan beban oksidan, menurunkan perlindungan oksidan, dan menghasilkan ROS (Halliwell et.all, 2006). Beberapa komponen yang larut dalam air dari *Aqueous Cigarette Tar (ACT)* dapat menghasilkan anion superoksida ( $O_2\bullet$ ), hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), dan radikal hidroksil reaktif ( $HO\bullet$ ), yang menyebabkan kerusakan oksidatif pada lipida membran sel, protein, enzim, dan DNA. Ketidakseimbangannya oksidan dan antioksidan yang didalam tubuh akan menyebabkan stres oksidatif.

Karbon monoksida akan berikatan dengan hemoglobin dengan oksigen sehingga menghasilkan karboksihemoglobin yaitu bentuk tidak aktif dari hemoglobin yang tidak memiliki kapasitas untuk membawa oksigen akan menyebabkan penurunan kemampuan hemoglobin dan gangguan pengiriman oksigen ke jaringan. Untuk mengimbangi menurunnya kemampuan mengirimkan oksigen sehingga tubuh merespon mempertahankan banyaknya kadar hemoglobin. CO juga menyebabkan peroksidasi lipid dan produksi radikal oksigen bebas.

Radikal anion superoksida dismutase oleh Superoksida Dismutase (SOD) akan menjadi hidroksi peroksida. ROS akan dinetralkan oleh sistem oksidan sitosol yaitu hidrogen peroksida masuk ke dalam sel darah merah yang cepat beraksi dengan katalase yang dapat menghasilkan oksigen tanpa proses oksidasi pada hemoglobin sehingga menghasilkan kadar oksigen tinggi. Untuk mengimbangi menurunnya kemampuan mengirimkan oksigen sehingga tubuh merespon mempertahankan banyaknya kadar hemoglobin.

Radikal anion superoksida yang berikatan dengan *ferric* ( $\text{Fe}^{3+}$ ) pada hemoglobin menghasilkan oksigen dan *ferrous* ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Jika  $\text{Fe}^{2+}$  terpapar oksigen yang tinggi secara terus menerus akan mengalami oksidasi yang lambat sehingga menghasilkan methemoglobin. Methemoglobin adalah hemoglobin yang terlalu kuat mengikat oksigen sehingga hemoglobin sulit melepaskan oksigen ke jaringan tubuh. Dalam kondisi normal kadar methemoglobin lebih rendah 1% daripada total hemoglobin, tetapi jika mengalami stres oksidatif maka kadar methemoglobin semakin tinggi. Pada proses ini menghasilkan oksigen yang tinggi tetapi hemoglobin terlalu kuat mengikat oksigen, sehingga tubuh merespon untuk meningkatkan kadar hemoglobin untuk memenuhi pengangkutan oksigen ke seluruh tubuh.

Kefir susu sapi kaya akan antioksidan dan mengandung banyak nutrisi seperti magnesium, kalsium, asam amino, dan berbagai vitamin. Kefir memiliki aktifitas antioksidan dengan cara substansi donor proton untuk penangkapan proton radikal bebas merupakan mekanisme penting antioksidan. Diketahui bahwa terdapat kandungan kefir yaitu peptida bioaktif yang dilepaskan selama fermentasi oleh bakteri asam laktat proteolitik dapat menangkap ROS (Punaro *et al.*, 2014). Efek pencarian superoksida pada kefir merupakan cara kerja kefir sebagai antioksidan. Pada proses fermentasi kefir juga menghasilkan asam laktat yang membuat kefir bersifat sinergis dengan memberikan ion  $\text{H}^+$  pada radikal bebas sehingga akan meningkatkan jumlah aktivitas antioksidan primer. Aktivitas sinergesis dapat sebagai donor hidrogen pada radikal bebas sehingga dapat meregenerasi antioksidan primer dan meningkatkan kestabilan antioksidan.

Kefir susu sapi sebagai kuratif diharapkan antioksidan pada kefir yaitu dengan cara penangkapan radikal bebas oleh peptida bioaktif pada kefir susu sapi

sehingga mengurangi terjadinya pengikatan karbon monoksida dengan hemoglobin dan stres oksidatif sehingga mencegah kenaikan kadar hemoglobin sehingga kadar hemoglobin masih dalam kadar normal.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Pemberian kefir susu sapi dapat mencegah terjadinya peningkatan kadar hemoglobin pada tikus (*Rattus norvegicus*) bunting yang diberi paparan asap rokok.



## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimen laboratorium dengan rancangan penelitian *Randomized Post Test only Control Grup design*. Penelitian hanya dilakukan pada sesudah perlakuan (*post test*) dengan membandingkan kadar hemoglobin antar kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

#### 4.2 Populasi dan Subyek Penelitian

Jumlah pengulangan ( $n$ ) pada setiap perlakuan ( $p$ ) dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Notoadmodjo, 2010):

$$p(n - 1) \geq 15$$

$p$  = jumlah perlakuan;  $n$  = jumlah ulangan tiap perlakuan

Pada penelitian ini  $p = 5$  sehingga jumlah pengulangan adalah

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20, n \geq 4$$

Jumlah sampel yang diperlukan untuk setiap perlakuan adalah 4 ekor tikus. Selain itu, untuk mengantisipasi apabila ada tikus yang mati saat masa adaptasi dan perlakuan, maka setiap perlakuan diberikan penambahan 1 ekor tikus sebagai cadangan, sehingga total sampel yang dibutuhkan  $5 \times 5 = 25$  ekor tikus.

#### 4.2.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus betina bunting.
- b. Berat badan tikus: 130-160 gram.
- c. Umur tikus: minimal 8 minggu.
- d. Sehat ditandai dengan pergerakan yang aktif, mata jernih, dan bulu yang tebal berwarna putih, bersih, dan tidak rontok (Lovita, 2013).

#### 4.2.2 Kriteria Eksklusi

Tikus dengan kondisi menurun atau mati selama penelitian berlangsung (Lovita, 2013).

#### 4.2.3 Pembagian Kelompok Hewan Coba

Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok, 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan yang masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus dengan rincian sebagai berikut (Fahmy and Ismail, 2015):

1. Kelompok kontrol negatif: tidak diberi kefir susu sapi dan tanpa dipapar asap.
2. Kelompok kontrol positif: tidak diberi kefir susu sapi dan dipapar asap rokok.
3. Kelompok Perlakuan 1: diberi kefir susu sapi dosis 2,5 ml/kgBB/hari dan dipapar asap rokok.
4. Kelompok Perlakuan 2: diberi kefir susu sapi dosis 5 ml/kgBB/hari dan dipapar asap rokok.
5. Kelompok Perlakuan 3: diberi kefir susu sapi dosis 10 ml/kgBB/hari dan dipapar asap rokok.

#### **4.2.4 Prosedur dan Teknik Pengambilan Sampel**

Dalam menentukan subyek penelitian, peneliti menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang digunakan sebagai pengelompokan dan pemberian perlakuan dengan teknik randomisasi. Dikarenakan hewan coba, bahan pakan, dan bahan penelitian homogen, maka metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dianggap cocok sebagai teknik randomisasi pada penelitian ini. Setiap hewan coba memiliki peluang yang sama untuk berkesempatan sebagai sampel pada kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol.

#### **4.3 Variabel Penelitian**

##### **4.3.1 Variabel Bebas**

- a. Pemaparan asap rokok.
- b. Pemberian kefir susu sapi dalam 3 dosis yang berbeda.

##### **4.3.2 Variabel Tergantung**

Kadar hemoglobin darah induk tikus putih.

#### **4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### **4.4.1 Lokasi**

Pemeliharaan dan perlakuan pada tikus di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Analisa kadar hemoglobin pada darah tikus dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

##### **4.4.2 Waktu Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan September 2017- Januari 2018

## 4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

### 4.5.1 Bahan Penelitian

1. Hewan coba yang digunakan tikus *Rattus norvegicus* bunting sejumlah 25 ekor.
2. Bahan pemeliharaan hewan coba dengan pemberian makanan hewan coba adalah makanan pakan standart yang terdiri dari *Comfeed PARS Boiler* (BR1), terigu dan air, dan minuman hewan coba dengan air dari keran (Lovita, 2013).
3. Bahan perlakuan hewan coba
  - a. Asap rokok yang dipaparkan berasal dari rokok kretek (Lovita, 2013).
  - b. Kefir susu sapi yang tersedia di pasaran kota Malang.
4. Bahan untuk pemeriksaan kadar hemoglobin menggunakan serum darah dari masing-masing induk tikus dan uji reagen (Lovita, 2013).

### 4.5.2 Alat Penelitian

- a. Alat pemeliharaan hewan coba menggunakan kandang tikus yang berupa kotak plastik berukuran 31,5 x 23 x 9 cm sebanyak 25 buah, tutup kandang yang terbuat dari kayu dilapisi kawat, sekam, botol air, dan rak tempat meletakkan kandang. Masing-masing kandang ditempati 1 ekor tikus bunting (Gamagita, 2016).
- b. Alat penimbangan berat badan hewan coba menggunakan neraca analitik
- c. Alat pembuatan makanan hewan coba menggunakan baskom plastik, timbangan, pengaduk, *handscone*, dan gelas ukur.
- d. Alat untuk pemberian kefir susu sapi pada hewan coba menggunakan sonde yang dapat dimasukkan ke dalam mulut sampai lambung tikus dan spuid 3 ml.

- e. Alat yang digunakan untuk pemaparan asap rokok pada hewan coba adalah smoking pump buatan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Alat ini berupa sebuah kotak yang terbuat dari *fiberglass*, yang terdiri dari tiga ruangan yang masing-masing berukuran 26 x 12 x 12 cm<sup>2</sup>. Pada setiap ruangan terdapat pipa sebagai pengalih asap rokok. Ketiga pipa keluar menyatu dengan pipa yang dipasang rokok. Selain itu, terdapat pula pompa yang berfungsi sebagai penghisap rokok yang kerjanya dibantu dengan adanya adaptor. Selanjutnya terdapat dua klep yang dapat membuka dan menutup secara otomatis saat penghisapan dan penutupan asap rokok yang keluar masuk kotak (Widodo, 2002).
- f. Alat untuk pembedahan, pengambilan darah tikus, plasenta dan bayi tikus antara lain : kapas, scalpel, gunting, pinset, jarum pentul, alas kayu, dan *handscoon*.
- g. Alat untuk mengukur kadar hemoglobin yaitu alat untuk pengambilan dan penyimpanan sampel darah dengan *sput disposable* 3 ml dan tabung hampa udara (*vacutainer tube*) berisi EDTA 2 ml dan alat untuk pemeriksaan kadar hemoglobin adalah ABX micros 60 (*Hematology Analyzer*).

#### 4.6 Definisi Operasional

1. Hewan coba adalah tikus betina spesies *Rattus norvegicus*, usia minimal 8 minggu, berat 130-160 gram, dan sedang bunting.
2. Tikus bunting adalah tikus betina yang telah dikawinkan dengan tikus jantan dan terdapat tanda-tanda kebuntingan yaitu terdapat sumbat vagina (*vaginal plaque*) (Malole dan Pramono, 1989). Pada tikus bunting, fetus

dapat dipalpasi pada hari ke-10 kebuntingan, tetapi palpasi akan lebih akurat dilakukan pada hari ke-12 kebuntingan (Suckow *et al.*, 2006). Usia kebuntingan dihitung sebagai hari ke-1 pada saat muncul sumbat vagina sampai hari ke-18 (Samsuria, 2009).

- c. Kefir susu sapi yang digunakan adalah kefir susu sapi tersedia di pasaran kota Malang. Kandungan protein kefir susu sapi yang digunakan 8,54% sebagai antioksidan. Penggunaan kefir susu sapi tersebut diganti setiap tiga hari sekali karena adanya perbedaan kandungan jumlah total bakteri pada hari ke-5 (Balai Penelitian dan Konsultasi Industri Laboratorium, 2017). Kefir susu sapi di simpan ke dalam lemari es dan tanpa di sentrifugasi terlebih dahulu. Kefir susu sapi disedot dengan menggunakan *sprit* dan diberikan peroral menggunakan sonde pada kelompok tikus hail yang berbeda dengan dosis 2,5, 5, dan 10 ml/kgBB/hari selama 15 hari dimulai dari hari ke-5 sampai hari ke-18 kebuntingan. Kefir diberikan sebelum dilakukan paparan asap rokok (Gamagita, 2016).
- d. Paparan asap rokok akan dilakukan setelah pemberian kefir susu sapi selama 14 hari yang dimulai pada hari ke-5 sampai hari ke-18 kebuntingan yang dipaparkan menggunakan peralatan *smoking pump* buatan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Paparan asap rokok diberikan satu batang perhari (Gamagita, 2016).
- e. Kadar hemoglobin adalah kadar hemoglobin dalam darah tikus yang diambil dari jantung tikus sebanyak 2 ml pada hari ke-19 atau saat melahirkan dan diukur dengan menggunakan alat ABX Micros 60 (*Hematology Analyzer*).

## 4.7 Prosedur Penelitian

### 4.7.1 Aklimatisasi Hewan Coba

Aklimatisasi hewan coba dilakukan selama tujuh hari terhadap makanan dan suhu di dalam laboratorium (Gamagita, 2016).

### 4.7.2 Prosedur Penghamilan Hewan Coba

Waktu kawin tikus dilakukan pada fase estrus (birahi) yang ditandai dengan telinga bergerak-gerak saat kepala atau punggung dibelai, sikap lordosis ketika punggung di stimulasi, penerimaan pejantan oleh hewan betina untuk kopulasi, dinding vagina yang terlihat kering serta vulva yang bengkak. Fase ini berlangsung kira-kira 9-15 jam dan biasanya lebih sering terjadi pada malam hari daripada siang hari (Suckow *et al.*, 2006). Jika telah timbul tanda estrus, maka tikus betina dikawinkan dengan tikus jantan. Pengawinan dilakukan dengan mencampurkan hewan jantan dan betina dengan perbandingan 1:1. Tikus jantan dimasukkan ke kandang tikus betina di mana sekam pada kandang betina dibersihkan agar memudahkan mengamati *vaginal plaque*. Keesokkan harinya dilakukan pengecekan, apabila ditemukan *vaginal plaque*, maka hari tersebut dihitung sebagai hari pertama kebuntingan. Tikus yang telah hamil diberi label (*permanent board marker*) pada ekor kemudian dimasukkan ke dalam kelompok yang telah ditentukan dan selanjutnya akan mendapat perlakuan, sedangkan yang belum hamil dicampur kembali dengan tikus jantan dengan menggunakan perbandingan satu jantan dan satu betina (1:1) (Samsuria, 2009).

### 4.7.3 Penentuan Dosis Kefir Susu Sapi

Dosis kefir susu sapi untuk *Rattus norvegicus* adalah 5 ml/kgBB/hari, sehingga dosis perlakuan dibuat menjadi tiga yaitu 2,5 ml/kgBB/hari, 5

ml/kgBB/hari, dan 10 ml/kgBB/hari (Fahmy and Ismail, 2015). Penghitungan kebutuhan kefir susu sapi berdasarkan berat badan tikus adalah sebagai berikut:

Dosis 1:

Berat badan tikus = 150 gram

Dosis kefir susu sapi = 2,5 ml/kgBB/hari

Kebutuhan kefir susu sapi tikus =  $2,5 \times 0,15$  ml/hari  
= 0,375 ml

Dosis 2:

Berat badan tikus = 150 gram

Dosis kefir susu sapi = 5 ml/kgBB/hari

Kebutuhan kefir susu sapi tikus =  $5 \times 0,15$  ml  
= 0,75 ml

Dosis 3:

Berat badan tikus = 150 gram

Dosis kefir susu sapi = 10 ml/kgBB/hari

Kebutuhan kefir susu sapi tikus =  $10 \times 0,15$  ml  
= 1,5 ml

#### 4.7.4 Prosedur Pemeliharaan Hewan Coba

Hewan coba dipelihara dan diadaptasikan dalam laboratorium selama satu minggu dengan temperatur ruangan konstan. Untuk tempat pemeliharaan digunakan kotak plastik berukuran 31,5 x 23 x 9 cm, masing-masing untuk 1 ekor tikus, ditutup dengan kawat kasa dan diberi alas sekam yang diganti setiap 3 hari sekali. Porsi makanan tikus adalah 40 gr/hari/ekor (Gamagita, 2016).

#### 4.7.5 Prosedur Pemberian Kefir Susu Sapi pada Hewan Coba

Kefir susu sapi diberikan mulai hari ke-5 sampai hari ke-18 kebuntingan. Kefir susu sapi dimasukkan dalam spuit 3 ml yang telah dipasang sonde, kemudian sonde dimasukkan peroral hingga mencapai lambung. Pemberian kefir susu sapi diberikan sebelum dipapar asap rokok.

#### 4.7.6 Prosedur Pemaparan Asap Rokok pada Hewan Coba

Pemaparan asap rokok dilakukan pada hari ke-5 hingga hari ke-18 kebuntingan. Rokok yang digunakan sebanyak 1 batang rokok kretek dengan paparan selama 7,5 menit untuk 3 ekor tikus dalam satu kali pemaparan. Prosedur pemaparan asap rokok pada tikus adalah sebagai berikut (standar pemaparan asap rokok Laboratorim Farmakologi FK UB):

- a. Tikus ditimbang berat badannya dengan neraca analitik sebelum dipapar asap rokok.
- b. Tempat pemaparan dibersihkan dari kotoran dan sisa asap.
- c. Nikotin yang melekat di *smoking pump* dibersihkan terlebih dahulu.
- d. Power dan *self voltage* diperiksa.
- e. Rokok dipasang pada pipa sampai batas merah.
- f. Tiga ekor dimasukkan ke dalam kotak dan segera ditutup, karena pada *smoking pump* hanya terdapat tiga ruangan.
- g. Setiap pemaparan asap rokok dilakukan dengan menjalankan pompa selama 7,5 menit untuk 1 batang rokok, kemudian alat dimatikan, tutup dibuka, dan selanjutnya tikus segera dipindahkan ke kandang semua.
- h. Setiap pemaparan berikutnya kotak selalu dibersihkan dahulu dari sisa asap rokok perlakuan sebelumnya.
- i. Pompa tetap dijalankan tanpa rokok untuk mengeluarkan sisa asap.

- j. Tahap-tahap di atas diulangi untuk kelompok tikus berikutnya (Gamagita, 2016).

#### 4.7.7 Prosedur Pembedahan dan Pengambilan Kadar Hemoglobin

Pada hari ke-19 setelah diberi perlakuan, tikus dibedah untuk dilakukan pengukuran kadar hemoglobin. Sebelum pembedahan, tikus diterminasi dengan injeksi ketamin 0,1 cc pada pahanya secara IM dan ditunggu sampai tidak bergerak tetapi jantung masih berdenyut (AVMA, 2013). Setelah tikus dipastikan tidak sadar dilakukan pembedahan dan pengambilan sampel dilakukan dengan mengambil serum darahnya dari jantung sebanyak 2 ml dengan menggunakan spuit 3 ml. Kemudian sampel darah tersebut dipindahkan ke dalam tabung *container* berisi EDTA 2 ml kemudian dikirim ke Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk dilakukan pemeriksaan darah lengkap. Selanjutnya bangkai induk dan anak tikus yang sudah tidak digunakan dikubur dengan aman oleh petugas laboratorium.

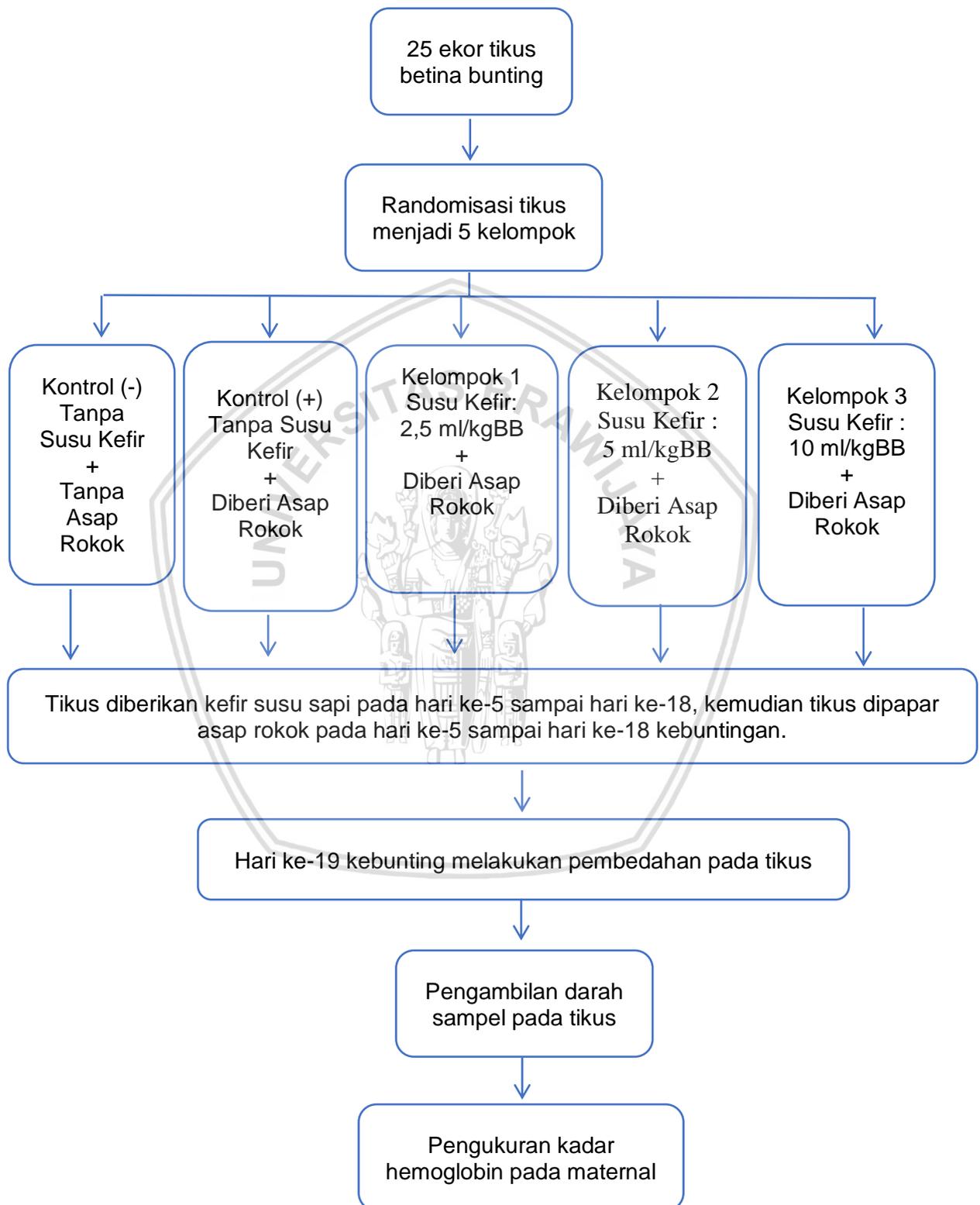
#### 4.7.8 Prosedur Pengukuran Kadar Hemoglobin

Teknik pemeriksaan dan perhitungan kadar hemoglobin, dengan cara mengambil darah sebanyak 2 ml ditambahkan EDTA ditempatkan dalam tabung steril. Sampel darah diperiksa dengan alat ABX Micros 60 (*Hematology Analyzer*) dengan langkah-langkah sebagai berikut (*ABX Micros 60 User Manual*):

1. Prinsip penggunaan alat berdasarkan spesifikasi ukuran sel yang melewati filter dengan memakai tegangan listrik untuk sekali pembacaan bisa diperiksa sekaligus beberapa parameter seperti Hb, Ht, leukosit, trombosit, eritrosit, MCH, MCHC, dan MCV.
2. Cara kerja menggunakan alat ABX Micros 60, dengan menyalakan *switch* utama, terletak di belakang instrumen.

3. Setelah lampu indikator menyala, tekan tombol *start up*, maka secara otomatis alat akan melakukan pembilasan dan melakukan pemeriksaan reagen. Jika lolos maka alat akan menampilkan nilai nol untuk setiap parameter pemeriksaan dan jika tidak, maka secara otomatis alat akan melakukan pembilasan ulang dan pemeriksaan reagen sampai tiga kali sehingga didapatkan angka nol untuk setiap parameter pemeriksaannya.
4. Tekan tombol *start*.
5. Siapkan bahan pemeriksaan (darah EDTA).
6. Tekan tombol *ID*, tekan tombol *enter* tunggu sampai jarum penghisap darah keluar.
7. Tempelkan alat penghisap sampai dasar tabung kemudian tekan *sampel bar* sampai jarum masuk kembali dan melakukan pemeriksaan.
8. Alat akan memproses *sample* selama satu menit dan hasil pemeriksaan akan tampak pada layar.
9. Untuk mematikan alat, tekan *stand by* maka alat akan mencuci selama satu menit, setelah layar padam matikan alat dengan menekan *switch* utama yang terletak di bagian belakang.

#### 4.8 Alur Penelitian



#### 4.9 Analisis Data

Hasil pengukuran kadar hemoglobin pada darah tikus antara kelompok control dan kelompok perlakuan dianalisa secara statistik menggunakan program *SPSS 23.0 for Windows7* dengan tingkat signifikansi sebesar 0,5 ( $p=0,05$ ) dan taraf kepercayaan sebesar 95% ( $\alpha=0,05$ ). Berikut merupakan langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif:

- a. Uji normalitas data menggunakan Uji Shapiro-Wilk: Uji ini bertujuan untuk mengetahui apakah data bersifat normal atau tidak. Data terdistribusi secara normal maka menggunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran pada penyajian data. Untuk uji normalitas, jika sebaran data normal ( $p>0,05$ ) maka menggunakan uji parametrik.
- b. Uji homogenitas varian menggunakan *test of homogeneity of variances*: uji ini bertujuan untuk menguji Anova berlaku atau tidak, yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen atau tidak. Jika varian homogen ( $p>0,05$ ), maka Anova dapat digunakan.
- c. Uji *One Way Anova* (analisa varian satu arah): uji ini berujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui terdapat minimal dua kelompok yang berbeda signifikan.
- d. *Pos Hoc Test* (uji Turkey-HSD) menggunakan *multiple comparisons*: uji ini bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil uji tes Anova. Uji *pos hoc* yang digunakan adalah uji Tukey dengan tingkat kemaknaan 95% ( $p<0,05$ ).
- e. Uji korelasi: uji ini untuk mengukur kekuatan hubungan dua variabel atau lebih yang berskala interval (parametrik) dengan tingkat kemaknaan 95% ( $p<0,05$ ). Jika hasil mendapatkan:

- 1) Sig. (p) > 0,05: tidak ada korelasi antara dua variabel.  
Sig. (p) < 0,05: ada korelasi antara dua variabel.
- 2) Kekuatan korelasi > 0,5: korelasi yang cukup kuat.  
Kekuatan korelasi < 0,5: korelasi yang lemah.
- 3) Arah korelasi positif (+): searah. Semakin besar nilai suatu variabel, semakin besar pula nilai variabel lainnya.  
Arah korelasi negatif (-): berlawanan arah. Semakin besar nilai suatu variabel, semakin kecil nilai variabel lainnya.

f. Uji regresi: uji ini untuk mengidentifikasi kekuatan hubungan antara kefir susu sapi terhadap kadar hemoglobin.

g. Uji *d-Type Effect Size*

*Effect size* merupakan ukuran tentang besarnya efek suatu variable pada variable lain, besarnya hubungan maupun perbedaan, yang bebas dari pengaruh besarnya sampel (Olejnik, 2003). Biasanya variabel yang digunakan yaitu variabel independen (variabel respon) dan variabel dependen (variabel hasil).

Ukuran ini penting karena signifikan statistik tidak dapat memberikan informasi yang cukup berarti mengenai besarnya perbedaan atau korelasi. Signifikan statistik menggambarkan besarnya kemungkinan munculnya statistik dengan nilai tertentu dalam suatu distribusi sehingga jika ingin mendapatkan data yang signifikan maka nilai p yang dimiliki harus kecil sehingga hal ini hanya bisa didapat jika mengujinya menggunakan sampel yang besar (Olejnik, 2000).

Menurut Kain tahun 2007, *d-type effect size* dapat dihitung berdasarkan besarnya perbedaan rata-rata 2 kelompok dibagi dengan standar deviasi kelompok kontrol. *Effect size* mengevaluasi kekuatan dari intervensi yang lebih

baik karena bergantung pada standar deviasi bukan pada jumlah sampel (Kain, 2007).

$$d - \text{type effect size} = \frac{\text{Mean kelompok kontrol} - \text{Mean kelompok perlakuan}}{\text{SD kelompok kontrol}}$$

Hasil pengukuran *d-type effect size* dapat diinterpretasikan sebagai berikut:

± 0.20 : *small*

± 0.50 : *medium*

± 0.80 : *large*

± 1.3 : *very large*



## BAB 5

### HASIL PENELITIAN

#### 5.1 Hasil Penelitian

Hasil hemoglobin dari sampel darah induk tikus pada kelompok kontrol positif, kontrol negatif, dan kelompok perlakuan dengan 3 dosis yang berbeda ditunjukkan pada table 5.1 sebagai berikut:

**Tabel 5.1 Hasil Pengukuran Rata-Rata Kadar Hemoglobin Induk Tikus yang Dipapar Asap Rokok dan Kefir**

Kelompok Perlakuan	Rata-Rata (g/dL)	Standar Deviasi
K+	14.88	1.56589
K-	11.78	2.19591
P1	14.58	1.39893
P2	12.9	0.81854
P3	11.2	1.19373

Keterangan:

K(+) = tidak diberi kefir susu sapi dan dipapar asap rokok.

K(-) = tidak diberi kefir susu sapi dan tanpa dipapar asap rokok.

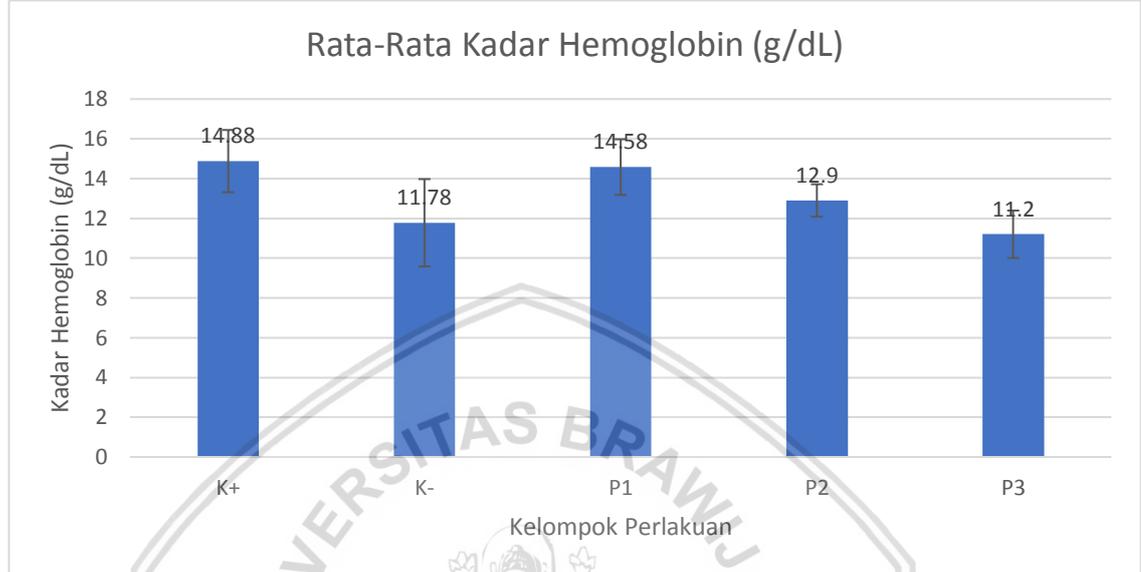
P1 = diberi kefir susu sapi dosis 2,5 ml/kgBB/hari dan dipapar asap rokok.

P2 = diberi kefir susu sapi dosis 5 ml/kgBB/hari dan dipapar asap rokok.

P3 = diberi kefir susu sapi dosis 10 ml/kgBB/hari dan dipapar asap rokok.

Pada tabel 5.1 menunjukkan bahwa rata-rata kadar hemoglobin pada kelompok K(+) (14,88 g/dL) lebih tinggi dari kelompok K(-) (11.78 g/dL). Dengan pemberian kefir dengan dosis 2,5 ml/KgBB kadar hemoglobin menurun (14,58 g/dL) tidak berbeda jauh dengan kelompok yang hanya dipapar asap rokok. Pemberian kefir (5 ml/KgBB) kadar hemoglobin juga menurun (12,9 g/dL) dan kadar hemoglobin semakin rendah (11,2 g/dL) dengan pemberian kefir (10 ml/KgBB).

Berikut grafik yang menggambarkan rata-rata kadar hemoglobin induk tikus:



**Gambar 5.1 Grafik Rata-Rata Kadar Hemoglobin pada Induk Tikus yang Dipapar Asap Rokok dan Kefir.**

Keterangan Grafik:

- K(+) = tidak diberi kefir susu sapi dan dipapar asap rokok.
- K(-) = tidak diberi kefir susu sapi dan tanpa dipapar asap rokok.
- P1 = diberi kefir susu sapi dosis 2,5 ml/kgBB/hari dan dipapar asap rokok.
- P2 = diberi kefir susu sapi dosis 5 ml/kgBB/hari dan dipapar asap rokok.
- P3 = diberi kefir susu sapi dosis 10 ml/kgBB/hari dan dipapar asap rokok.

**5.2 Analisis Data**

Pada uji normalitas menggunakan uji Shapiro-Wilk dengan menunjukkan hasil  $p > 0,05$ . Uji homogenitas ragam menggunakan uji Levene statistic mendapatkan hasil  $p = 0,306$  ( $p > 0,05$ ) yang menunjukkan varian data tersebut bersifat homogen. Hasil uji normalitas dan uji homogenitas menunjukkan bahwa syarat untuk uji *one way* ANOVA sudah terpenuhi dan dapat menggunakan uji *one way* ANOVA.

Pada hasil uji *one way* ANOVA menunjukkan bahwa  $p = 0,003$  ( $p > 0,05$ ) yang dapat diartikan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada semua

kelompok perlakuan. Pemberian kefir susu sapi dengan dosis 2,5 ml/kgBB, 5 ml/kgBB, dan 10 ml/kgBB memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap penurunan kadar hemoglobin.

**Tabel 5.2 Hasil Uji Tukey HSD**

<i>p-value</i>	K(-)	K(+)	P1	P2	P3
K(-)		0,029*	0,055	0,764	0,972
K(+)			0,998	0,267	0,008*
P1				0,420	0,015*
P2					0,408
P3					

*p-value*<0,05 adalah bermakna (\*)

Analisa *post hoc test* menggunakan uji Tukey HSD menunjukkan hasil bahwa pada kelompok K(-) dan K(+) memiliki perbedaan yang signifikan atau bermakna ( $p=0,029$ ), kelompok K(+) dan P3 memiliki perbedaan yang signifikan atau bermakna ( $p=0,008$ ), kelompok P1 dan P3 memiliki perbedaan yang signifikan atau bermakna ( $p=0,015$ ).

Pada Uji Korelasi Person mendapatkan hasil yaitu uji Sig. (2-tailed) menunjukkan bahwa nilai sig  $p=0,000$  ( $p<0,05$ ) artinya terdapat hubungan antara kedua variabel. Pada uji Korelasi Pearson menunjukkan bahwa nilai sig  $p=-0,712$  ( $P>0,05$ ) artinya terdapat hubungan yang cukup kuat dan berlawanan arah, sehingga semakin tinggi dosis kefir susu sapi yang diberikan maka semakin rendah kadar hemoglobinnya.

Pengaruh pemberian kefir susu sapi terhadap kadar hemoglobin induk tikus yang telah dipapar asap rokok dinyatakan dengan koefisien determinasi ( $R^2$ ). Menurut hasil uji regresi menunjukkan bahwa nilai  $R^2$  sebesar 0,508 yang artinya pengaruh pemberian kefir susu sapi terhadap perubahan kadar hemoglobin adalah 50,8% sedangkan 49,2% sisanya dipengaruhi oleh faktor-faktor lain diluar pemberian kefir susu sapi.

### 5.3 Analisis *d-Type Effect Size*

**Tabel 5.3 Hasil *D-Type Effect Size* Kadar Hemoglobin antara Kelompok Kontrol Positif dan Perlakuan.**

Kelompok Perlakuan	Mean	SD	<i>Effect size</i>	Keterangan
K (+)	14.88	1.56589	0	
K (-)	11.78	2.19591	1.97970	<i>very large</i>
P1	14.58	1.39893	0.19158	<i>Small</i>
P2	12.9	0,81854	1.26446	<i>very large</i>
P3	11.2	1.19373	2.35010	<i>very large</i>

Keterangan: Kelompok Kontrol Positif sebagai Pembanding

Dari hasil table 5.3 menunjukkan bahwa ada pengaruh sangat besar pada pemberian kefir susu sapi yang telah dipapar asap rokok terhadap kadar hemoglobin pada kelompok P2 dan P3, sedangkan pada kelompok P1 sangat kecil pengaruh pemberian kefir susu sapi yang telah dipapar asap rokok terhadap kadar hemoglobin. Dosis *effect size* yang paling tinggi merupakan dosis yang memiliki efek yang paling besar yang mempengaruhi kadar hemoglobin yaitu dosis kefir susu sapi 10 ml/kgBB (ES = 2,35010). Nilai positif dalam *effect size* memberikan arti bahwa semakin besar dosis kefir susu sapi yang diberikan, maka semakin besar pengaruh terhadap penurunan kadar hemoglobin.

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Pada kehamilan itu sendiri terdapat keadaan fisiologis yang diikuti dengan tingginya kebutuhan metabolisme dan peningkatan kebutuhan oksigen sehingga menyebabkan produksi ROS secara berlebihan (Chelchowska *et al.*, 2011). Asap rokok dapat menginduksi tubuh untuk memproduksi radikal bebas yang bisa menyebabkan terjadinya stres oksidatif ditandai dengan tingginya kadar ROS. Pemberian kefir susu sapi pada tikus bunting dipapar asap rokok yang dimaksudkan untuk mengetahui efek proteksi antioksidan dalam kefir susu sapi terhadap radikal bebas dalam asap rokok.

Penelitian ini dibagi menjadi 5 kelompok sampel dengan pembagian kelompok kontrol dan perlakuan dengan masing-masing kelompok telah diukur. Pada kelompok kontrol positif (+) tikus yang hanya dipapar asap rokok dengan hasil rata-rata kadar hemoglobin 14,88 g/dL. Sedangkan, pada kelompok kontrol negatif (-) tikus yang tidak diberikan kefir susu sapi dan tidak dipapar asap rokok dengan hasil rata-rata kadar hemoglobin 11,78 g/dL. Menurut Teresa *et al.* tahun 2004, kadar normal hemoglobin pada tikus bunting yaitu rata-rata kadar hemoglobin 12,9 g/dL dengan interval 12-14,3 g/dL (Teresa *et al.*, 2004). Hal ini menunjukkan bahwa kadar hemoglobin pada kelompok kontrol yang hanya dipapar asap rokok meningkat melebihi batas kadar normal hemoglobin pada tikus bunting. Kadar hemoglobin pada kontrol positif memiliki perbedaan lebih tinggi secara signifikan  $p=0,029$  ( $p<0,05$ ) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif.

Hal ini terjadi disebabkan karena asap rokok terdapat beberapa kandungan zat kimia yang berbahaya salah satunya yaitu karbon monoksida (CO). CO pada yang terkandung pada asap rokok memiliki afinitas pada hemoglobin sekitar 210 kali lebih kuat daripada afinitas oksigen (Blumenthal I., 2001). Karbon monoksida (CO) akan menghambat transportasi, pengiriman, dan pemanfaatan oksigen. CO mengganggu pengiriman oksigen dengan mengikat hemoglobin dan myoglobin (Roderique *et al.*, 2012).

Karbon monoksida dapat berikatan dengan hemoglobin yang mengakibatkan oksigen terlepas dari hemoglobin sehingga menghasilkan karboksihemoglobin yaitu bentuk tidak aktif dari hemoglobin yang tidak memiliki kapasitas untuk membawa oksigen sehingga menyebabkan penurunan kemampuan hemoglobin dan gangguan pengiriman oksigen ke jaringan. Untuk mengimbangi menurunnya kemampuan mengirimkan oksigen sehingga tubuh merespon mempertahankan banyaknya kadar hemoglobin bertujuan untuk mempertahankan kebutuhan oksigen dalam tubuh tercukupi (Shah *et al.*, 2012). Meningkatnya kadar hemoglobin dalam tubuh mengakibatkan darah menjadi lebih kental dan menurunkan curah jantung (Behrman *et al.*, 2000).

Pada asap rokok terdapat beberapa komponen yang larut dalam air dari *Aqueous Cigarette Tar (ACT)* dapat menghasilkan anion superoksida ( $O_2^\bullet$ ), hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), dan radikal hidroksil reaktif ( $HO^\bullet$ ), yang menyebabkan kerusakan oksidatif pada lipida membran sel, protein, enzim, dan DNA (Valavanidis *et al.*, 2008). Radikal anion superoksida dismutase oleh Superoksida Dismutase (SOD) akan menjadi hidroksi peroksida (Valko *et al.*, 2007). Jika hidrogen peroksida masuk ke dalam sel darah merah maka akan cepat beraksi

dengan katalase yang dapat menghasilkan oksigen tanpa proses oksidasi pada hemoglobin sehingga menghasilkan kadar oksigen tinggi (Mohanty *et al.*, 2014).

Radikal anion superoksida yang berikatan dengan *ferric* ( $\text{Fe}^{3+}$ ) pada hemoglobin menghasilkan oksigen dan *ferrous* ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Jika  $\text{Fe}^{2+}$  terpapar oksigen yang tinggi secara terus menerus akan mengalami oksidasi yang lambat sehingga menghasilkan methemoglobin. Methemoglobin adalah hemoglobin yang terlalu kuat mengikat oksigen sehingga hemoglobin sulit melepaskan oksigen ke jaringan tubuh (Pandey and Rizvi, 2011). Pada proses ini memproduksi oksigen yang tinggi tetapi hemoglobin terlalu kuat mengikat oksigen, sehingga tubuh merespon untuk meningkatkan kadar hemoglobin untuk memenuhi pengangkutan oksigen ke seluruh tubuh (Mohanty *et al.*, 2014). Menurut penelitian Heiss *et al* (2008), hasil penelitiannya menunjukkan bahwa rata-rata hemoglobin pada orang yang terpapar asap rokok lebih tinggi dibandingkan dengan orang yang tidak merokok (Heiss *et al.*, 2008).

Berdasarkan hasil pengukuran kadar hemoglobin pada kelompok kontrol positif menunjukkan bahwa pemaparan asap rokok dimulai kebuntingan hari ke-5 hingga hari ke-18 dapat meningkatkan radikal bebas dalam tubuh tikus bunting tersebut. Radikal bebas yang terdapat di dalam asap rokok yang mengakibatkan menghasilkan ROS yang tinggi merupakan oksidan utama dalam tubuh. Saat ROS tinggi mengakibatkan antioksidan dalam tubuh akan menurun dan terjadi ketidakseimbangan dikarenakan kadar oksidan yang tidak dapat dikompensasi oleh tubuh. Ketidakseimbangan antara kadar oksidan yang berlebih dan penurunan kadar antioksidan maka terjadinya stres oksidatif. Pada keadaan normal, ROS akan ditangani oleh antioksidan dalam tubuh seperti SOD

(*Superoxide Dismutase*), GPx (*Glutathione Peroxidase*), katalase, atau antioksidan dari luar tubuh seperti vitamin C dan vitamin E (Mazzone *et al.*, 2010).

Pemberian kefir susu sapi dosis 2,5 ml/kgBB/hari pada tikus yang dipapar asap rokok menghasilkan kadar hemoglobin 14,58 g/dL. Pada dosis kefir susu sapi 2,5 ml/kgBB/hari kadar hemoglobin menjadi lebih rendah secara statistik yang tidak signifikan ( $p=0,998$ ) ( $p>0,05$ ) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Pada dosis ini masih belum bisa mengembalikan kadar hemoglobin ke kondisi normal (kontrol negatif).

Pemberian kefir susu sapi dosis 5 ml/kgBB/hari pada tikus dipapar asap rokok kadar hemoglobin 12,9 g/dL. Pada dosis kefir susu sapi 5 ml/kgBB/hari menunjukkan kadar hemoglobin lebih rendah secara statistik yang tidak signifikan ( $p=0,267$ ) ( $p>0,05$ ) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Hal ini belum bisa mengembalikan ke kondisi normal (kontrol negatif). Tetapi, menurut penelitian Teresa *et al*/tahun 2004, dosis ini sudah mengembalikan kadar normal hemoglobin tikus bunting yaitu 12,9 g/dL. Pada uji *d-type effect size* dosis kefir susu sapi 5 ml/kgBB/hari menunjukkan bahwa dosis tersebut merupakan dosis yang memiliki pengaruh yang sangat besar dengan nilai (ES=1.26446).

Pemberian kefir susu sapi dengan dosis 10 ml/kgBB/hari pada tikus dipapar asap rokok menghasilkan kadar hemoglobin 11,2 g/dL. Pada dosis kefir susu sapi 10 ml/kgBB/hari menunjukkan rata-rata kadar hemoglobin lebih rendah yang signifikan ( $p=0,008$ ) ( $p<0,05$ ) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Pada uji *d-type effect size* dosis kefir susu sapi 10 ml/kgBB/hari menunjukkan bahwa dosis tersebut merupakan dosis yang memiliki pengaruh yang sangat besar dengan nilai (ES=2.35010). Tetapi, dosis ini menunjukkan bahwa rata-rata kadar hemoglobin lebih rendah dari kondisi normal (kontrol negatif). Namun, menurut

Damiana *et al.* tahun 2014 pada dosis kefir susu sapi 10 ml/kgBB/hari masih belum bisa menyebabkan toksisitas karena pada penelitiannya menunjukkan bahwa pada dosis 3,5 ml/hari masih belum bisa membuat toksisitas subkronis pada tikus (Damiana *et al.*, 2014). Hal ini menunjukkan bahwa dosis 5 ml/kgBB/hari merupakan dosis yang lebih efisien dalam menurunkan kadar hemoglobin jika dibandingkan dengan dosis 10 ml/kgBB/hari. Menurut penelitian Fahmy dan Ismail menunjukkan bahwa hasil penelitiannya pada dosis 5 ml/kgBB/hari merupakan dosis yang efektif dalam menurunkan kadar MDA secara signifikan (Fahmy and Ismail, 2015).

Kefir susu sapi adalah susu sapi yang difermentasi dengan bibit kefir yang terdiri dari campuran yang spesifik dan kompleks dari mikroorganisme yang hidup dalam hubungan simbiosis (Rosa, 2014). Berdasarkan dari hasil pemberian dosis kefir susu sapi 5 ml/kgBB/hari, sudah sesuai dengan hasil penelitian dari Wong and Kitts (2003) yang menunjukkan bahwa protein dalam kefir susu sapi memiliki potensi sebagai antioksidan (Wong and Kitts, 2003). Guven *et al.* (2003) menjelaskan bahwa kefir memiliki antioksidan yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan vitamin E dalam mencegah kerusakan oksidatif (Guyen *et al.*, 2003). Antioksidan yang ada di dalam kefir dapat mengaktifkan sistem antioksidan dalam tubuh sehingga mampu mencegah oksidasi, mengurangi radikal superoksida, hidroksil dan peroksida (Judiono *et al.*, 2011).

Kefir memiliki kemampuan substansi donor proton untuk penangkapan proton radikal bebas merupakan mekanisme penting antioksidan (Liu *et al.*, 2005). Diketahui bahwa terdapat kandungan kefir yaitu peptida bioaktif yang dilepaskan selama fermentasi oleh bakteri asam laktat proteolitik dapat menangkap ROS (Punaro *et al.*, 2014). Efek pencarian superoksida pada kefir merupakan cara kerja

kefir sebagai antioksidan. Kefir susu memiliki kemampuan untuk membersihkan radikal superoksida lebih tinggi dibandingkan susu tanpa kefir (Liu *et al*, 2005).

Kefir juga memiliki aktifitas antioksidan yang tinggi dengan cara menghambat peroksidasi lemak yang kemungkinan dapat disebabkan oleh kontribusi dari komponen sel dari mikroorganisme bibit kefir dan peptida yang dihasilkan oleh fermentasi kefir susu sapi (Liu *et al*, 2005). Ahmed *et al*. (2013) menunjukkan bahwa kefir susu sapi memiliki kumpulan komponen dengan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi yaitu sebesar 88,6% dapat menghambat peroksidasi lipid.

Pada proses fermentasi kefir juga menghasilkan asam laktat yang membuat kefir bersifat sinergis dengan memberikan ion H<sup>+</sup> pada radikal bebas sehingga akan meningkatkan jumlah aktivitas antioksidan primer. Aktivitas sinergis dapat sebagai donor hidrogen pada radikal bebas sehingga dapat meregenerasi antioksidan primer dan meningkatkan kestabilan antioksidan (Pratimasari, 2009). Pemberian kefir susu sapi dengan kandungan protein 8,54% yang berperan sebagai antioksidan yaitu dengan cara penangkapan radikal bebas oleh peptida bioaktif pada kefir susu sapi sehingga mengurangi terjadinya pengikatan karbon monoksida dengan hemoglobin dan stres oksidatif sehingga mencegah kenaikan kadar hemoglobin sehingga kadar hemoglobin masih dalam kadar normal.

Penurunan kadar hemoglobin tidak hanya dipengaruhi oleh pemberian kefir susu sapi saja, berdasarkan uji regresi menunjukkan bahwa 50,8% penurunan kadar hemoglobin dipengaruhi oleh kefir susu sapi. Namun, 49,2% dipengaruhi oleh faktor lain seperti adanya aktifitas proteksi antioksidan yang berasal dari dalam tubuh seperti SOD, glutathion peroksida (GSH), dan katalase.

Penelitian yang kami lakukan memiliki beberapa kelemahan yaitu lamanya proses pembuntingan dan sulit menentukan kebuntingan pada tikus. Keberhasilan 75% untuk membuntingkan tikus. Pada proses pembuatan kefir susu sapi yang digunakan pada penelitian tidak membuat sendiri tetapi membeli di Laboratorium Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, di mana bibit kefir dan susu sapi yang digunakan mungkin hasilnya berbeda dengan produk susu kefir yang lain sehingga hasil penelitian yang lain mungkin berbeda.





## BAB 7

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

Pemberian kefir susu sapi dapat menurunkan kadar hemoglobin tikus (*Rattus norvegicus*) bunting yang dipapar asap rokok. Dosis kefir susu sapi optimal yang dapat mempengaruhi kadar hemoglobin yaitu 5 dan 10 ml/kgBB/hari.

#### 7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, maka saran yang bias diberikan yaitu:

- Diperlukan penelitian lebih lanjut pada hewan coba dengan metode lain untuk menentukan kebuntingan pada tikus.
- Diperlukan penelitian lebih lanjut pada hewan coba dengan menggunakan kefir susu sapi yang dibuat sendiri oleh peneliti.
- Diperlukan penelitian lebih lanjut pada kefir susu sapi dengan menguji kandungan apa saja dan berapa banyak yang terdapat pada kefir susu sapi yang berperan sebagai antioksidan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed Z., Yanping W., Asif A., Salman T., Mehrun N., Hajra A., *et al.* Kefir and Health: A Contemporary Perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2013, 53: 422-434.
- Armstrong D., 1994, *Free Radicals in Diagnostic Medicine: A System Approach to Laboratory Technology, Clinical Correlations, and Antioxidant Therapy*, 1<sup>st</sup> Ed., Springer is a part of Springer and Business Media, New Yorks, p. 1
- AVMA. 2013. *Guidelines for the Euthanasia of Animals*. Schaumburg: American Veterinary Medical Association.
- Aycicek A., Mustafa V., Ahmet K., Abdurrahi K., dan Erel O. Maternal Active or Passive Smoking Causes Oxidative Stress in Placental Tissue. *Eur J. Pediatr.*, 2011, 170: 645-651.
- Balai Penelitian dan Konsultasi Industri Laboratorium. 2017. *Report Certificate of Analisis*. Surabaya: BPKI.
- Behera S.N., Xian H., dan Balasubramanian R. Human Health Risk Associated with Exposure to Toxic Elements in Mainstream and Sidedstream Cigarette Smoke. *Article Science of the Total Environment*, 2014, 472: 947–956.
- Behrman K. and Arvin N. *Nelson Textbook of Pediatrics*, 1996, A. Samik Wahab (penerjemah), 2000, *Ilmu Kesehatan Anak Nelson*, 15<sup>th</sup> Ed., Vol. 1., EGC, Jakarta, hal 307
- Bell M.L., Ebisu K., dan Belanger K. Ambient Air Pollution and Low Birth Weight in Connecticut and Massachusetts. *Environmental Health Perspective*, 2007, 115 (7): 1118-1124.
- Birben E., Sahiner U.M., Sackesen C., Erzurum S., dan Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 2012, 5 (9): 9-19.
- Blumenthal I., Carbon Monoxide Poisoning. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 2001, 94: 270-272.
- Cadwell E., 2001, *Berhenti Merokok*, P.T. LKis Printing Cermelang, Yogyakarta, hal. 9.
- Chelchowska M, Ambroszkiewicz, Gajewska, Laskowska and Leibschang. The Effect of Tobacco Smoking During Pregnancy on Plasma Oxidant and Antioxidant Status in Mother and Newborn. *European Journal of Obstetric and Gynecology and Reproductive Biology*, 2011, 155 : 132-136.

- Damiana D.R., Maria C.G.P., Tania P.B., Ernesto V.C., Lilian S.M., Betty M.D., dkk. Evaluation of Subchronic Toxicity of Kefir by Oral Administration in Wistar Rats. *Nutricion Hospitalaria*, 2014, 29 (6): 1352-1359.
- Departemen Kesehatan RI, 2011, *Rokok Membunuh Lima Juta Orang Setiap Tahun* (online), (<http://www.depkes.go.id/article/print/447/rokok-membunuh-lima-juta-orang-setiap-tahun.html>), diakses 29 November 2016)
- Edward C.B., 2016., *Spine Surgery: Techniques, Complication Avoidance and Management 3<sup>th</sup> Ed.*, Elsevier, Philandelpia, p. 1274.
- Fahmy H.A. and Ismail A.F.M., Gastroprotective Effect of Kefir on Ulcer Induced in Irradiated Rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biologi*, 2015, 144: 85-93.
- Farnworth E.R., Kefir: A Complex Probiotic. *Food Science and Technology Bulletin*, 2005, 2(1): 1-17.
- Ferlay J., Shin H.R., Bray F. Forman D., Mathers C., dan Parkins D.M., Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancerbase. *International Agency for Reasearch on Cancer*, 2008, 10.
- Gamagita L.P., 2016, *Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Naga Merah (Hylocereus polyrhius) terhadap Berat Badan Lahir (BBL) Tikus Bunting Strain Wistar (Rattus norvegicus) Bunting yang Terpapar Asap Rokok*. Tugas Akhir. Tidak Diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Gaware V., Kotade K., Dolas R., Dhamak K., Somwanshi S., dan Nikam V. The Magic of Kefir: A Review. *Pharmacologyonline*, 2011, 1: 376-386.
- Greaves L., Poole N., Okoli C.T.C., Hemsing N. Qu A., Bialystok L. *et al.*, 2011, *Expecting to Quit: A Best-Practices Review of Smoking Cessation Interventions for Pregnant and Post-Partum Women 2<sup>nd</sup> Ed.*, British Colombia Centre of Excellence for Women's Health, Vancouver, p. 2.
- Guyen A., Guven A., and Gulmez M. The Effect of Kefir on The Activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO Levels in Carbon Tetrachloride-Induced Mice Tissues. *J. Vet. Med. B.*, 2003, 50: 412-416.
- Halliwell B. dan Gutteridge J.M.C. Free Radicals and Antioxidant in the Year 2000. *A Historical Look to The Future*, 2000, 899: 136-147.
- Halliwell, B.B. and Poulsen H.E., 2006. *Cigarette Smoke Oxidative Stress*, Edited by Heilmann U., Spring is a part of Springer and Business Media, Jerman, p. 2 - 10
- Hayatin D., 2007, *Konsumsi Pakan dan Pertambahan Bobot Badan Harian Tikus (Rattus norvegicus) Bunting Akibat Penyuntikkan Bst (Bovine*

*Somatotropin*), Skripsi, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Heiss C., Amabile N., Lee A.C., Real W.M., Schick S.F., Lao D. *et al.* Brief Secondhand Smoke Exposure Depresses Endothelial Progenitor Cell Activity and Endothelial Function. *Journal of the American College of Cardiology*, 2008, 51(18): 1760-1771.

Hubrecht R. dan James K., 2010. *The Care and Management of Laboratory and Other Research Animal 8<sup>th</sup> Ed.*, John Wiley and Sons Ltd., USA.

Hui Y.H., Hansen A.S., Goddik L.M., Josephen J., Nip W.K., dan Stanfield P.S., 2004, *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*, Marcel Dekker, Inc., New York.

Indonesia. Kementerian Kesehatan. 2011, *Pusat Promosi Kesehatan Pedoman Pengembangan Kawasan Tanpa Rokok*, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, hal. 9.

Indonesia, Kementerian Kesehatan. 2016, *HTTS 2016: Suarakan Kebenaran, Jangan Bunuh Dirimu dengan Candu Rokok*, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, hal. 2.

Iorio E.L., The Measurement of Oxidative Stress: International Observatory of Oxidative Stress, Free Radicals and Antioxidant Systems. *Special Supplement to Bulletin*, 2007.

John P.G., Daniel A.A., Bertil G., Alan F.L., Robert T.M. Frixos P. *et al.*, 2014, *Wintrobe's Clinical Hematology 13<sup>th</sup> Ed.*, Lipponcott Williams and Wilkins, a Wolters Kluwer business, Philadelphia, p. 1012-1013.

John S.M. dan Deeseenthum S. Properties and Benefit of Kefir: A Review. *Songklanakar J.Sci Technol.*, 2015, 37 (3): 275-285.

Judiono, Djokomoeljanto, Hadisaputro., Effects of Oral Clear Kefir Probiotics on Glycemic Status, Lipid Peroxidation, Antioxidative Properties of Streptozotocin Induced Hyperglycemia Wistar Rats. *Gizi Indonesia*, 2011, 34(1): 1-6.

Kesekas H., Dinkci N., Seckin K., Kinik O., dan Gonc S., Antioxidant Properties of Kefir Produced from Different Cow and Soy Milk Mixture. *Journal of Agricultural Sciences*, 2011, 17: 253-259.

Kopaei M.R., Azar B., dan Morteza R. Oxidative Stress and The Paradoxical Effect of Antioxidant. *Journal of Research in Medical Sciences*, 2013, 628.

Kleinstreuer C. dan Feng Y. Lung Deposition Analyses of Inhaled Toxic Aerosol in Conventional and Less Harmfull Cigarette Smoke: A Review. *International Journal of Environmenta Research Public Health*, 2013, 10: 4454-4485.

- Leite A.M.O., Miguel M.A.L., Peixoto R.S., Rosado A.S., Silva J.T., dan Pascoalim V.M.F. Microbiological, Technological and Therapeutic Properties of Kefir: A Natural Probiotic Beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2013, 44 (2): 341-349.
- Liu J.R., Lin Y.Y., Chen M.J., Chen L.J., dan Chin W.L. Antioxidative Activities of Kefir. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 2005, 18 (4): 567-573.
- Lovita A.N.D., 2013, *Pengaruh Pemberian Vitamin E terhadap Kadar Hemoglobin Maternal Tikus Rattus norvegicus Bunting yang Dipapar Asap Rokok Subakut*. Tugas Akhir. Tidak Diterbitkan. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Lyras L., Cairns N.J., Jenner A., Jenner P., and Halliwell B. An Assessment of Oxidative Damage to Protein, Lipid, and DNA in Brain from Patients with Alzheimer's Disease. *Journal of Neurochemistry*, 1997, 68: 2061-2069.
- Malole M.B.M. dan Pramono, 1989, *Penggunaan Hewan-Hewan Percobaan di Laboratorium*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Dirjen Pendidikan Tinggi, Pusat antar Universitas Bioteknologi, IPB Press, Bogor.
- Mangoenprasodjo S.A. dan Hidayati N.S., 2009, *Hidup Sehat tanpa Asap Rokok*, Pradipta Publishing, Yogyakarta, hal. 67.
- Mazzone P, William, Mohammed, Vikram, Damir and Luca. Pathophysiological Impact of Cigarette Smoke Toxicity in An Underappreciated Area. *Int. J. Res. Public Health*, 2010, 7: 4111-4128.
- Mohanty J.G., Nagababu E., dan Rifkind J.M. Red Blood Cell Oxidative Stress Impairs Oxygen Delivery and Induces Red Blood Cell Aging. *Frontiers in Physiology Review Article*, 2014, 5 (84): 1-6.
- Mund M., Louwen F., Klingelhofer D., Gerber A. Smoking and Pregnancy: A Review on The First Major Environmental Risk Factor of The Unborn. *International Journal of Environmental Research and Publik Health*, 2013, 10 (3390): 6485-6499
- Notoadmodjo, S. 2010. *Metodologi Penelitian Kesehatan*, Rineka Cipta, Jakarta.
- Pandey K.B. dan Rizvi S.I., Biomarkers of Oxidative Stress in Red Blood Cells. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 2011, 155(2): 131-136.
- Pardede R., 2007, *Perkembangan dan Pertumbuhan Ambing Tikus (Rattus norvegicus) pada Usia Kebuntingan 13, 17, dan 21 Hari akibat Penyuntikkan Bst (Bovine Somatotropin)*, Skripsi, Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor.

- Phaniendra A., Jestadi D.B., dan Periyasamy L., Free Radicals: Properties, Sources, Targets and The Implication in Various Disease. *India Journal Clinical Biochemist*, 2015, 30(1): 11-26.
- Pramitasari D., 2009. *Uji Penangkap Radikal Buah Carica Papaya dengan Metode DPPH dan Penetapan Kadar Fenolik serta Flavonoid Totalnya*. Skripsi. Tidak Diterbitkan Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah, Surakarta.
- Punaro G.R., Maciel F.R., Rodrigues A.M., Rogero M.M., Bogsan C.S.B., Oliveira M.N. *et al.*, Kefir Administration Reduced Progression of Renal Injury in STZ-Diabetic Rats by Lowering Oxidative Stress. *Nitric Oxide*, 2014, 33: 53-60.
- Rodeque J.D., Giorgis A.A., Stewart D.H., Feldman M.J., dan Pozez A.L., Smoke Inhalation Injury in The Pregnant Patient: A Literature Review of The Evidence and Current Best Practice in The Setting of a Classic Case. *Journal of Burn Care and Reasearch*, 2012, 33 (5): 624-633.
- Rodger L.B., Eugene P.F., William F.B., dan Ravi S., 2006, *Hematology Complications in Obstetric, Pregnancy and Gynecology*, Cambridge, USA.
- Rosa D. D., 2014, *Evaluation of Kefir Consumption on Metabolic, Immune, Hormonal and Histological Parameters in Spontaneously Hipertensive Rats with Induced Metabolic Syndorome*, 22<sup>th</sup> Ed., Vicosa Minas Gerais, Brazil, p. 1-34.
- Russel J.C., Towns D.R., dan Clout M.N., 2008, *Review of Rat Invasion Biology*, Science and Technical Publishing, Departement of Conservation, New Zealand.
- Sachdeva M., Karan M., Singh T., Dhingra S., Oxidants and Antioxidants in Complementary and Alternative Medicine: A Review. *Review Article Spatula DD.*, 2014, 4(1): 1-16.
- Samsuria, 2009, *Efek Asap Rokok pada Tikus (Rattus norvegicus) Bunting terhadap Tampilan Fisiologis Induk dan Anaknya setelah Dilahirkan*, Tesis. Intitut Pertanian Bogor, Bogor.
- Sarkar S., Biotechnological Innovation in Kefir Production: A Review. *British Food Journal*, 2008, 110(3): 283-295.
- Shah B. K., Nepal A.K., Agrawal M., Sinha A.K. The Effect of Cigarette Smoking on Hemoglobin Levels Compared between Smokers and Non Smoker. *Sunsari Technical Collage Journal*, 2012, 1 (1): 42-44.
- Sinclair, 2009, *Buku Saku Kebidanan alih Bahasa Indonesia*, EGC, Indonesia.
- Smith B.J. dan Mangkoewidjojo S., 1988, *Pemeliharaan, Pembiakkan, dan Penggunaan Hewan Coba di Daerah Tropis*, Universitas Indonesia Press, Jakarta.

- Soothill P.W., Morafa W., Ayida G.A., dan Rodeck C.H. Maternal Smoking and Fetal Carboxyhaemoglobin and Blood Gas Levels. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 1996, 103: 78-82.
- Staf Pengajar Departemen Farmakologi FK UNSRI. 2004. *Kumpulan Kuliah Farmakologi*, ed.2. Jakarta: EGC.
- Storey K.B., 2004, *Functional Metabolis: Regulation and Adaption*, John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, Canada, p. 319-367.
- Suckow, M.A., Weisbroth S.H., Franklin, C.L. *The Laboratory Rat*, ed. 2. USA: Elsevier Academic Press.
- Tamboyang J., 2000, *Patofisiologi untuk Keperawatan*, EGC, Jakarta.
- Teresa A.L., Sandra R.S., and Maureen H.S. Hematology and Clinical Chemistry Value in Pregnant Wistar Hannover Rats Compared with Nonmated Controls. *Veterinary Clinical Patology*, 2004, 33 (2): 69-73.
- Tweed J.O., Hsia S.H., Lutfy K., Friedman T.C. The Endocrine Effect of Nicotine and Cigarette Smoke, *Trends Endocrinol Metab.*, 2012, 23 (7): 334-342.
- Universitas Bilkent, 2009, *Karbonmonoksit* (online), (<http://www.bilheal.bilkent.edu.traykonuay2009karbonmonoksit.htm>, diakses pada 27 February 2017).
- Urasoko Y., He X.J., Ebata T., Kinoshita Y., Kobayashi J., and Mochizuki M. Changes in Blood Parameters and Coagulation Related Gene Expression in Pregnants Rats. *J. Am Assoc Lab Anim Sci.*, 2009, 48 (3): 272-278.
- Valavanidis A., Vlachogianni T., dan Fiotakis K. Tobacco Smoke: Involvement of Reactive Oxygen Species and Stable Free Radicals in Mechanisme of Oxidative Damage, Carcinogenesis and Synergistic Effects with Other Respirable Particles. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2009, 6: 445-462.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., dan Telser J., Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2007, 39: 44-84.
- Widodo, Wahyu. 2002. Bioteknologi Fermentasi Susu. *Pusat Pengembangan Bioteknologi Universitas Muhammadiyah Malang*.
- WHO. 2012. *Global Adult Tobacco Survey Indonesian Report 2011*, WHO Library Cataloguing in Publication Data, Regional Office for South East Asia, p. 60.

repository.ub.ac.id

WHO, 2016, *Tobacco* (online),  
(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/en/>, diakses 28  
November 2016).

Wolfensohn S. dan Lloyd M., 2013, *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare 4<sup>th</sup> Ed.*, John Wiley and Sons Ltd, USA.

Wong P.Y.Y. and Kitts D.D. Chemistry of Buttermilk Solid Antioxidant Activity. *J. Dairy Sci*, 2003, 86(2).

Yip R., Significance of An Abnormally Low or High Hemoglobin Concentration during Pregnancy: Special Consideration of Iron Nutrition. *Am J. Clin. Nutr.*, 2000, 72: 272s-9s.

Zdravkovic T., Genbacev O., McMaster M.T., Fisher S.J. The Adverse Effects of Maternal Smoking on The Human Placenta: A Review. *J. Placenta Supplement A., Trophoblas Research*, 2005, 26(19): 81-86.

