

**PENGARUH PEMBERIAN KEFIR SUSU SAPI TERHADAP PENCEGAHAN
PENURUNAN AKTIVITAS SOD (*SUPEROXIDE DISMUTASE*) PLASENTA
TIKUS PUTIH (*RATTUS NORVEGICUS*) BUNTING DENGAN PAPARAN ASAP
ROKOK**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kebidanan**



Oleh:

Dessy Nur Safitri

145070601111003

PROGRAM STUDI S1 KEBIDANAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

DAFTAR ISI

Halaman Sampul..... i

Halaman Lembar Persetujuan **Error! Bookmark not defined.**

Halaman Lembar Pengesahan iii

Halaman Lembar Peruntukan iv

Kata Pengantar..... v

Abstrak viii

Abstract **Error! Bookmark not defined.**

Daftar Isi x

Daftar Gambar.....xiv

Daftar Tabel..... **Error! Bookmark not defined.**

Daftar Lampiran.....xvi

Daftar Singkatan..... **Error! Bookmark not defined.**

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang **Error! Bookmark not defined.**

1.2 Rumusan Masalah..... **Error! Bookmark not defined.**

1.3 Tujuan Penelitian..... **Error! Bookmark not defined.**

1.4 Manfaat Penelitian..... **Error! Bookmark not defined.**

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rokok..... **Error! Bookmark not defined.**



2.1.1 Deskripsi Rokok.....	Error! Bookmark not defined.
2.1.2 Kandungan Rokok	Error! Bookmark not defined.
2.1.3 Bahaya Asap Rokok Selama Kehamilan.....	Error! Bookmark not defined.
2.2 Radikal Bebas.....	Error! Bookmark not defined.
2.2.1 Sumber Radikal Bebas	13
2.2.2 Sistem Pertahanan Antioksidan Dan Stress Oksidatif.....	Error! Bookmark not defined.
2.3 Antioksidan	Error! Bookmark not defined.
2.3.1 Jenis Antioksidan.....	Error! Bookmark not defined.
2.3.2 SOD.....	Error! Bookmark not defined.
2.4 Kefir	Error! Bookmark not defined.
2.4.1 Deskripsi Kefir	Error! Bookmark not defined.
2.4.2 Pembuatan Kefir.....	Error! Bookmark not defined.
2.4.3 Cara Penyimpanan Kefir Susu Sapi.....	Error! Bookmark not defined.
2.4.4 Kefir Sebagai Antioksidan.....	Error! Bookmark not defined.
2.5 Tikus (<i>Rattus novergicus</i>).....	30

BAB 3 KERANGKA KONSEP PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep.....	Error! Bookmark not defined.
3.2 Hipotesis Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian	37
--------------------------------	----

4.2 Populasi Dan Sampel Penelitian	Error! Bookmark not defined.
4.2.1 Kriteria Inklusi	Error! Bookmark not defined.
4.2.2 Kriteria Eksklusi	40
4.2.3 Prosedur Dan Teknik Pengambilan Sampel.....	40
4.3 Variabel Penelitian	40
4.3.1 Variabel Bebas (<i>Independent Variable</i>)	40
4.3.2 Variabel Terikat (<i>Dependent Variable</i>).....	40
4.4 Lokasi Dan Waktu Penelitian.....	40
4.4.1 Lokasi Penelitian.....	40
4.4.2 Waktu Penelitian.....	41
4.5 Bahan Dan Alat/ Instrumen Penelitian.....	41
4.5.1 Bahan Untuk Pemeliharaan Hewan Coba.....	41
4.5.2 Bahan Untuk Perlakuan Hewan Coba.....	41
4.5.3 Bahan Untuk Pembedahan Hewan Coba.....	41
4.5.4 Bahan Untuk Pemeriksaan SOD.....	41
4.5.5 Alat Pemeliharaan Hewan Coba	Error! Bookmark not defined.
4.5.6 Alat Untuk Penimbangan Berat Badan Hewan Coba.....	Error! Bookmark not defined.
4.5.7 Alat Untuk Pembuatan Kefir Susu Sapi.	Error! Bookmark not defined.
4.5.8 Alat Untuk Pemberian Kefir Susu Sapi.....	42
4.5.9 Alat Untuk Pemaparan Asap Rokok Pada Hewan Coba	Error! Bookmark not defined.

4.5.10 Alat Untuk Pembedahan Dan Pengambilan Plasenta	Error!
Bookmark not defined.	
4.5.11 Alat Untuk Pengukuran SOD	Error! Bookmark not defined.
4.6 Definisi Operasional	Error! Bookmark not defined.
4.7 Prosedur Penelitian	Error! Bookmark not defined.
4.7.1 Cara Kerja	Error! Bookmark not defined.
4.7.1.1 Aklimatisasi Hewan Coba	46
4.7.1.2 Pembagian Kelompok Hewan Coba	46
4.7.1.3 Prosedur Pembuntingan Hewan Coba	47
4.7.1.4	
Coba.....	47
4.7.1.5	
Sapi.....	48
4.7.1.6 Pemberian Kefir Susu Sapi	48
4.7.1.7 Pemaparan Asap Rokok pada Hewan Coba	48
4.7.1.8 Pengambilan Plasenta	49
4.7.1.9 Perlakuan Hewan Coba Sesudah Penelitian	50
4.7.1.10 Pengukuran SOD	50
4.8 Alur Penelitian	52
4.9 Analisis Data	Error! Bookmark not defined.
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	Error! Bookmark not defined.
BAB 6 PEMBAHASAN	61

BAB 7 PENUTUP 67

7.1 Kesimpulan 67

7.2 Saran 67

Daftar Pustaka..... **Error! Bookmark not defined.**

Lampiran 79





HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**"PENGARUH PEMBERIAN KEFIR SUSU SAPI TERHADAP PENCEGAHAN
PENURUNAN AKTIVITAS SOD (*SUPEROXIDE DISMUTASE*) PLASENTA
TIKUS PUTIH (*RATTUS NORVEGICUS*) BUNTING DENGAN PAPARAN ASAP
ROKOK"**

Oleh:
Dessy Nur Safitri
NIM 145070601111003

Telah diuji pada
Hari : Rabu
Tanggal : 07 Maret 2018
dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I

dr. Hidayat Sujuti, Ph.D., Sp.M

NIP. 196701231996011001

Pembimbing-I/ Penguji-II

Dr. dr. Setyawati Soeharto, M. Kes

NIP. 195210271981032001

Pembimbing-II/ Penguji-III

dr. Astri Proborini, Sp.A, M. Biomed

NIP. 2016078104062001

Mengetahui,

Ketua Program Studi S1 Kebidanan,

Linda Ratna Wati SST, M.Kes

NIP. 198409132014042001



ABSTRAK

Safitri, Dessy Nur. 2018. **Pengaruh Pemberian Kefir Susu Sapi Terhadap Pencegahan Penurunan Aktivitas SOD (*Superoxide Dismutase*) Plasenta Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Bunting Dengan Paparan Asap Rokok.** Tugas Akhir, Program Studi Kebidanan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dr. dr. Setyawati Soeharto, M. Kes (2) dr. Astri Proborini, Sp.A, M. Biomed.

Radikal bebas adalah molekul yang memiliki atom dengan elektron yang tidak berpasangan dan bersifat reaktif, disebut *Reactive Oxygen Species* (ROS). ROS dapat dibentuk melalui jalur metabolik maupun enzimatis. Salah satu sumber radikal bebas adalah asap rokok. Bahan kimia beracun yang terkandung didalam rokok mampu memicu pembentukan radikal bebas sehingga menyebabkan kerusakan oksidatif biologis. Kerusakan oksidatif timbul akibat ketidakseimbangan oksidan dan antioksidan tubuh, salah satunya SOD (*Superoxide Dismutase*). SOD adalah antioksidan endogen yang melindungi kerusakan sel dengan cara mengkatalisis radikal superoksida menjadi hydrogen peroksida dan oksigen. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian kefir susu sapi terhadap pencegahan penurunan aktivitas SOD (*Superoxide Dismutase*) plasenta tikus (*Rattus norvegicus*) bunting dengan paparan asap rokok. Studi eksperimental ini menggunakan *Post Test Only Control Group Design*. yang dilakukan pada 24 ekor tikus bunting. Sampel dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kontrol negatif (tanpa asap rokok dan tanpa diberi kefir susu sapi), kontrol positif (dipapar asap rokok tanpa diberi kefir susu sapi) dan P1, P2 dan P3 (dipapar asap rokok dan diberi kefir susu sapi dengan dosis 2,5 ml/kgBB; 5 ml/kgBB; 10ml/kgBB). Aktivitas SOD diukur menggunakan spektrofotometri. Hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan signifikan antar kelompok ($p=0,000$). Uji *Post Hoc* pada P1, P2 dan P3 dapat mencegah penurunan aktivitas SOD ($p= 0,000$), dan P3 dapat mencapai aktivitas SOD dalam kondisi yang normal ($p=0,051$). Terdapat hubungan yang sangat kuat ($r=0,909$ dengan nilai $p<0,05$ dan kefir susu sapi dapat berpengaruh terhadap aktivitas SOD sebesar 82,6%. Kesimpulan pada penelitian ini adalah kefir susu sapi dapat mencegah penurunan aktivitas SOD plasenta.

Kata kunci: Kefir Susu Sapi, Aktivitas SOD (*Superoxide Dismutase*), Asap Rokok, Tikus (*Rattus norvegicus*) Bunting.

ABSTRACT

Safitri, Dessy Nur. 2018. **The Influence of Kefir (Cow's Milk) Administration to Prevent Reduction of SOD (*Superoxide Dismutase*) Activity in Pregnant White Mice (*Rattus norvegicus*) Placenta Against Cigarette Smoke**. Tugas Akhir, Program Studi Kebidanan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dr. dr. Setyawati Soeharto, M. Kes (2) dr. Astri Proborini, Sp.A, M. Biomed.

A free radical is a molecule containing atom that has unpaired electron which is reactive, called Reactive Oxygen Species (ROS). ROS can be formed through both metabolic and enzymatic fascia. One of radical free source is cigarette smoke. The toxic chemical contained in cigarette can trigger free radical formation which causes biological oxidative damage. Oxidative damage arises from oxidants and antioxidants of the body, one of them is SOD (*Superoxide Dismutase*). SOD is endogenous antioxidants that protects cell damage by catalyzing superoxide radical into hydrogen peroxide and oxygen. The objective of this research is to cognize the influence of kefir administration to prevention of reduction SOD (*Superoxide Dismutase*) activity of pregnant white mice placenta against the cigarette smoke. This experimental study was using Post Test Only Control Group Design which was applied to 24 pregnant mice. The samples were divided into 5 groups; they were negative control (unexposed to cigarette smoke and without cow milk kefir), positive control (exposed to cigarette smoke and without cow's kefir) and P1, P2 and P3 (exposed to cigarette smoke and administration of 2,5 ml/kgBB of kefir; 5 ml/kgBB of kefir; 10 ml/kg BB of kefir). The SOD activity was measured using spectrophotometry. The test results of One Way ANOVA reveal the different significantly among the groups ($p=0,000$). The Post Hoc Test of P1, P2, and P3 can prevent the reduction SOD activity ($p=0,000$), and P3 can achieve the SOD activity under normal condition ($p=0,051$). There is a strong relationship ($r=0,909$ and significant value $<0,05$). The kefir can affect the SOD activity by 82,6%. The conclusion of the research shows that kefir can prevent the reduction of SOD activity of placenta against cigarette smoke.

Keywords: Kefir, SOD (*Superoxide Dismutase*) Activity, Cigarette Smoke, Pregnant Mice (*Rattus norvegicus*)

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Angka Kematian Ibu (AKI) merupakan salah satu indikator yang peka terhadap kualitas dan aksesibilitas fasilitas pelayanan kesehatan. Berdasarkan Survei Demografi dan Kesehatan Indonesia (SDKI) pada 2012, AKI (yang berkaitan dengan kehamilan, persalinan, dan nifas) berjumlah sebesar 359 per 100.000 kelahiran hidup. Pada 2012 SDKI kembali mencatat kenaikan AKI yang signifikan, yakni dari 228 menjadi 359 kematian ibu per 100.000 kelahiran hidup (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2012). Di Jawa Timur, capaian AKI cenderung meningkat dalam lima tahun terakhir. Pada 2012 mencapai 97,43 per 100.000 kelahiran hidup (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2012).

Salah satu yang mempengaruhi kesehatan tubuh adalah faktor lingkungan yang berkaitan dengan perilaku hidup, yaitu kebiasaan merokok. Saat ini, merokok tidak hanya dilakukan oleh laki-laki tetapi juga dilakukan oleh perempuan. Data dari Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI (2013) menyatakan bahwa penduduk yang merokok dengan usia 15 tahun keatas masih belum terjadi penurunan dari 2007 ke 2013. Meningkat dari 34,2% tahun 2007 menjadi 36,3% tahun 2013, 64,9% laki-laki dan 2,1% perempuan masih menghisap rokok tahun 2013. 1,4% perokok umur 10-14 tahun,

9,9% perokok pada kelompok tidak bekerja, dan 32,3% pada kelompok kuintil indeks kepemilikan terendah.

Menghisap atau menghirup asap rokok tentunya berbahaya bagi tubuh. Perempuan yang merokok atau menghirup asap rokok terus menerus selama kehamilan akan berdampak negatif bagi kesehatan ibu dan janinnya, seperti berat badan bayi lahir rendah, risiko abortus spontan, meningkatnya angka kelahiran prematur, risiko penyakit pada plasenta, meningkatkan risiko kematian bayi baru lahir, peningkatan risiko kehamilan ektopik, plasenta previa, dan anomali kongenital seperti bibir sumbing (Liszewski *et al.*, 2007).

Paparan asap rokok adalah paparan asap yang dihirup oleh seseorang yang bukan perokok utama (*Passive Smoker*). Asap rokok tersebut lebih berbahaya bagi perokok pasif karena kandungan zat kimianya yang lebih tinggi dibandingkan pada perokok aktif (Zisovska, 2010), lima kali lebih banyak mengandung karbon monoksida, empat kali lebih banyak mengandung tar dan nikotin (Simpson, 2009). Karbonmonoksida dapat berdampak buruk pada pernapasan ibu hamil sehingga janin akan kekurangan oksigen (Ross, 2006). Setiap kali menghirup asap rokok, sengaja maupun tidak, berarti juga mengisap lebih dari 4000 bahan kimia dan 200 diantaranya beracun seperti CO (karbonmonoksida) dan nikotin (Sirajuddin dkk, 2011).

Asap rokok tersebut dapat menginduksi pembentukan radikal bebas sehingga radikal bebas akan meningkat. Secara fisiologis hal tersebut akan diantisipasi oleh enzim endogenus, yaitu Superoksida Dismutase (SOD). SOD merupakan antioksidan primer di dalam tubuh

(intraselular). SOD tersebut menandakan status antioksidan dan digunakan sebagai bioindikator kondisi stres oksidatif (Herdiani, 2016). SOD berperan penting sebagai pertahanan pertama melawan radikal bebas dengan cara dismutasi anion superoksida menjadi hidrogen peroksida dan oksigen (Marks dkk, 2000). Aktivitas dari SOD ini telah ditemukan di dalam plasenta (Zhang *et al.*, 2002).

Jika paparan radikal bebas tersebut terus menerus terjadi, maka enzim endogen/SOD dalam tubuh tidak mencukupi. Ketidakseimbangan produksi radikal bebas/ROS (*Reactive Oxygen Species*) dan status antioksidan endogenous tersebutlah yang disebut dengan stres oksidatif (Halliwell, 2006). Sehubungan dengan potensi toksisitas senyawa radikal bebas, tubuh membutuhkan antioksidan dari luar yang berfungsi menetralkan dan mempercepat degradasi senyawa radikal bebas untuk mencegah kerusakan komponen makromolekul sel dan membantu meningkatkan antioksidan enzimatik dalam tubuh.

Antioksidan dari luar tubuh dapat diperoleh dengan mengonsumsi makanan atau minuman yang mengandung antioksidan. Salah satunya adalah "Kefir". Penelitian yang berjudul "*Antioxidative Activities of Kefir*" menyatakan bahwa kefir merupakan antioksidan potensial yang berinteraksi langsung dengan berbagai aktivitas antioksidannya yang bertanggung jawab atas kerusakan oksidatif dan menjadi suplemen antioksidan alami dalam makanan manusia (Anim, 2005).

Kefir juga memberikan efek antioksidan yang lebih protektif dibandingkan dengan vitamin E dalam penelitian yang dilakukan pada hewan coba yang diberi karbon tetraklorida (CCl₄) (Güven & Gülmez,

2003). Penggunaan kefir disarankan sebagai antioksidan, antimikroba, antitumor, dan immunomodulator. Penelitian terus dilakukan untuk menghasilkan perkembangan produk kefir untuk melestarikan konsumen yang sehat (Maria R. Prado¹, 2015).

Kefir yang telah diuji sebagai antioksidan tambahan, masih belum diteliti pada ibu hamil. Berdasarkan uraian tersebut, peneliti tertarik untuk meneliti kefir yang telah terbukti sebagai antioksidan, apakah mampu meningkatkan SOD (*Superoxide Dismutase*) plasenta tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan percobaan bunting dengan paparan asap rokok. Harapan penelitian ini dapat mencegah dampak negatif radikal bebas terutama paparan asap rokok pada kehamilan.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian kefir susu sapi dapat mencegah penurunan aktivitas SOD (*Superoxide Dismutase*) plasenta tikus putih (*Rattus norvegicus*) bunting dengan paparan asap rokok?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan pengaruh pemberian kefir susu sapi terhadap pencegahan penurunan aktivitas SOD (*Superoxide Dismutase*) plasenta tikus putih (*Rattus norvegicus*) bunting dengan paparan asap rokok.

1.3.2 Tujuan Khusus

- 1.3.2.1 Membuktikan aktivitas SOD (*Superoxide Dismutase*) setelah diberikan kefir susu sapi pada plasenta tikus putih (*Rattus norvegicus*) bunting dengan paparan asap rokok.
- 1.3.2.2 Membuktikan dosis optimal kefir susu sapi yang diberikan pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) agar dapat memberikan efek terapeutik.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat bagi Akademik

Penelitian ini dapat memberikan kontribusi dalam mengembangkan ilmu pengetahuan, khususnya kebidanan tentang manfaat kefir susu sapi sebagai antioksidan terutama saat kehamilan yang rentan terpapar radikal bebas, seperti asap rokok.

1.4.2 Manfaat bagi Masyarakat

Dapat memberikan informasi dan pengetahuan baru tentang manfaat kefir susu sapi sebagai antioksidan dalam mencegah penurunan aktivitas SOD (*Superoxide Dismutase*) pada kehamilan dengan paparan asap rokok.

1.4.3 Manfaat bagi Peneliti

Peneliti dapat menambah wawasan keilmuan dan pengalaman terkait kefir susu sapi yang dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan sebagai upaya promotif dan preventif kepada ibu hamil yang terpapar radikal bebas. Penelitian juga digunakan untuk memenuhi persyaratan memperoleh gelar sarjana kebidanan.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rokok

2.1.1 Deskripsi Rokok

Rokok adalah gulungan tembakau yang berbalut daun nipah, kertas, atau bahan lainnya. Bentuknya silinder dengan diameter 0,5>1cm. Panjang dan ukurannya bervariasi, tergantung jenis rokoknya. Pada umumnya panjang rokok sekitar 5 cm. Rokok berisi rajangan daun tembakau (Sukmana, 2009).

Rokok terbagi dua macam, yaitu rokok yang berfilter dan tidak berfilter (kretek). Filter rokok terbuat dari bahan busa serabut sintesis yang berguna menarik nikotin dan tar. Apabila rokok diisap dan diembuskan akan menghasilkan asap rokok. Asap rokok mengandung bahan kimia beracun, karsinogenik, mutagenik, maupun radikal bebas yang stabil dan tidak stabil serta ROS yang dapat menyebabkan kerusakan oksidatif biologi (Valavanidis, 2009).

Asap rokok yang keluar dari ujung pembakaran rokok atau yang disebut dengan asap arus samping (*Side Stream Smoke*) mengandung komponen gas beracun yang lebih tinggi dibandingkan dengan asap arus utama (*Mainstream Smoke*) atau asap rokok yang diisap oleh perokok aktif (Ambrose and Barua, 2004).

Kebiasaan merokok dapat meningkatkan resiko munculnya berbagai penyakit seperti penyakit jantung dan gangguan pembuluh darah, kanker paru-paru, kanker rongga mulut, kanker laring, kanker esofagus, bronkhitis, tekanan darah tinggi, impotensi, serta gangguan kehamilan dan cacat pada janin (Irawati dkk, 2011)

2.1.2 Kandungan Rokok

Rokok terbuat dari daun tembakau yang mengandung nikotin dan zat-zat lain yang bersifat adiktif, seperti piridin, fenol, hidrogen sianida, amonia, benzene, benza anthracene, benzo pyrene, dan sebagainya. Zat yang ada dalam rokok mengandung sekitar 4000 komponen kimia. Salah satunya mengandung ROS (*Reactive Oxygen Species*), seperti peroksinitrat dan senyawa organik dari radikal bebas. Kandungan yang ada dalam rokok ini sangat reaktif dan relatif stabil yang berpotensi menstimulasi sel untuk memproduksi ROS (Nopya, 2013).

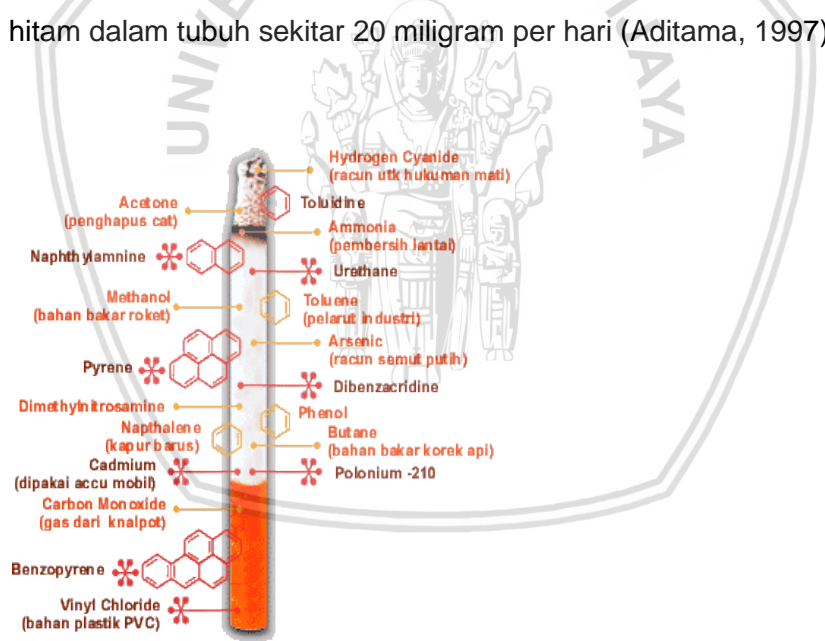
ROS pada rokok memicu hancurnya antioksidan endogen (vitamin dan enzim) dan mengurangi efek pertahanan tubuh oleh antioksidan (Valavanidis, 2009).

Nikotin merupakan bahan yang mempunyai aktivitas biologis yang merangsang bangkitnya adrenalin hormon yang menyebabkan jantung berdebar-debar dan meningkatkan tekanan darah serta kadar kolesterol dalam darah. Zat adiktif yang terdapat pada nikotin juga membuat perokok menjadi ketergantungan. Apabila berlebihan, dapat menyebabkan kanker. Zat lainnya adalah tar yang mengandung piridin. Tar dapat merusak alat pernapasan. Semakin dalam pengisapan rokok, semakin banyak racun yang mengendap di saluran pernapasan. Tar

mengandung bahan kimia beracun yang bisa merusak sel paru-paru dan menyebabkan kanker (Sukmana, 2009).

Karbon monoksida merupakan gas yang tidak berbau. Inhalasi gas ini menyebabkan kerusakan saraf pusat dan asfiksia dengan cara mengikat hemoglobin secara *irreversible* (Dorlan, 2011). Karbon monoksida merendahkan kandungan oksigen di dalam darah dan meracuni jantung sehingga terjadi kekurangan pasokan oksigen dan membuat kerja jantung kurang efisien (Smith, 2006).

Timah hitam (pb) terkandung dalam rokok sebanyak 0.5 µg dan merupakan komponen yang sangat berbahaya. Batas ambang timah hitam dalam tubuh sekitar 20 miligram per hari (Aditama, 1997)



Gambar 2.1 Kandungan dalam Rokok (Astuti, 2009)

2.1.3 Bahaya Asap Rokok Selama Kehamilan

Kehamilan merupakan keadaan fisiologis yang disertai dengan tingginya kebutuhan metabolisme dan peningkatan kebutuhan oksigen. Secara fisiologis, pertumbuhan plasenta dan berkembangnya

vaskularisasi saat kehamilan menciptakan lingkungan yang kaya oksigen, dan masa mitokondria yang berlimpah sehingga mendukung produksi ROS (Casanueva & Viteri, 2009).

Paparan rokok saat masa kehamilan dapat melalui dua bentuk, yaitu merokok secara aktif dan merokok pasif. Kedua bentuk paparan rokok tersebut akan berdampak buruk bagi ibu hamil dan janinnya (WHO, 2013). Pada kehamilan yang berkaitan dengan adanya paparan asap rokok berisiko terkena kerusakan oksidatif, tidak hanya disebabkan oleh peningkatan secara fisiologis kadar oksigen bebas, tetapi juga oleh radikal dalam asap rokok (Chelchowska *et al.*, 2011).

Bahan beracun pada rokok dapat dengan mudah melewati plasenta akibat memiliki berat molekul yang rendah dan sifat plasenta yang permeabel terhadap komponen rokok tersebut. Bahan tersebut secara langsung mengubah proliferasi dan diferensiasi trofoblas dan secara tidak langsung merubah sifat mekanik dari pembuluh darah vili yang berakibat pada penurunan aliran darah dalam sirkulasi umbilikus. Nikotin yang terkandung dalam rokok menekan penyerapan asam amino (AA) vili plasenta, mengikat asetilkolin (Ach) *binding site* sub unit *Alpha Nicotinic Acetyl Choline Receptors (nAChR)*. Melalui stimulasi tersebut, Ach mengontrol penyerapan nutrisi, aliran darah dan volume cairan dalam pembuluh plasenta dan vaskularisasi selama perkembangan plasenta (Jauniaux and Burton, 2007).

Dampak yang ditimbulkan pada janin berhubungan dengan risiko berat badan lahir rendah, peningkatan risiko *respiratory distress*

syndrome, defek kardiovaskular, celah bibir dan palatum, imunodefisiensi, dan peningkatan risiko SIDS (*Sudden Infant Death Syndrome*) (Liszewski *et al.*, 2007).

2.2 Radikal Bebas

Radikal bebas (bahasa Latin: *radicalis*) adalah molekul atau bagian molekul yang tidak utuh lagi karena sebagian telah pecah atau melepaskan diri kemudian akan melekat pada molekul lain dan merusak atau mengubah struktur atau fungsi molekul yang bersangkutan (Tambayong, 2000).

Radikal bebas adalah molekul yang mempunyai sekelompok atom dengan elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya dan dapat berdiri sendiri. Elektron yang tidak berpasangan ini cenderung mencari pasangan dengan cara menarik atau menyerang elektron dari senyawa lain sehingga terbentuk radikal baru. Radikal bebas akan menarik atau menyerang elektron di sekelilingnya dengan cepat sehingga bersifat sangat reaktif dan mempunyai waktu paruh yang sangat pendek. Jika radikal bebas tidak di-inaktivasi, reaktivitasnya dapat merusak seluruh tipe makromolekul seluler, termasuk karbohidrat, protein, lipid, dan asam nukleat (Clarkson & Thompson, 2000).

Radikal bebas, sering disebut Senyawa Oksigen Reaktif (SOR), juga dapat dibentuk melalui jalur enzimatis ataupun metabolik. Proses asam arakidonat menjadi prostaglandin dan prostasiklin dipacu oleh enzim lipoksigenase dan siklooksigenase (menghasilkan komponen atau senyawa oksigen reaktif berupa epoksida dan peroksida), serta oksidase (berbentuk monoamin oksidase atau aldehyd oksidase). Selanjutnya, akan

membentuk radikal anion superoksida atau hidropersida (Winarsih, 2007).

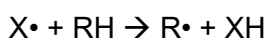
Simbol untuk radikal bebas adalah sebuah titik yang berada di dekat simbol atom (R•). ROS (*Reactive Oxygen Species*) adalah senyawa pengoksida turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif yang terdiri atas kelompok radikal bebas dan kelompok nonradikal. Kelompok radikal bebas antara lain adalah *superoxide anion* ($O_2^{\bullet-}$), *hydroxyl radicals* (OH^{\bullet}), dan *peroxyl radicals* (RO_2^{\bullet}). Yang nonradikal, misalnya *hydrogen peroxide* (H_2O_2), dan *organic peroxides* ($ROOH$) (Halliwell & Whiteman, 2004).

Tabel 2.1. Jenis *Reactive Oxygen Species* / ROS (Halliwell & Whiteman, 2004).

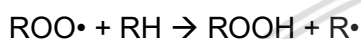
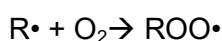
Macam-macam <i>Reactive Oxygen Species</i> / ROS	
$O_2^{\bullet-}$	Radikal superoksida (<i>Superoxide radical</i>)
OH^{\bullet}	Radikal hidroksil (<i>Hydroxyl radical</i>)
RO_2^{\bullet}	Radikal peroksil (<i>Peroxyl radical</i>)
RO^{\bullet}	Radikal alkoksil (<i>Alkoxy radical</i>)
1O_2	Oksigen tunggal (<i>Singlet oxygen</i>)
HO_2^{\bullet}	Radikal hidropersil (<i>Hydroperoxyl radical</i>)
H_2O_2	Hidrogen persida (<i>Hydrogen peroxide</i>)
$ROOH$	Persil Organik (<i>Organic Peroxyl</i>)

Proses secara keseluruhan pembentukan radikal bebas dapat digambarkan sebagai berikut:

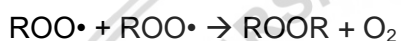
Inisiasi



Propagasi



Terminasi



Berdasarkan kimia organik, peroksida adalah suatu gugus fungsional dari sebuah molekul organik yang mengandung ikatan tunggal oksigen-oksigen (R-O-O-R'). Jika salah satu dari R atau R' merupakan atom hidrogen, maka senyawa itu disebut hidroperoksida (R-O-O-H). Prekursor molekuler dari proses inisiasi adalah produk hidroksiperoksida (ROOH), peroksidasi lipid merupakan reaksi berantai yang sangat berpotensi memiliki efek menghancurkan (Siti, 2009).

Radikal bebas akan terbentuk di dalam tubuh sebagai respons normal sistem biologis. Namun, akan bersifat sangat deskruktif terhadap sel dan jaringan apabila produksi radikal bebas tubuh tidak terkontrol. Oleh karena itu, antioksidan tubuh akan bekerja sebagai pertahanan mengatasi radikal bebas (Winarsih, 2007).

2.2.1 Sumber Radikal Bebas

Menurut Tapan (2005), reaksi pembentukan radikal bebas merupakan mekanisme biokimia tubuh yang alamiah. Radikal bebas biasanya hanya bersifat perantara yang dengan cepat diubah menjadi substansi yang tidak membahayakan tubuh. Namun, ada beberapa penyebab yang dapat meningkatkan atau memicu pembentukan radikal bebas:

a) Dari dalam tubuh:

- Proses oksidasi yang berlebihan
- Proses olahraga yang berlebihan

Latihan yang berlebihan dapat menghasilkan radikal bebas tambahan sesuai bertambahnya kebutuhan energi dan pembakaran biokimia dalam tubuh.

- Proses peradangan akibat menderita sakit kronis atau tumor/kanker

Radikal bebas aktif diproduksi dari luka atau otot yang digunakan secara berlebihan. Termasuk pada penderita diabetes yang terpapar kadar gula darah yang tinggi. Kondisi ini menghasilkan molekul oksigen yang tidak stabil terus-menerus.

- Dalam kondisi stres psikologis

b) Dari luar tubuh

- Menghirup asap rokok

Radikal bebas dari asap rokok masuk ke dalam tubuh manusia melalui saluran pernapasan. Molekul oksigen yang

tidak stabil dapat langsung merusak jaringan paru atau memicu lepasnya spesies oksigen reaktif dalam sel-sel tubuh termasuk sel darah putih.

- Menghirup udara/lingkungan yang tercemar

Udara yang tercemar menjadi radikal bebas bagi tubuh yang merusak sel-sel tubuh dengan cara menembus membran sel.

- Radiasi matahari
- Radiasi foto terapi
- Konsumsi obat-obatan termasuk kemoterapi
- Pestisida dan zat kimia pencemaran lain.

2.2.3 Sistem Pertahanan Antioksidan dan Stress Oksidatif

Produk radikal bebas atau senyawa oksigen reaktif yang berlebihan di dalam tubuh melebihi pertahanan tubuh akan menimbulkan stres oksidatif (Agarwal *et al.*, 2005). Stres oksidatif timbul akibat reaksi metabolik yang menggunakan oksigen dan mengakibatkan gangguan pada keseimbangan antara oksidan dan antioksidan sel (Halliwell, 2006). Adanya stress oksidatif yang meningkat akan berdampak buruk pada beberapa komponen penyusun membrane sel, antara lain kerusakan pada lipid membrane membentuk malondyaldehyda (MDA), kerusakan protein, karbohidrat dan DNA (Kevin *et al.*, 2006).

Tubuh dilengkapi oleh seperangkat sistem pertahanan untuk menangkal serangan radikal bebas atau oksidan sehingga dapat membatasi kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas. Adanya

potensi toksisitas senyawa radikal bebas, tubuh memiliki mekanisme sistem pertahanan alami berupa enzim antioksidan endogen yang berfungsi menetralkan dan mempercepat degradasi senyawa radikal bebas untuk mencegah kerusakan komponen makromolekul sel (Valko *et al.* 2007).

Sistem pertahanan antioksidan ini antara lain adalah enzim Superoksida Dismutase (SOD) yang terdapat di mitokondria dan sitosol, Glutathione Peroxidase (GPX), Glutathione reductase, dan catalase. Sementara itu, sistem pertahanan atau antioksidan yang berupa mikronutrien di antaranya adalah β -karoten, vitamin C, dan vitamin E (Hariyatmi, 2004). Sistem pertahanan ini bekerja dengan beberapa cara, antara lain berinteraksi langsung dengan radikal bebas, oksidan, atau oksigen tunggal, mencegah pembentukan senyawa oksigen reaktif, atau mengubah senyawa reaktif menjadi kurang reaktif (Winarsih, 2007).

Antioksidan enzimatis (*Superoxide Dismutase*) dan non-enzimatis mendetoksifikasi ROS dan RNS (*Reactive Nitrogen Species*) serta meminimalisasi kerusakan pada biomolekul. Ketidakseimbangan antara produksi ROS dan kapasitas antioksidan menyebabkan keadaan stres oksidatif yang berkontribusi pada patogenesis sejumlah penyakit dengan menimbulkan kerusakan lemak, protein, dan DNA (Wati dkk, 2013).

2.3 Antioksidan

Senyawa antioksidan secara kimia adalah senyawa pemberi elektron (*electron donors*). Secara biologis, antioksidan adalah senyawa yang mampu menangkal atau meredam dampak negatif oksidan dalam tubuh. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya

kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas oksidan dapat dihambat. Keseimbangan oksidan dan antioksidan berkaitan dengan fungsi sistem imunitas tubuh terutama untuk menjaga integritas dan berfungsinya membrane lipid, protein sel dan asam nukleat, serta mengontrol transduksi signal dan ekspresi gen dalam sel imun. Komponen terbesar yang menyusun membrane sel adalah senyawa asam lemak tak jenuh, yang sangat sensitif terhadap perubahan keseimbangan oksidan-antioksidan (Winarsih, 2007).

Antioksidan mampu menetralisasi radikal bebas dengan cara mencegah, memotong, dan memperbaiki. Pencegahan dilakukan oleh SOD (*Superoxide Dismutase*) dengan cara menghentikan pembentukan ROS (Devasagayam *et al.*, 2004).

Antioksidan diklasifikasikan menjadi antioksidan enzimatik dan antioksidan non-enzimatik. Antioksidan enzimatik yang bekerja secara langsung dalam menetralisasi ROS dan RNS adalah SOD (*Superoxide Dismutase*), katalase, glutathione peroksidase, dan glutathione reduktase. Adapun antioksidan non-enzimatik dibagi menjadi dua, yakni *metabolic antioxidants* dan *nutrient antioxidants*. *Metabolic antioxidants* dihasilkan oleh metabolisme tubuh, seperti asam lemak, glutathionin, L-arginin, koenzim Q10, melatonin, asam urat, bilirubin, dan transferin. *Nutrient antioxidants* adalah komponen yang tidak dihasilkan oleh tubuh, tetapi didapatkan dari makanan atau suplemen, seperti vitamin E, vitamin C, karotenoid, selenium, mangan, zinc, flavonoid, asam lemak omega 3, dan omega 6 (Pray-Huy *et al.*, 2008).

Antioksidan dapat menghambat reaksi oksidasi akibat radikal bebas dan menghancurkan atau menetralkan radikal bebas yang menyebabkan kerusakan sel dalam tubuh seperti DNA, protein, dan lemak yang jika dibiarkan akan menyebabkan penyakit degeneratif seperti kanker, jantung, dan penuaan dini (Sie, 2013).

2.3.1 Jenis Antioksidan

Antioksidan dikelompokkan menjadi dua, yaitu sebagai berikut:

a. Antioksidan Enzimatis

Antioksidan enzimatis disebut pula antioksidan primer (antioksidan endogenus) yang meliputi enzim SOD, katalase, dan glutathione peroksida (GSH-Px). Suatu senyawa dikatakan antioksidan primer apabila dapat memberikan atom hidrogen secara cepat kepada senyawa radikal. Kemudian, radikal antioksidan yang terbentuk berubah menjadi senyawa yang lebih stabil. Sebagai antioksidan, enzim-enzim tersebut menghambat pembentukan radikal bebas dengan cara memutus reaksi berantai (polimerasi). Kemudian, mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil. Antioksidan dalam kelompok ini disebut juga *chain-breaking-antioxidant*. Enzim katalase dan glutathione peroksidase bekerja dengan cara mengubah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 , sedangkan SOD bekerja dengan cara mengkatalisis reaksi dismutasi dari radikal anion superoksida menjadi H_2O_2 . (Winarsih, 2007).

Belleville-Nabet dalam Winarsih (2007) menyebutkan bahwa antioksidan primer bekerja dengan cara mencegah pembentukan senyawa radikal bebas baru atau mengubah radikal bebas yang telah terbentuk menjadi molekul yang kurang reaktif.

b. Antioksidan Non-enzimatis dibagi menjadi:

- Antioksidan larut lemak, seperti tokoferol, karotenoid, flavonoid, quinon, dan bilirubin.
- Antioksidan larut air, seperti asam askorbat, asam urat, protein pengikat logam, dan protein pengikat heme.

Antioksidan enzimatik dan non-enzimatik tersebut bekerja sama memerangi aktivitas senyawa oksidan dalam tubuh. Terjadinya stres oksidatif dapat dihambat oleh kerja enzim-enzim antioksidan dalam tubuh dan antioksidan non-enzimatik.

Menurut Belleville-Nabet dalam Winarsih (2007), secara fisiologis terdapat dua pertahanan tubuh. Di antaranya sebagai berikut:

- Sistem pertahanan preventif, dilakukan oleh kelompok antioksidan sekunder. Pembentukan senyawa oksigen reaktif dihambat dengan cara pengkelatan metal, atau jika sudah terbentuk, senyawa itu dirusak. Pengkelatan metal terjadi dalam cairan ekstrasel, sedangkan kerusakan senyawa oksigen reaktif terjadi di dalam sel, terutama oleh sistem enzim.
- Sistem pertahanan melalui pemutusan reaksi radikal berantai, dilakukan oleh kelompok antioksidan primer.

Antioksidan enzimatik dan non enzimatik tersebut bekerja sama memerangi aktivitas senyawa oksidan dalam tubuh. Selain antioksidan enzimatik dan non enzimatik, disebutkan terdapat antioksidan tersier yang meliputi sistem enzim *DNA-repair* dan metionin sulfoksida reduktase. Enzim-enzim ini berfungsi dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat reaktivitas radikal bebas. Kerusakan DNA yang terinduksi

senyawa radikal bebas dicirikan oleh rusaknya *single* dan *double strain*, baik gugus non basa maupun basa (Winarsih, 2007).

2.3.2 SOD

Radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh memiliki penangkal alami berupa antioksidan. Salah satu bentuk antioksidan adalah antioksidan enzimatis. Enzim antioksidan yang terdapat di dalam sel meliputi katalase, glutathione peroksidase, dan superoksida dismutase (Asayama *et al.*, 1996); copper, zinc-superoksida dismutase (Cu,Zn-SOD) (Fridovich, 1975) dan mangan superoksida dismutase (MnSOD) (Marklund, 1984) dalam (Wresdiyati, 2006).

Enzim superoksida dismutase merupakan suatu metaloenzim yang bertindak sebagai intraseluler utama yang melindungi kerusakan sel karena radikal superoksida dengan cara mengkatalisis radikal O_2^- menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan oksigen (O_2) berdasarkan reaksi $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ (Kankofer 2002).

Pemecahan radikal bebas menjadi hidrogen peroksida itu masih berbahaya, sehingga SOD bekerja sama dengan enzim glutathione peroksidase dan katalase untuk memecahnya lagi menjadi air.

Superoksida dismutase (SOD) terdapat di seluruh sel, jaringan dan cairan tubuh. Sesuai dengan lingkungan aktivitasnya, SOD memerlukan *trace mineral* tertentu yang seringkali diklasifikasikan sebagai mineral antioksidan. Di dalam mitokondria, SOD memerlukan mangan sedangkan di dalam sel SOD memerlukan tembaga dan seng (N/A, 2005)

Sejauh ini, SOD telah digunakan dalam penelitian biomedis baik in vivo maupun in vitro, baik untuk pencegahan maupun pengobatan beberapa penyakit tertentu. Cu, Zn-SOD merupakan salah satu antioksidan endogen yang berperan penting dalam mengkatalisis radikal bebas anion superoksida menjadi hidrogen peroksida dan molekul oksigen (Mates *et al.*, 1999 dalam Wrediyati, 2006).

Dengan kemajuan teknik imunositokimia, sel-sel penghasil SOD telah berhasil dideteksi pada jaringan tikus (Asayama *et al.*, 1989; Wrediyati, 1999 dalam Wrediyati, 2006). Selain terdapat pada jaringan normal, SOD juga ditemukan pada jaringan neoplastik (Keller *et al.*, 1991 dalam Wrediyati, 2006). Profil antioksidan SOD juga telah dilaporkan pada kondisi patofisiologis, seperti stres dan diabetes mellitus (Wrediyati *et al.*, 2002, Wrediyati *et al.*, 2003; Wrediyati 2003 dalam Wrediyati, 2006).

2.4 Kefir

2.4.1 Deskripsi Kefir

Kefir adalah susu yang dibuat melalui proses fermentasi menggunakan mikroba bakteri dan *yeast* (Winarno & Ivone, 2007). Yang membedakan produk susu fermentasi adalah jenis bakterinya. Kefir yang dikenal ada 2 jenis kefir, yaitu kefir yang dibuat dengan susu murni atau lemak tinggi dan dengan susu nonfat/ kefir bening (Pangkalan Ide, 2008).

Kefir merupakan minuman fermentasi yang berasal dari simbiosis antara khamir dan bakteri atau disebut juga *Kefir Grains*. Mikroorganisme yang terdapat pada *kefir grains* antara lain *Lactobacillus plantarum*

plantaricin, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus diacetylacti* (Counsens, 2003). Kefir mampu menghasilkan alkohol (etanol), karbon dioksida, asam-asam organik (laktat dan asetat), dan beberapa senyawa lainnya dari hasil penguraian gula.

Kefir memiliki beberapa keunggulan diantaranya mampu mengontrol dan menghilangkan bakteri dan yeast patogen yang ada dalam tubuh, mengontrol kadar kolesterol dengan cara melindungi dari kerusakan kardiovaskular, mengurangi risiko kanker atau tumor pada saluran pencernaan dan organ vital lainnya, dan menyembuhkan penyakit, seperti migrain, diare (Musdholifah & Elok, 2016), dan kadar alkohol yang dihasilkan relatif lebih rendah dan menjaga keseimbangan mikroflora dalam usus. Kandungan alkohol pada kefir sebesar 0,5-1% dan asam laktat 0,9-1,11% (Gaware *et al.*, 2011).

Kandungan laktosa berkurang dalam kefir dan kadar *β*-galactosidase meningkat dari hasil fermentasi, dan sedikit peningkatan proteolisis sehingga meningkatkan kandungan asam amino bebas. Kandungan protein kefir lebih mudah dicerna dan mengandung asam amino tryptophan yang memiliki efek menenangkan syaraf (relaksasi). Efek penenang kefir pada sistem syaraf ini bermanfaat mengatasi insomnia, stress, depresi dan ADHD (*Attention Deficit Hyperactive Disorder*). Perbaikan mikroflora usus dapat dilakukan melalui peningkatan mikroflora usus yang menguntungkan (bakteri asam laktat) karena dapat mensintesa vitamin-vitamin dan dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh (Pangkalan Ide, 2008).

Kandungan kefir bening setiap 227 gram, kadar energi 110 kalori, lemak 1 gram, kalsium 300-500 mg. Kandungan lain, seperti bakteri non patogen yang baik untuk ketahanan tubuh, bakteri *Lactobacillus caucanus*, garam-garam mineral, vitamin B complex dan asam laktat. Selain itu, antioksidan dan asam folat dalam kefir meningkat dibanding susu biasa. Kelebihan adalah asam yang terbentuk dapat memperpanjang masa simpan, mencegah pertumbuhan mikroorganisme pembusuk sehingga mencegah kerusakan susu, dan mencegah pertumbuhan mikroorganisme patogen sehingga meningkatkan keamanan produk kefir (Pangkalan Ide, 2008)

Tabel 2.2 Kandungan Gizi Kefir Bening per 227 gram (Pangkalan Ide, 2008)

Kandungan Gizi Kefir	
Per porsi (227 gr)	
Energi	160 kkal
Karbonhidrat	8 gr
Protein	14 gr
Lemak	3 g
Natrium	90 mg
Kalsium	300 mg
Vitamin A	500 IU
Vitamin D	100 IU

Kefir diyakini sebagai minuman yang berkhasiat multiguna. Bakteri Asam Laktat (BAL) dalam kefir berfungsi sebagai probiotik yang bermanfaat menjaga keseimbangan mikroorganisme saluran pencernaan, menurunkan produksi racun, seperti fenol, ammonia, dan nitrosamine. Kefir memiliki sistem mikroba kompleks yang tidak hanya ditemukan untuk menjadi nutrisi bermanfaat namun juga telah terbukti menghambat sejumlah patogen (Paucean and Carmen, 2008).

Kefir dapat dibuat dengan bahan baku susu sapi, kambing, domba atau kerbau, baik dalam bentuk bubuk (susu skim) maupun cair (*full-cream*, *low fat* atau *non fat*). Kefir diolah dengan menambahkan secara sengaja *kefir grains* ke dalam susu yang telah dipasteurisasi dan diperam. Konsentrasi *kefir grains* akan menentukan lama pemeraman dan keasaman yang terbentuk sehingga akan berpengaruh terhadap kualitas produk akhir yang dihasilkan. Kefir yang dibuat dari susu penuh lemak mengandung 3,5 gram lemak per 100 ml sehingga menghasilkan 62 kcal per 100 ml, kolesterol dalam lemak susu relatif rendah. Kefir mengandung 12 mg kolesterol per 100 gram (dalam minuman sekitar 3.5% kandungan lemak) (Pangkalan Ide, 2008). Kefir susu sapi memiliki kisaran kadar total asam laktat 0.42-0.52% dengan nilai pH 4.9-5.5 (Nihayah, 2015).



Gambar 2.2 Bentuk Kefir *Grains* (Leech, <https://authoritynutrition.com>)

Tabel 2.3 Kandungan Gizi Kefir per 100 gram (Jong, 2017)

Nutritional information kefir

Unit per 100 gram	Energy kcal	Energy kJ	Water g	Protein g	Carbohydrate g	Sugars g	Fat g	Saturated g	Monounsaturated g	Polyunsaturated g	Cholesterol mg	Fibers g
Kefir	63	262	86,7	3,3	4,5	-	3,5	2,0	1,0	0,0	10,0	0,0

Unit per 100 gram	Vit. A mg	Vit. B1 mg	Vit. B2 mg	Vit. B6 mg	Vit. B11 µg	Vit. B12 µg	Vit. C mg	Vit. D µg
Kefir	0,03	0,03	0,15	0,04	-	-	1,0	-

Unit per 100 gram	Sodium mg	Potassium mg	Calcium mg	Phosphorus mg	Iron mg	Magnesium mg	Copper mg	Zinc mg
Kefir	40	150	120,0	90,0	0,0	-	-	0,40

Bakteri asam laktat (BAL) yang ada pada kefir susu sapi antara lain *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium spychraerophilum* dan *Enterococcus faecalis* (Hsieh et al., 2012). BAL dalam kefir grains membutuhkan enzim yang dihasilkan khamir untuk pertumbuhan, sedangkan khamir menggunakan produk hasil fermentasi BAL sebagai sumber karbon dan energi sehingga BAL dan khamir dapat tumbuh dengan perbandingan yang seimbang (Kosikowski, 1982).

Mikroba dalam kefir memecah lemak susu, membuat kefir lebih mudah dicerna. Bakteri *Lactobacillus* dalam kefir dapat menurunkan kolesterol, dengan cara menempel pada kolesterol dan membuangnya dari dalam tubuh. Penambahan kefir grains 30 gram per liter susu dan lama pemeraman 24 jam pada suhu ruang menghasilkan kefir dengan kualitas yang sesuai dengan standar susu fermentasi (Pangkalan Ide, 2008).





Gambar 2.3 Susu Sapi dan *Kefir Grains* (Wardayati, 2012)



Gambar 2.4 Kefir Susu Sapi (Leech, <https://authoritynutrition.com>)

2.4.2 Pembuatan Kefir

Kefir sering juga disebut “Yogurt Rusia”. Di Rusia, konsumsi kefir dianggap penting karena kemampuan probiotik dan peranan sebagai penunjang kesehatan. Di negara tersebut kefir digunakan secara luas di rumah sakit dan sanatorium sebagai makanan bagi pasien yang mengalami gangguan pencernaan, arteriosklerosis, kelainan metabolisme, seperti tekanan darah tinggi, dan makanan bagi anak-anak kecil (Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pasca panen Pertanian, 2007).

Cara pembuatan kefir kurang lebih sama dengan pembuatan yogurt. Perbedaannya terletak pada bibit yang digunakan. Untuk kefir dibutuhkan biji kefir. Bibit kefir adalah campuran protein susu dan mikroba kefir berbentuk seperti biji-biji berwarna putih kekuningan, berukuran 0,1-2 cm. Biji kefir mula-mula berukuran kecil seperti biji gandum dan jika sering digunakan akan tumbuh sebesar biji kenari. Bibit kefir dapat diperoleh dengan membeli bibit kefir atau dari proses pembuatan kefir sebelumnya. Jika disimpan dengan benar, bibit kefir dapat digunakan berulang kali tanpa batas (Pangkalan Ide, 2008).

Seliter susu mula-mula dipasteurisasi yaitu dipanaskan pada suhu 85°C selama 30 menit atau pada suhu 95°C selama 5 menit, tujuannya untuk membunuh mikroba yang tidak diinginkan serta denaturasi protein sehingga memudahkan kerja mikroba selama proses fermentasi kemudian tunggu hingga dingin hingga mencapai suhu kamar (18°C - 25°C). Sejumlah biji kefir dimasukkan ke dalam susu, kurang lebih 50–60 g per liter susu. Semakin banyak biji yang ditambahkan maka proses fermentasi menjadi lebih cepat. Setelah selesai, bahan disimpan selama 24 jam sampai terjadi penggumpalan sempurna dan dapat ditingkatkan aroma dan cita rasanya dengan cara pemeraman kembali pada lemari pendingin bersuhu 8-10°C selama 15-24 jam (Pangkalan Ide, 2008).

Untuk menghasilkan kefir yang mengandung gas dan alkohol, perlu disimpan dalam wadah yang ditutup rapat (kedap udara). Jika wadah terbuka atau ditutup tak rapat, hasil kefir akan menyerupai yogurt polos. Setelah penyimpanan, dilakukan pengadukan secukupnya. Kemudian, biji kefir disaring dan dipisahkan dari kefir yang baru jadi. Kefir

tersebut dapat langsung diminum atau ditutup wadah kefir dan disimpan lagi selama 12–24 jam sebelum diminum. Setelah disaring, biji kefir dapat dimasukkan ke dalam susu yang baru. Sebelum itu, sebaiknya biji ini dibilas dengan air matang yang hangat terlebih dahulu. Cara yang lebih baru untuk membuat kefir adalah dengan menggunakan bibit serbuk kefir, seperti bibit serbuk yogurt, berasal dari campuran kefir dan biji kefir yang diliofilisasi. Kefir lebih awet dibanding yogurt dan dapat bertahan hingga sebulan lebih di lemari pendingin, tetapi jika dibiarkan di suhu normal, kefir hanya bertahan dua hari. Untuk menyimpan biji kefir dapat direndam di dalam kefir atau susu dan ditaruh dalam lemari pendingin. Setelah sekitar 10 hari hingga dua minggu berlalu, biji kefir dipindahkan ke susu yang baru untuk menjaga keaktifan mikroba kefir (Widodo, 2002).

2.4.3 Cara Penyimpanan Kefir Susu Sapi

Bibit kefir / *Kefir Grains* tidak dapat dikeringkan dengan pemanasan karena sebagian mikroorganisme di dalamnya dapat mati. Bibit kefir akan aktif jika diawetkan dengan cara pengeringan beku (*freeze drying*). Penyimpanan kefir pada suhu rendah mutlak harus dilakukan dengan tujuan untuk menghambat aktivitas Bakteri Asam Laktat (BAL) berlanjut sehingga keasaman kefir relatif stabil juga bertujuan menghambat kontaminasi bakteri patogen yang berasal dari lingkungan.

Kosikowski (1982) menyatakan penyimpanan pada suhu 4°C dapat membuat body dan tekstur kefir lebih stabil. Brewer (1994) menyatakan lama simpan kefir pada suhu rendah sekitar 10 hari. Jika berlebih maka kualitasnya akan menurun. Kefir yang dibuat dengan

konsentrasi bibit kefir 3% dengan lama simpan tiga hari akan menghasilkan kefir dengan kualitas yang sesuai dengan standar susu fermentasi. Penggunaan susu rendah lemak dengan konsentrasi *kefir grains* serta lama simpan kefir dalam suhu rendah akan berpengaruh terhadap kadar lemak, kadar protein, dan kadar alkohol kefir (Wijayanti, 2002).

2.4.4 Kefir sebagai Antioksidan

Kefir memberikan efek antioksidan yang lebih protektif dibandingkan dengan vitamin E dalam uji toksisitas dengan karbon tetraklorida (CCl₄) pada hewan percobaan (Güven & Gülmez, 2003). Penelitian lain oleh Ozcan and K, (2009) mengevaluasi efek dari suplementasi kefir pada hewan percobaan yang disebabkan stres oksidatif pada penggunaan timbal. Setelah enam minggu pengobatan, pengonsumsi kefir meningkatkan glutathione peroxidase dan mengurangi malondyaldehyda. Hasil mendukung hipotesis bahwa kefir adalah alat potensial dalam pengendalian stres oksidatif.

Liu J, (2005) mengevaluasi aktivitas antioksidan dari kefir yang dibuat pada susu kambing dan sapi, kelompok ini melaporkan bahwa besar kemampuan pengikatan kefir pada radikal 1,1diphenyl-2-pikrilhidrazil (DPPH) dan radikal superoksida. Selain menghambat peroksidasi asam linoleat, aktivitas antioksidan dari kefir dapat mengurangi kerusakan DNA, yang menjelaskan potensi antikankernya yang didukung pada penelitian Grishina Anna *et al* pada tahun 2011. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kefir memiliki kapasitas antioksidan yang secara signifikan lebih besar daripada susu. Temuan ini

menunjukkan bahwa kefir dapat mengurangi kerusakan DNA yang terjadi pada sel *colon* manusia. Data yang disajikan menunjukkan adanya potensi besar dari kefir sebagai antioksidan alami dalam diet manusia (Grishina Anna *et al.*, 2011).

Di dalam kefir terbentuk asam-asam organik yang diproduksi bakteri asam laktat yang bersifat sinergesis dengan memberikan ion H⁺ pada radikal bebas sehingga meningkatkan jumlah aktivitas antioksidan primer. Aktivitas sinergesis dapat bertindak sebagai donor hidrogen pada radikal bebas sehingga dapat meregenerasi antioksidan primer (Pratimasari, 2009). Selain itu, antioksidan sinergesis juga menyediakan suasana asam yang dapat meningkatkan kestabilan antioksidan. Meningkatnya aktivitas antioksidan pada akhir fermentasi kefir diduga akibat aktivitas khamir dan bakteri asam laktat. Khamir memiliki kemampuan menghasilkan enzim vinyl phenol reductase. Enzim vinyl phenol reductase beserta enzim ferulic acid reductase akan membentuk fenol akibat dekarboksilasi asam sinamat dan asam firulat. *Lactobacillus* juga diketahui memiliki kemampuan mendegradasi asam ferulat dan asam sinamat melalui aktivitas enzim ferulic acid reductase dan vinyl phenol reductase menjadi 4-vinyl phenol dan 4-vinyl guaiacol (Kunaepah, 2008).

Bakteri *Lactococcus spp* dan *Streptococcus thermophilus* mampu mengekspresikan aktivitas enzim antioksidan superoksida dismutase (SOD), flora bakteri tersebut terutama asam laktat dalam kefir yang bersifat homofermentatif mempunyai pengaruh positif terhadap anion

superoksida. Turunan protein dan peptida pada kefir juga menunjukkan terjadinya peningkatan aktivitas antioksidan (Kesenkaşa *et al.*, 2011).

Peptida yang berasal dari hidrolisat protein susu menghambat oksidasi lipid (Ramos and Xiong, 2001) dan susu sapi yang di fermentasikan dengan bibit kefir selama 32 jam menunjukkan hasil yang signifikan dalam menghambat peroksida asam linoleat dibandingkan susu segar (Liu J *et al.*, 2005)

2.5 Tikus (*Rattus norvegicus*)

Tikus (*Rattus norvegicus*) sering digunakan sebagai hewan percobaan. Tikus ini merupakan hewan yang berukuran lebih besar dari mencit, lebih cerdas, tenang, mudah digarap dengan perlakuan wajar, dan kurang suka berkumpul (Syamsudin, 2011).

Ciri-ciri morfologi dari tikus *Rattus norvegicus* ini antara lain memiliki berat 150-600 gram, hidung tumpul dan badan besar dengan panjang 18-25 cm, kepala dan badan lebih pendek dari ekornya, serta telinga relatif kecil dan tidak lebih dari 20-23 mm (Malole dan Pramono, 1989). Tikus sebagai hewan percobaan ini memiliki kelebihan diantaranya tidak dapat memuntahkan kembali isi perutnya karena struktur anatomi yang dimiliki tikus tidak lazim pada tempat bermuara esophagus ke dalam lambung sehingga mempermudah proses pencekakan perlakuan menggunakan sonde lambung, dan tidak mempunyai kandung empedu (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Selain itu tikus percobaan tidak pernah berhenti tumbuh, namun kecepatannya akan menurun setelah berumur 100 hari (Muchtadi *et al.*, 1993).

Volume normal lambung yang dimiliki tikus yaitu 3-5 ml. Jika volume makanan yang diberikan melebihi volume lambung, hal tersebut dapat berakibat dilatasi lambung secara akut yang dapat menyebabkan robeknya saluran cerna (Ngatidjan, 2006).

Berikut adalah klasifikasi dari tikus putih (*Rattus norvegicus*):

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Kelas : Mammalia

Ordo : Rodentia

Subordo : Odontoceti

Familia : Muridae

Genus : Rattus

Spesies : *Rattus norvegicus*

(Akbar, 2010)

Tikus ini memiliki beberapa galur yang merupakan hasil pembiakan sesama jenis atau persilangan. Salah satu galur yang sering digunakan dalam penelitian adalah galur wistar. Tikus ini memiliki telinga yang panjang, kepala yang lebar, dan ekor yang lebih pendek dibandingkan panjang badannya (Inglish, 1980).

Usia tikus dewasa berkisar pada 3-4 bulan, kebanyakan tikus mulai kawin pada usia 8-9 minggu dengan masa kebuntingan 21-22 hari. Siklus reproduksi pada mamalia (primata) disebut dengan siklus menstruasi, sedangkan siklus reproduksi pada non-primata (tikus) disebut estrus. Tikus kawin saat tikus betina pada fase ini. Fase estrus berlangsung sekitar 4-5 hari dan segera sesudah beranak (Post-partum

estrus) (Partodihardjo, 1992). Setiap siklus estrus berlangsung selama 12 jam. Fase estrus dapat diketahui dengan adanya sel-sel tanduk yang banyak pada lumen vagina yang biasanya nampak pada preparat ulas vagina (Baker *et al*, 1980)

Tikus bersifat poliestrus, yang mana hewan ini memiliki siklus birahi lebih dari dua kali dalam satu tahun. Perkawinan yang terjadi dalam jangka waktu 24 jam, hal ini dapat diketahui dengan mengamati sumbat vagina yang merupakan penggumpalan air mani dan berasal dari sekresi kelenjar khusus betina atau dapat memeriksa adanya spermatozoa dalam sediaan apusan vagina tikus betina (Malole dan Pramono, 1989). Jumlah anak tikus yang dilahirkan sekitar 6-12 ekor, dengan berat badan lahir antara 5-6 gram dan memiliki kecepatan tumbuh 5 gram/hari (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

Tikus betina akan menjilat vulvanya sebelum anaknya lahir, selanjutnya tikus tersebut akan menarik anaknya keluar dari vulva dengan mulutnya. Setelah itu, betina akan memakan plasenta sebelum menjilat anaknya sampai kering dan akan mengumpulkan semua anaknya sesudah yang terakhir lahir (Malole dan Pramono, 1989).

Cara penentuan fase estrus pada tikus betina ditandai dengan tikus percobaan tampak gelisah, adanya kemerahan, pembengkakan, dan alat kelamin luar yang hangat. Pada fase estrus ini dilakukan pengawinan dengan tikus jantan. Jika keesokan harinya ditemukan sumbat vagina, berarti tikus telah mengalami kopulasi dan berada pada kehamilan nol (Oktavianis, 2011).



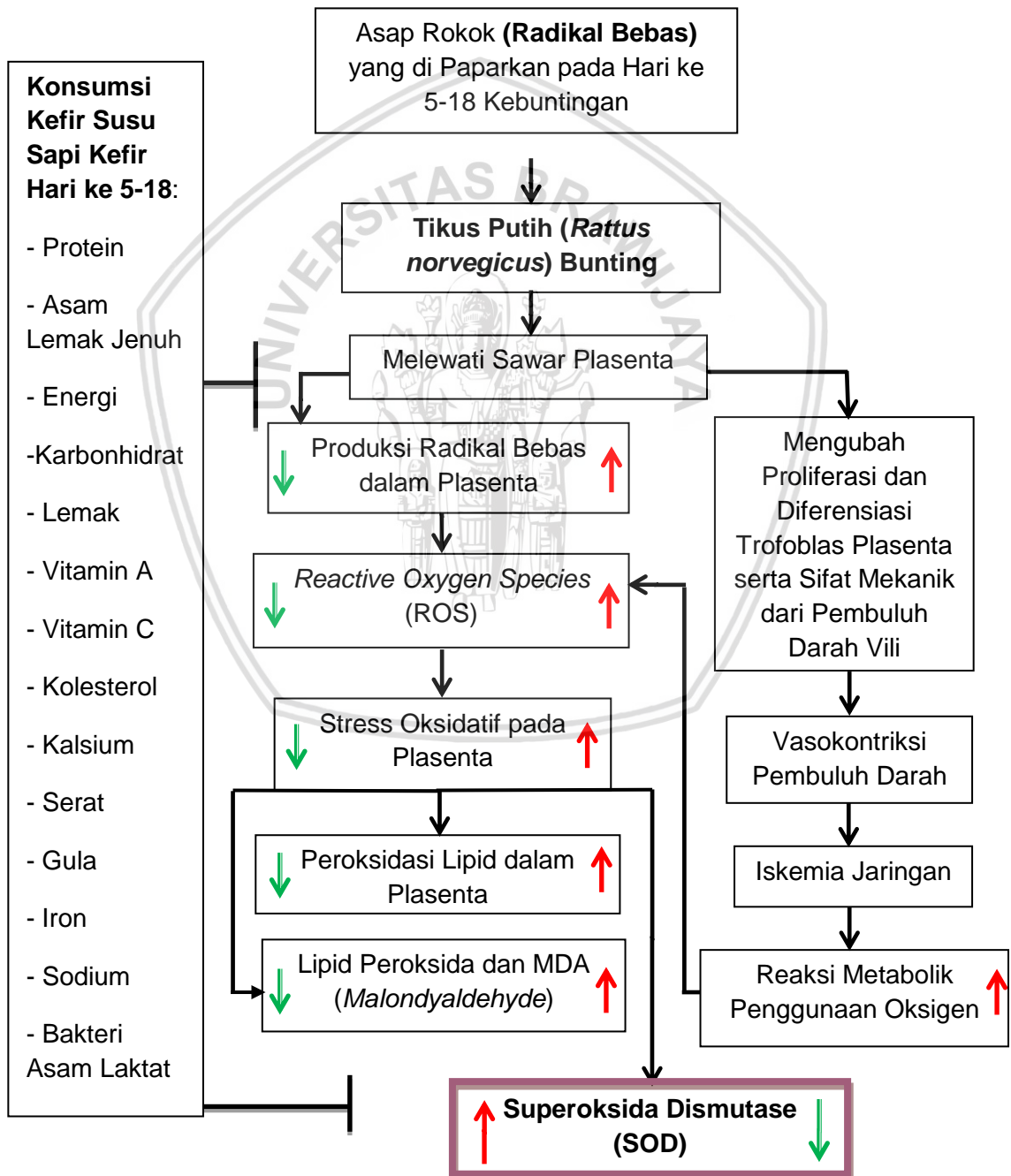
Gambar 2.5 Tikus (*Rattus norvegicus*) Putih (Akbar, 2010)








BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

	Variabel yang tidak diteliti		Meningkat
	Variabel yang diteliti		Menurun
	Menghambat		

Keterangan Kerangka Konsep:

Asap rokok mengandung bahan kimia beracun, karsinogenik, mutagenik, maupun radikal bebas yang stabil dan tidak stabil serta ROS yang dapat menyebabkan kerusakan oksidatif biologi (Valavanidis, 2009). Kandungan tersebut di antaranya adalah nikotin, tar, karbon monoksida dan timbal. Kandungan zat yang ada dalam rokok mengandung sekitar 4000 komponen kimia, di antaranya mengandung ROS (*Reactive Oxygen Species*), seperti peroksinitrat dan senyawa organik dari radikal bebas (Nopya, 2013).

Apabila asap rokok tersebut masuk ke dalam tubuh ibu hamil, maka akan berdampak bagi kesehatan ibu dan keberlangsungan hidup janinnya. Bahan-bahan tersebut secara langsung mengubah proliferasi dan diferensiasi trofoblas dan secara tidak langsung merubah sifat mekanik dari pembuluh darah vili yang berakibat pada penurunan aliran darah dalam sirkulasi umbilikus dan vasokonstriksi pembuluh darah sehingga timbul ketidakcukupan suplai darah ke jaringan atau organ tubuh pada jaringan (iskemia). Hal tersebut dapat mencetuskan kejadian stres oksidatif pada plasenta, kerusakan oksidatif merupakan kerusakan biomolekul penyusun sel yang disebabkan oleh reaksinya dengan radikal bebas yang akan menghasilkan lipid peroksida, salah satunya adalah

malondyaldehida (MDA) serta disertai kerusakan lemak, protein, dan DNA (Wati dkk, 2013).

Superoksida dismutase adalah salah satu antioksidan enzimatis yang mendetoksifikasi ROS dan RNS (*Reactive Nitrogen Species*) serta meminimalisasi kerusakan pada biomolekul. ROS akan membentuk radikal anion superoksida atau hidroperoksida (Winarsih, 2007).

Ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan tubuh tersebut yang membuat adanya masalah, yang mana tubuh membutuhkan pertahanan untuk menangkal radikal bebas yang berlebih tersebut. Sistem pertahanan SOD ini bekerja dengan beberapa cara, antara lain berinteraksi langsung dengan radikal bebas, oksidan, atau oksigen tunggal, mencegah pembentukan senyawa oksigen reaktif, atau mengubah senyawa reaktif menjadi kurang reaktif (Winarsih, 2007).

Kefir susu sapi dapat menjadi antioksidan tambahan yang dapat menetralisasi radikal bebas yang berlebih dalam tubuh. Di dalam kefir terbentuk asam-asam organik yang diproduksi bakteri asam laktat yang bersifat sinergis dengan memberikan ion H⁺ pada radikal bebas sehingga meningkatkan jumlah aktivitas antioksidan primer. Aktivitas sinergis dapat bertindak sebagai donor hidrogen pada radikal bebas sehingga dapat meregenerasi antioksidan primer (Pratimasari, 2009).

Selain itu, antioksidan sinergis juga menyediakan suasana asam yang dapat meningkatkan kestabilan antioksidan. Bakteri *Lactococcus spp* dan *Streptococcus thermophilus* di dalam kefir mampu mengekspresikan aktivitas enzim antioksidan superoksida dismutase (SOD), flora bakteri tersebut terutama asam laktat dalam kefir yang

bersifat homofermentatif mempunyai pengaruh positif terhadap anion superoksida. Turunan protein dan peptida pada kefir juga menunjukkan terjadinya peningkatan aktivitas antioksidan (Kesenkasa *et al.*, 2011).

Peptida yang berasal dari hidrolisat protein susu menghambat oksidasi lipid (Ramos and Xiong, 2001) dan susu sapi yang di fermentasikan dengan bibit kefir selama 32 jam menunjukkan hasil yang signifikan dalam menghambat peroksida asam linoleat dibandingkan susu segar (Liu J *et al.*, 2005)

3.2 Hipotesis Penelitian

Pemberian kefir susu sapi dapat mencegah penurunan aktivitas SOD (*Superoxide Dismutase*) plasenta tikus putih (*Rattus norvegicus*) bunting dengan paparan asap rokok.

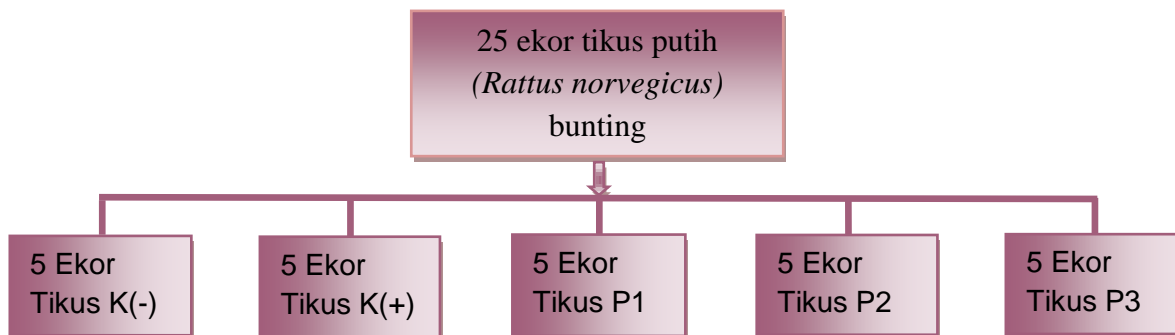
BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian menggunakan desain *True Experimental* dengan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group Design*. Pada penelitian ini hewan coba akan dibagi menjadi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (K-) dan kelompok kontrol positif (K+). Kelompok kontrol negatif (K-) adalah tikus bunting yang tidak diberikan paparan asap rokok dan tidak diberikan kefir susu sapi, sedangkan kelompok kontrol positif (K+) adalah tikus bunting yang hanya dipapar asap rokok tanpa diberikan kefir susu sapi. Kelompok perlakuan terdiri dari tiga kelompok, diberikan perlakuan paparan asap rokok dan diberikan kefir susu sapi dengan dosis yang berbeda.

Paparan asap rokok dan pemberian kefir susu sapi dilakukan mulai hari ke-5 sampai hari ke-18 kebuntingan. Pengukuran aktivitas SOD plasenta akan dilakukan pada hari ke-19 kebuntingan. Penilaian dilakukan pada *post test* dengan membandingkan aktivitas SOD (*Superoxide Dismutase*) plasenta pada tikus bunting kelompok kontrol dan perlakuan.



K(-) = Kelompok kontrol negatif dengan (n=5); sampel tanpa diberikan paparan asap rokok dan kefir susu sapi.

K(+) = Kelompok kontrol positif dengan (n=5); sampel diberikan paparan asap rokok tanpa diberikan kefir susu sapi pada hari ke 5 sampai 18 kebuntingan.

P1 = Kelompok perlakuan 1 dengan (n=5); sampel di berikan paparan asap rokok dan kefir susu sapi dengan dosis 2,5 ml/kgBB pada hari ke 5 sampai 18 kebuntingan.

P2 = Kelompok perlakuan 2 dengan (n=5); sampel diberikan asap rokok dan kefir susu sapi dengan dosis 5 ml/kgBB pada hari ke 5 sampai 18 kebuntingan.

P3 = Kelompok perlakuan 3 dengan (n=5); sampel diberikan asap rokok dan kefir susu sapi dengan dosis 10 ml/kgBB pada hari ke 5 sampai 18 kebuntingan.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan tikus putih jenis *Rattus norvegicus* strain *wistar* betina yang sehat sebagai hewan coba dan sebelum diberi beberapa perlakuan akan dikawinkan terlebih dahulu dengan tikus jantan

agar terjadi kehamilan. Tikus diperoleh dan dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Jumlah sampel tikus yang digunakan pada penelitian ini adalah jumlah pengulangan (n) untuk masing-masing perlakuan (p) yang dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Solimun, 2001) dengan p=5 adalah:

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20 : 5$$

$$n \geq 4$$

Dari perhitungan didapatkan $n \geq 4$, maka dilakukan minimal 4 jumlah sampel untuk setiap kelompok. Dalam penelitian ini menggunakan 5 ekor tikus bunting untuk setiap kelompok sehingga sampel secara keseluruhan berjumlah 25 ekor.

4.2.1 Kriteria Inklusi

- Jenis tikus *Rattus norvegicus strain wistar* betina yang sedang bunting.
- Tikus dalam keadaan yang sehat, ditandai dengan bulu bersih dan tidak rontok, nafsu makan baik, serta keaktifan normal.
- Usia tikus minimal 8 – 9 minggu
- Berat badan sekitar 130-160 gram

4.2.2 Kriteria Ekslusi

- a. Tikus yang kondisinya menurun dan atau mati selama penelitian.
- b. Tikus yang cepat melahirkan (keguguran atau prematur).

4.2.3 Prosedur dan Teknik Pengambilan Sampel

Penentuan subjek penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL), yaitu dalam pengelompokan dan pemberian perlakuan menggunakan teknik randomisasi sederhana. Setiap hewan percobaan mempunyai peluang yang sama untuk dijadikan sampel pada kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol.

4.3 Variabel penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (Variabel Independent)

- a. Kefir susu sapi dengan dosis yang berbeda, yaitu dosis 1 (2,5 ml/kgBB), dosis 2 (5 ml /kgBB), dan dosis 3 (10 ml/kgBB)
- b. Paparan Asap Rokok Subakut

4.3.2 Variabel Terikat (Variabel Dependent)

Pencegahan penurunan aktivitas Superoksida Dismutase (SOD) pada plasenta tikus putih bunting.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan kurang lebih 3 bulan sejak bulan oktober hingga awal januari 2017.

4.5 Bahan dan Alat/ Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan untuk Pemeliharaan Hewan Coba

a. Makanan hewan coba adalah makanan pakan standart.

Bahan makanan tikus dari beberapa penelitian sebelumnya, diketahui bahwa kebutuhan makan tikus per ekor setiap harinya adalah 40 gram yang terdiri dari comfeed PARS Broiler 1 (BR1), terigu dan air. Dengan perbandingan BR1 dan terigu sebesar 3:1 dan dicampur air secukupnya.

b. Minuman hewan coba adalah air mineral.

4.5.2 Bahan untuk Perlakuan Hewan Coba

a. Rokok

Paparan asap rokok menggunakan asap rokok kretek.

b. Kefir Susu Sapi

Bibit kefir dan susu sapi murni yang telah di pasteurisasi. Kefir susu sapi dibeli dalam keadaan sudah jadi di salah satu agen pembuatan kefir susu sapi di kota Malang.

4.5.3 Bahan untuk Pembedahan Hewan Coba

a. Ketamin 0,1-0,2 cc

4.5.4 Bahan untuk Pemeriksaan SOD

a. Xantin

- b. Xantin oksidase
- c. PBS (Phosfat Buffer Saline)
- d. NBT
- e. EDTA

4.5.5 Alat Pemeliharaan Hewan Coba

Alat untuk pemeliharaan hewan coba menggunakan kandang tikus yang berupa box plastik dengan ukuran 31,5 x 23 x 9 cm sejumlah 1 buah yang diisi dengan sekam dan ditutup dengan kawat kasa dan diberikan tempat minum tikus, setiap kandang berisi 1 ekor tikus betina bunting.

4.5.6 Alat untuk Penimbangan Berat Badan Hewan Coba

Neraca Ohaus merek Sartorius.

4.5.7 Alat untuk Pembuatan Kefir Susu Sapi

Beli dalam keadaan sudah jadi.

4.5.8 Alat untuk Pemberian Kefir Susu Sapi

Pemberian kefir susu sapi menggunakan sonde yang dimasukkan ke dalam mulut sampai lambung tikus dan spuit 3 ml.

4.5.9 Alat untuk Pemaparan Asap Rokok pada Hewan Coba

Alat untuk pemaparan asap rokok pada hewan coba menggunakan *smooking 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 cm³. Pada setiap ruangan terdapat pipa

sebagai pengalih asap rokok. Ketiga pipa keluar menyatu dengan pipa yang telah 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, 2006).

4.5.10 Alat untuk Pembedahan dan Pengambilan Plasenta

- a. Kapas
- b. Scalpel
- c. Gunting
- d. Pinset
- e. Jarum Pentul
- f. Alas Kayu
- g. Handscoon

4.5.11 Alat untuk Pengukuran SOD

- a. Pipet
- b. Timbangan
- c. Centrifuge
- d. Tabung reaksi
- e. Air
- f. Spektofotometer
- g. Vortex
- h. Micropipette
- i. Glass wool
- j. Seperangkat tabung reaksi

4.6 Definisi Operasional

a. Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar bunting dengan usia 8-9 minggu dengan berat badan 130-160 gram.

b. Tikus Bunting

Tikus bunting yang dimaksud pada penelitian adalah tikus betina putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang telah dikawinkan dengan tikus jantan dengan jenis yang sama dan ditandai dengan adanya tanda-tanda kehamilan yaitu sumbat vagina (*vagina plaque*) yang merupakan penggumpalan air mani tikus jantan pada vagina tikus betina (Kaufman, 1992)

c. Usia Kebuntingan Tikus

Usia kebuntingan tikus percobaan dihitung sejak hari pertama kali muncul adanya *vagina plaque* sampai hari ke-19.

d. Asap Rokok

Pemaparan asap rokok bersifat subakut dimulai dari hari ke-5 sampai hari ke-18 menggunakan rokok kretek dibantu sebuah alat bernama *smoking pump* milik Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, paparan asap rokok akan dilakukan 1x/hari sejumlah 1 batang rokok selama 7.5 menit (Gamagita, 2016).

e. Kefir Susu Sapi

Kefir susu sapi yang digunakan merupakan produk jadi yang diperoleh dari iBiKK Susu Fementasi Fakultas Peternakan Universitas

Brawijaya Kota Malang. Kefir susu sapi tersebut terdiri dari susu yang diperoleh dari Koperasi Jabung yang kemudian ditambahkan bibit kefir.

Penggunaan kefir susu sapi tersebut diganti setiap lima hari sekali karena adanya perbedaan kandungan total bakteri dan protein di dalam kefir susu sapi (BPKI, 2017)

Tabel 4.1 Jumlah bakteri dan protein hari ke-1 dan hari ke-5 kefir susu sapi. (Balai Penelitian dan Konsultasi Industri Laboratorium, 2017)

	Hari ke-1	Hari ke-5
TPC (<i>Total Plate Count</i>)	3,8 x 10 ⁷ kol/gr	2,6 x 10 ⁷ kol/gr
Protein	4,88 %	4,91%

Kefir susu sapi diambil menggunakan spuit 3 ml dan diberikan per oral menggunakan sonde pada tiga kelompok perlakuan tikus bunting dengan dosis yang berbeda. Diantaranya dengan dosis 2,5 ml/kgBB, 5ml/kgBB, 10ml/kgBB dimulai pada hari ke-5 sampai hari ke-18 kebuntingan.

f. SOD

Superoksida Dismutase adalah salah satu antioksidan enzimatik yang berada pada tubuh makhluk hidup. SOD dapat diukur dengan metode NBT (*NitroBlue-Tetrazolium*) dalam satuan U/200mg. Hasil pengukuran aktivitas SOD pada penelitian diambil dari plasenta tikus (*Rattus norvegicus*) bunting yang dipapar asap rokok.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Cara Kerja

4.7.1.1 Aklimatisasi Hewan Coba

Aklimatisasi hewan coba dilakukan selama tujuh hari terhadap kondisi air, makanan dan suhu di dalam Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

4.7.1.2 Pembagian Kelompok Hewan Coba

1. Kelompok Kontrol

- a. K(-) = Kelompok kontrol negatif dengan (n=5); sampel tanpa diberikan paparan asap rokok dan kefir susu sapi.
- b. K(+) = Kelompok kontrol positif dengan (n=5); sampel diberikan paparan asap rokok tanpa diberikan kefir susu sapi pada hari ke 5 sampai 18 kebuntingan.

2. Kelompok Perlakuan

- a. P1 = Kelompok perlakuan 1 dengan (n=5); sampel di berikan paparan asap rokok dan kefir susu sapi dengan dosis 2,5 ml/kgBB pada hari ke 5 sampai 18 kebuntingan.
- b. P2 = Kelompok perlakuan 2 dengan (n=5); sampel diberikan asap rokok dan kefir susu sapi dengan dosis 5 ml/kgBB pada hari ke 5 sampai 18 kebuntingan.
- c. P3 = Kelompok perlakuan 3 dengan (n=5); sampel diberikan asap rokok dan kefir susu sapi dengan dosis 10 ml/kgBB pada hari ke 5 sampai 18 kebuntingan.

4.7.1.3 Prosedur Pembuntingan Hewan Coba

Waktu kawin tikus dilakukan pada fase estrus yang ditandai dengan keinginan untuk kopulasi antara tikus betina dan jantan. Pengawinan dilakukan dengan mencampur tikus betina dan jantan didalam kandang yang sama. Fase estrus dapat dirangsang dengan menggunakan rangsangan feromon. Sinkronisasi fase estrus ini dilakukan dengan cara memaparkan urin tikus jantan pada tikus betina, hal ini dapat dilakukan dengan memindahkan sekam yang berasal dari kandang tikus jantan ke kandang tikus betina (Meziana, 2007).

Setelah tikus betina dipastikan dalam fase estrus, perkawinan mulai dilakukan dengan mencampur tikus betina dan tikus jantan dengan perbandingan 1:1. Hal ini dilakukan hingga keesokan harinya. Pada pagi hari akan dilakukan pemeriksaan *vaginal plug*. Apabila ditemukan adanya *vaginal plug* pada alat kelamin tikus betina, maka hari tersebut dihitung sebagai hari pertama kebuntingan (Kaufman, 1992)

Tikus yang telah bunting diberi label (*permanent board marker*) pada ekor dan dimasukkan ke dalam box dengan kelompok-kelompok yang sama, sedangkan yang belum bunting dicampur kembali dengan tikus jantan sampai terjadi kebuntingan pada malam selanjutnya dan pada pagi hari keesokan harinya akan diperiksa lagi *vaginal plug* pada tikus betina (Samsuria, 2009).

4.7.1.4 Pemeliharaan Hewan Coba

Hewan coba dipelihara dan diadaptasikan dengan lingkungan laboratorium selama tujuh hari pada temperature ruangan yang konstan.

Hewan coba dipelihara di kotak plastik ukuran 31,5 x 23 x 9 cm sejumlah 1 buah cm yang ditutup dengan tutup kawat dan sekam yang akan diganti setiap hari senin dan kamis. Setiap kandang ditempati oleh 1 ekor tikus bunting dan diberi makan sejumlah 40gr/hari/ekor.

4.7.1.5 Penentuan Dosis Kefir Susu Sapi

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Fahmy H.A, Amel F.M, Ismail pada *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* yang berjudul *Gastroprotective effect of kefir on ulcer induced in irradiated rats* telah terbukti bahwa kandungan yang terdapat pada kefir susu sapi mampu menjadi antioksidan dan didalam jurnal dikatakan bahwa kefir susu sapi juga mampu menjadi *anti-apoptotic* dan *radio-protective activities* yang hasilnya ($p < 0,05$) dengan dosis kefir susu sapi 5ml/kgBB yang diberi pada tikus. Dengan acuan jurnal tersebut, maka peneliti memutuskan untuk menggunakan dosis sebesar 2,5 ml/kgBB, 5 ml/kgBB, dan 10ml/kgBB pada tiga kelompok perlakuan.

4.7.1.6 Pemberian Kefir Susu Sapi

Kefir susu sapi diberikan pada hari ke-5 sampai hari ke-18 kebuntingan secara peroral menggunakan sonde.

4.7.1.7 Pemaparan Asap Rokok pada Hewan Coba

Pemaparan asap rokok dilakukan pada hari ke-5 sampai hari ke-18 kebuntingan setelah pemberian kefir susu sapi. Papanan rokok sejumlah 1 batang/hari selama 7,5 menit. Prosedur pemaparan asap rokok sesuai standar pemaparan asap rokok di Laboratorium Farmakologi FKUB, sebagai berikut:

1. Tikus ditimbang berat badannya dengan neraca Ohaus sebelum dipapar asap rokok.
2. Tempat pemaparan dibersihkan dari kotoran dan sisa asap.
3. Nikotin yang masih melekat di *smoking pump* dibersihkan terlebih dahulu.
4. Power dan *self voltage* diperiksa.
5. Rokok dipasang pada pipa sampai batas merah.
6. Tiga ekor dimasukkan ke dalam kotak dan segera ditutup (*Smoking pump*).
7. Setiap pemaparan asap rokok dilakukan dengan menjalankan pompa selama 7,5 menit, kemudian alat dimatikan, tutup dibuka dan selanjutnya tikus segera dipindahkan ke kandang semula.
8. Setiap pemaparan berikutnya kotak selalu dibersihkan dari sisa asap rokok perlakuan sebelumnya.
9. Pompa tetap dijalankan tanpa rokok untuk mengeluarkan sisa asap.
10. Langkah-langkah diatas diulangi untuk kelompok tikus berikutnya sampai semua tikus mendapat perlakuan yang sama.

4.7.1.8 Pengambilan Plasenta

Pada hari ke-19 kebuntingan dilakukan pembedahan, pengambilan plasenta, serta pengukuran aktivitas SOD (U/200mg) pada semua tikus kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Sebelum tikus dibedah, tikus dikorbankan dengan cara disuntikkan ketamin 0,1-0,2 ml ke paha tikus secara *intramuscular* dan ditunggu sampai tikus lemas tetapi jantung masih berdetak. Selanjutnya tikus dibedah dan diambil organ plasentanya. Setelah plasenta tikus diambil lalu dilakukan pembuatan SOD plasenta, hal ini dilaksanakan di Laboratorium

Farmakologi FKUB. Kemudian pembuatan SOD yang sudah jadi dibawa ke Biomedik FKUB untuk dilakukan pengukuran aktivitas SODnya.

4.7.1.9 Perlakuan Hewan Coba Sesudah Penelitian

Induk tikus dan anak tikus yang telah di bedah dan tidak digunakan dikuburkan dengan baik sesuai prosedur. Penguburan dilakukan oleh petugas Laboratorium Farmakologi FKUB.

4.8.1.10 Pengukuran SOD

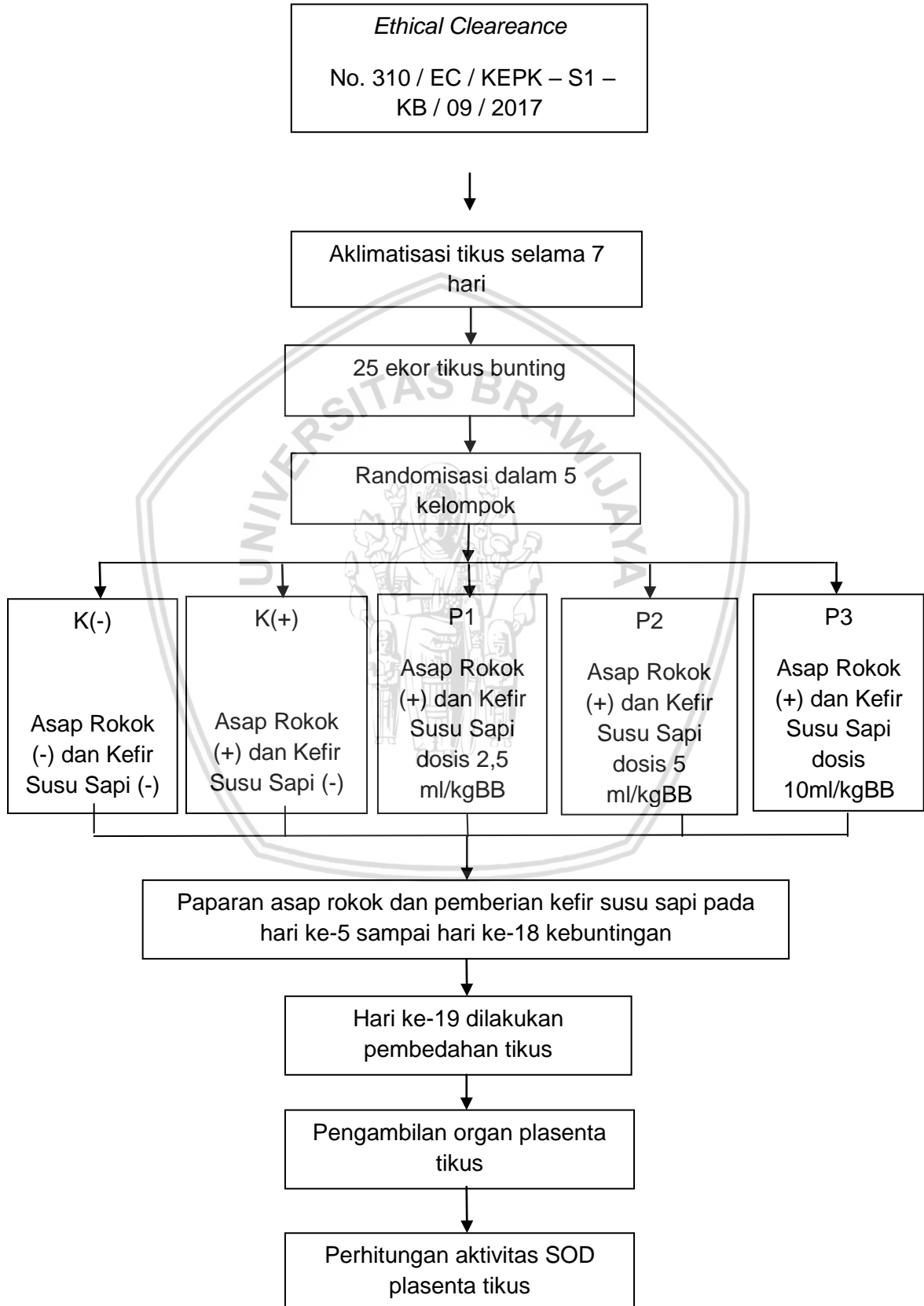
- a. Setelah plasenta diambil,
- b. Timbang plasenta 200 mg untuk masing-masing kelompok.
- c. Homogenasi dengan cara dicacah dan digerus halus memakai mortar. Encerkan dengan PBS agar plasenta tercampur menjadi larutan
- d. Tambahkan PBS pada sampel dengan perbandingan 1:1, tampung dalam ependorf kemudian divortex.
- e. Sentrifuse dingin 4000rpm 4°C selama 15 menit untuk menurunkan endapan.
- f. Ambil supernatant, masukkan dalam tabung reaksi lalu tambahkan reagen EDTA 100 mm 200µL, NBT 25 unit 100µL, Xantin 25 mm 100µL dan XO 1 unit 100µL, tambahkan PBS hingga menjadi 1 ml.
- g. Inkubasi pada suhu 37°C kurang lebih 30 menit.
- h. Sentrifuse 3000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang.
- i. Ambil larutan tanpa koloid.
- j. Tambahkan aquadest hingga menjadi 3 cc dan baca absorbansi dengan spektrofotometer dengan λ 580 nm.

Penentuan aktivitas enzim SOD dilakukan dengan metode konvensional berdasarkan protokol yang mempunyai dasar teori sebagai berikut: metoda spektrofotometri dengan menginduksi radikal superoksida yang dihasilkan dari reaksi antara xantin dan xantin oksidase. Apabila xantin direaksikan dengan enzim xantin oksidase akan terbentuk radikal bebas superoksida ($O_2^{\bullet-}$). Superoksida akan mereduksi NBT (*NitroBlue Tetrazolium*) menjadi formazan berwarna ungu kebiruan. SOD yang terdapat dalam sampel akan berkompetisi dengan NBT untuk bereaksi dengan radikal superoksida yang akan menghambat pembentukan warna. Warna yang terbentuk diukur dengan spektrofotometer pada $\lambda = 580$ nm.

Kepekatan warna sampel menunjukkan jumlah enzim SOD dalam sampel tersebut. Semakin ungu kebiruan warna sampel maka semakin tinggi absorbansi formazan dan semakin rendah aktivitas SOD dalam sampel, sedangkan semakin muda warna ungu sampel maka semakin rendah absorbansi formazan dan semakin tinggi aktivitas SOD dalam sampel.

Pengukuran aktivitas SOD dilakukan secara tidak langsung, karena yang diukur dengan spektrofotometer adalah absorbansi formazan. Kemudian ditentukan aktivitas SOD dengan menggunakan kurva standar SOD.

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Skema Alur Penelitian

4.9 Analisis Data

Hasil pengukuran SOD plasenta tikus antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dianalisa secara statistik menggunakan program SPSS 16.0 for Windows 10 dengan tingkat signifikansi sebesar 0,005 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan sebesar 95% ($\alpha = 0,05$). Berikut merupakan langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif:

1. Uji Normalitas Data: uji ini bertujuan untuk mengetahui apakah data bersifat normal atau tidak. Hal ini dikarenakan pemilihan data dan uji hipotesis tergantung pada normal atau tidaknya distribusi normal. Jika data terdistribusi secara normal maka menggunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Namun, jika data terdistribusi secara tidak normal maka menggunakan median dan minimum-maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran pada penyajian data. Untuk uji hipotesis, jika sebaran data normal maka menggunakan uji parametrik. Sedangkan jika sebaran data tidak normal maka menggunakan uji non parametrik.
2. Uji Homogenitas Varian: 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, maka Anova dapat digunakan.
3. Uji *One Way Anova* (Analisis varian satu arah): uji ini bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui terdapat minimal dua kelompok yang berbeda signifikan.

4. *Post Hoc Test* (Uji Tukey-HSD): uji ini bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda signifikan dari hasil uji tes Anova. Uji Post Hoc yang digunakan adalah uji Tukey dengan tingkat kemaknaan 95% ($p < 0,05$).
5. Uji Korelasi *Pearson*: uji ini digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara dua variabel penelitian (*Dose Effect Relationship*) antara kefir susu sapi dengan aktivitas SOD.
6. Uji Regresi Linear: uji ini untuk mengetahui persentase aktivitas SOD yang dipengaruhi oleh kefir susu sapi.



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

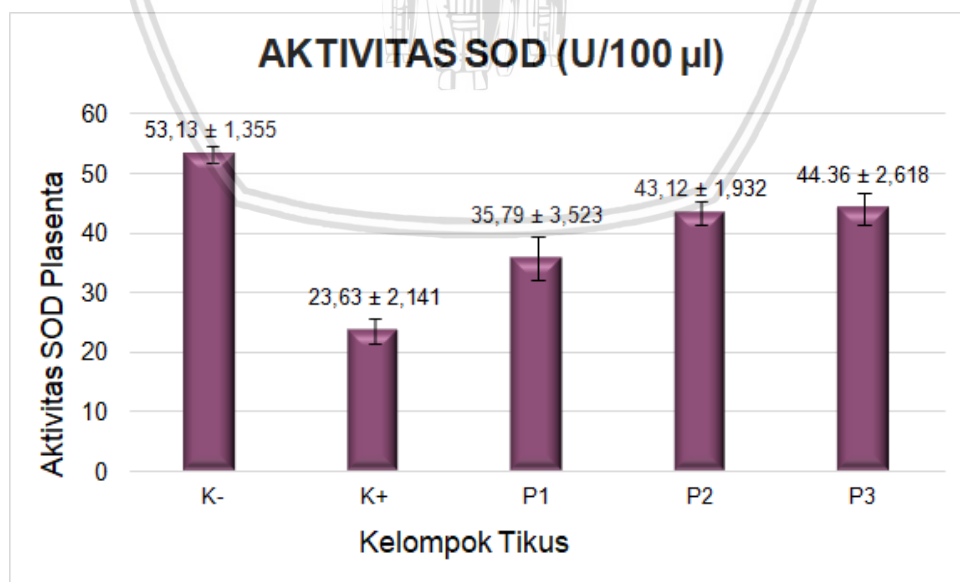
Pada penelitian ini total sampel dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (K-) adalah kelompok tikus bunting yang tidak mendapatkan kefir susu sapi dan paparan asap rokok, kelompok kontrol positif (K+) adalah kelompok tikus bunting yang hanya mendapatkan paparan asap rokok tanpa kefir susu sapi, kelompok perlakuan 1 (P1) adalah kelompok tikus bunting yang mendapatkan kefir susu sapi dengan dosis 2,5 ml/kgBB dan paparan asap rokok, kelompok perlakuan 2 (P2) adalah kelompok tikus bunting yang mendapatkan kefir susu sapi dengan dosis 5 ml/kgBB dan paparan asap rokok, kelompok perlakuan 3 (P3) adalah kelompok tikus bunting yang mendapatkan kefir susu sapi dengan dosis 10ml/kgBB dan paparan asap rokok.

Kefir susu sapi diberikan sesuai dosis per kg BB tikus dan asap rokok dipaparkan 1 batang/hari selama 7,5 menit yang dilakukan sejak hari 5 hingga hari ke 18 kebuntingan. Pada hari ke 19 kebuntingan dilakukan pembedahan untuk mengambil sampel plasenta dan dilakukan perhitungan aktivitas SOD plasenta. Jumlah sampel yang dibedah dan diuji aktivitas SOD plasentanya sebanyak 24 sampel, pada kelompok kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan 1 dan perlakuan 2 masing-masing sebanyak 5 sampel, sedangkan pada kelompok perlakuan 3 sebanyak 4 sampel yang dapat dievaluasi.

Hasil pengukuran aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) dapat dilihat pada tabel dan gambar berikut ini:

Tabel 5.1 Hasil Aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) Plasenta Tikus Putih Bunting dari Beberapa Kelompok Kontrol dan Perlakuan Kefir Susu Sapi yang di Papar Asap Rokok

Kelompok	(n)	Aktivitas SOD (U/200mg)
		Rata-rata Aktivitas SOD \pm Std. Deviasi
K-	5	53,13 \pm 1,355
K+	5	23,63 \pm 2,141
P1	5	35,79 \pm 3,523
P2	5	43,12 \pm 1,932
P3	4	44,36 \pm 2,618



Gambar 5.1 Hasil Aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) Plasenta Tikus Putih Bunting dari Beberapa Kelompok Kontrol

dan Perlakuan Kefir Susu Sapi yang di Papar Asap Rokok

Keterangan:

- a. Kelompok Kontrol Negatif (K-): Tanpa dipapar asap rokok dan tanpa kefir susu sapi
- b. Kelompok Kontrol Positif (K+): Dipapar asap rokok tanpa kefir susu sapi
- c. Kelompok Perlakuan 1 (P1): Dipapar asap rokok dan diberi kefir susu sapi dengan dosis 2,5 ml/kgBB
- d. Kelompok Perlakuan 2 (P2): Dipapar asap rokok dan diberi kefir susu sapi dengan dosis 5 ml/kgBB
- e. Kelompok Perlakuan 3 (P3): Dipapar asap rokok dan diberi kefir susu sapi dengan dosis 10ml/kgBB

Analisis data dilakukan dengan menggunakan program komputer SPSS (*Statistical Product and Service Solution*) 16.0 for windows. Analisis data yang digunakan adalah metode *One way Anova*. Syarat menggunakan metode *One Way Anova* adalah sebaran data harus normal pada uji normalitas dan varian data harus sama pada uji homogenitas. Berdasarkan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* didapatkan nilai signifikan pada kelima kelompok di atas 0,05 ($p > 0,05$), artinya sebaran data pada penelitian ini normal (**lampiran 3**) sedangkan uji homogenitas menggunakan *Levene statistic* didapatkan nilai sig 0,359 ($p > 0,05$) artinya varians data antar kelompok sama (**lampiran 3**). Dengan hal tersebut, maka uji *One Way Anova* dapat dilakukan.

Dari hasil perhitungan statistika menggunakan metode analisis *One Way Anova*, didapatkan hasil nilai signifikan sebesar 0,000 ($p < 0,05$), dengan hasil tersebut dapat diartikan terdapat perbedaan yang bermakna minimal antara dua kelompok yang berbeda setelah 14 hari pemberian asap rokok dan kefir susu sapi dengan dosis yang berbeda-beda. Sedangkan untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda dapat dilakukan perhitungan statistika menggunakan metode analisis *Post Hoc* dengan uji *Tukey HSD* dengan tingkat signifikansi 95% ($p < 0,05$). Dengan kesimpulan hasil uji *Tukey HSD* (**lampiran 3**) sebagai berikut:

1. Kelompok kontrol positif (K+) memiliki perbedaan nilai aktivitas SOD lebih rendah secara bermakna dibandingkan kelompok kontrol negatif (K-) ($p=0,000$)
2. Kelompok P1, P2, P3 semuanya memiliki perbedaan nilai aktivitas SOD lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K+) ($p=0,000$)
3. Kelompok P1 dan P2 semuanya memiliki perbedaan nilai aktivitas SOD lebih rendah secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (K-) ($p=0,000$; $p=0,002$)
4. Kelompok P3 tidak memiliki perbedaan nilai aktivitas SOD secara bermakna dengan kelompok kontrol negatif (K-) ($p=0,051$)
5. Kelompok P1 tidak memiliki perbedaan nilai aktivitas SOD secara bermakna dengan kelompok P2 ($p=0,13$)
6. Kelompok P3 memiliki perbedaan aktivitas SOD secara bermakna dibandingkan dengan kelompok P1 ($p=0,000$).

7. Kelompok P3 tidak memiliki perbedaan aktivitas SOD secara bermakna dengan kelompok P2 ($p=0,493$)

Untuk mengetahui kekuatan hubungan antara dua variable penelitian yaitu pengaruh kefir susu sapi terhadap aktivitas SOD plasenta maka dilakukan uji korelasi *Pearson*. Hubungan signifikan ditunjukkan dengan ($p<0,05$) dan klasifikasi nilai korelasi *Pearson* sebagai berikut:

- Nilai korelasi 0 = tidak ada korelasi
- Nilai korelasi 0 – 0,25 = sangat lemah
- Nilai korelasi >0,25 – 0,5 = cukup
- Nilai korelasi >0,5 – 0,75 = kuat
- Nilai korelasi > 0,75 – 0,99 = sangat kuat
- Nilai korelasi 1 = sempurna

Korelasi dapat bertanda positif dan negatif, korelasi yang bertanda positif menunjukkan arah searah pada dua variabel sedangkan korelasi yang bertanda negatif menunjukkan arah berlawanan. Dari hasil perhitungan statistika menggunakan uji korelasi *Pearson* (**lampiran 3**) didapatkan hasil-hasil sebagai berikut:

1. Nilai korelasi sebesar (r)=0,909 yang artinya korelasi antara pemberian kefir susu sapi dengan aktivitas SOD sangat kuat.
2. Arah korelasi positif, artinya semakin tinggi kefir susu sapi, semakin tinggi pula aktivitas SOD plasenta tikus putih bunting.

3. Nilai $p=0,000$ ($p<0,05$), yang manandakan korelasi yang signifikan antara pemberian kefir susu sapi dengan aktivitas SOD.

Untuk mengetahui persentase aktivitas SOD yang dipengaruhi oleh kefir susu sapi, maka digunakan uji regresi R^2 , nilai R^2 didapatkan sebesar 0,826, apabila dihitung $R\ square \times 100\ \% = 82,6\%$, yang artinya kefir susu sapi dapat berpengaruh terhadap aktivitas SOD plasenta sebesar 82,6%.



BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan penelitian *eksperimental* yang bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian kefir susu sapi terhadap pencegahan penurunan aktivitas SOD (*Superoksida Dismutase*) plasenta tikus putih bunting dengan paparan asap rokok. Penelitian ini memiliki 5 kelompok sampel dengan pembagian kelompok kontrol dan perlakuan yang telah diukur pada masing-masing kelompoknya. Berdasarkan hasil pengukuran kelompok kontrol negatif (K-) atau kelompok normal didapatkan rata-rata aktivitas SOD plasenta sebesar $53,13 \pm 1,355$ U/200mg, kelompok kontrol negatif ini memiliki rata-rata aktivitas SOD yang paling tinggi dibandingkan dengan kelompok lainnya. Pada kondisi ini menggambarkan kondisi normal tubuh yang tidak mendapatkan paparan apapun dari luar termasuk radikal bebas akibat asap rokok. Radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh memiliki penangkal alami berupa antioksidan, salah satunya pada organ plasenta. Organ plasenta memiliki perlindungan alami terhadap bahaya radikal bebas salah satu antioksidan yaitu Cu/Zn-SOD dan MnSOD yang merupakan bagian dari *Superoksida Dismutase* yang berada di dalam sel (Wresdiyati, 2006). SOD ini bekerja dengan memberikan atom hidrogen secara cepat kepada senyawa radikal sehingga lebih stabil dan menghambat pembentukan

radikal dengan cara memutus reaksi berantai (polimerasi). SOD bekerja dengan mengkatalisis reaksi dismutasi dari radikal anion superoksida O_2^- menjadi H_2O_2 , kemudian dibantu oleh enzim katalase dan glutathione peroksidase untuk mengubah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 (Winarsih, 2007).

Hasil pengukuran aktivitas SOD pada kelompok kontrol positif (K+) sebesar $23,63 \pm 2,141$ U/200mg. Rata-rata hasil pengukuran aktivitas SOD pada kelompok kontrol positif ini paling rendah dibandingkan pada kelompok lainnya yang mana kelompok ini adalah kelompok tikus bunting yang diberi paparan radikal bebas berupa asap rokok selama 14 hari, berdasarkan uji *Tukey HSD* didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol positif dan kontrol negatif ($p=0,000$). Hasil ini menggambarkan bahwa paparan radikal bebas (asap rokok) mampu menurunkan aktivitas SOD plasenta pada tikus bunting. Penurunan aktivitas SOD ini dikarenakan adanya bahan kimia beracun pada asap rokok yang dapat memicu pembentukan radikal bebas sehingga menyebabkan kerusakan oksidatif biologi (Valavanidis, 2009). Kandungan yang ada dalam rokok ini sangat reaktif dan relatif stabil yang berpotensi menstimulasi sel untuk memproduksi ROS (Nopya, 2013). ROS pada rokok memicu hancurnya antioksidan endogen (vitamin dan enzim) dan mengurangi efek pertahanan tubuh oleh antioksidan (Valavanidis, 2009).

Hal ini dapat meningkatkan risiko terkena kerusakan oksidatif, yang tidak hanya disebabkan oleh peningkatan secara fisiologis kadar oksigen bebas saat hamil, tetapi juga oleh radikal karena asap rokok

(Chelchowska *et al.*, 2011). Dengan berat molekul ROS yang rendah dan sifat plasenta yang permeabel dapat dengan mudah melewati plasenta, yang tidak hanya merusak sel plasenta saja namun juga akan berdampak pada janin.

Berdasarkan hasil uji *Tukey HSD* pada kelompok perlakuan, kefir susu sapi sebagai antioksidan eksogen mampu memberikan hasil yang berbeda terhadap pencegahan penurunan aktivitas SOD plasenta. Hal ini dibuktikan dengan perbandingan signifikansi antara kelompok kontrol positif (K+) dengan kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 sebesar $p=0,000$.

Pada kelompok P1 dan P2 jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K+) terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,000$; $p=0,000$) dan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (K-) juga terdapat perbedaan yang bermakna sebesar ($p=0,000$; $0,002$), ini menunjukkan bahwa pada kelompok P1 dan P2 dengan dosis 2,5 ml/kgBB; 5 ml/kgBB dapat mencegah penurunan aktivitas SOD plasenta namun belum mampu mencapai aktivitas SOD pada kondisi yang normal. Aktivitas SOD yang meningkat pada kelompok perlakuan 1 dan 2 dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K+) ini disebabkan karena adanya pemberian kefir pada kelompok perlakuan terbukti dapat menjadi antioksidan tambahan dari luar tubuh yang dapat mencegah kerusakan akibat radikal bebas pada asap rokok. Asam laktat yang terkandung pada kefir dapat membentuk asam-asam organik yang bersifat sinergesis dengan memberikan ion H⁺ pada

radikal bebas sehingga dapat meningkatkan jumlah aktivitas antioksidan primer dan kestabilan antioksidan (Pratimasari, 2009).

Pada kelompok perlakuan 3 (P3) dengan dosis 10ml/kgBB ditemukan perbedaan yang bermakna apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K+) yaitu $p=0,000$ namun ditemukan perbedaan yang tidak bermakna apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (K-) sebesar $p=0,051$. Dengan demikian dengan dosis 10ml/kgBB kefir susu sapi sebagai antioksidan eksogen dapat mencegah penurunan aktivitas SOD dan mampu mengembalikan aktivitas SOD ke kondisi normal. Meningkatnya aktivitas antioksidan tersebut diakibatkan adanya aktivitas khamir dan bakteri asam laktat pada kefir. Khamir memiliki kemampuan menghasilkan enzim vinyl phenol reductase. Bakteri *Lactococcus spp* dan *Streptococcus thermophilus* mampu mengekspresikan aktivitas enzim antioksidan superoksida dismutase (SOD), Flora bakteri pada asam laktat dalam kefir bersifat homofermentatif sehingga mempunyai pengaruh positif terhadap anion superoksida (Kesenkaşa *et al.*, 2011). Peningkatan aktivitas antioksidan pada penelitian ini diartikan bahwa adanya pencegahan penurunan aktivitas SOD akibat kefir dengan paparan asap rokok sebagai radikal bebas juga diakibatkan karena adanya turunan protein dan peptida yang bekerja pada kefir.

Dan yang terakhir, perbandingan kelompok perlakuan 3 (P3) dengan kelompok perlakuan 1 (P1) memiliki perbedaan yang bermakna sebesar ($p=0,000$), dan dibuktikan pula apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (K-) tidak memiliki

perbedaan yang bermakna ($p=0,051$), yang artinya hal tersebut menunjukkan bahwa P3 dapat mencapai kondisi normal. Dengan demikian dapat diketahui bahwa kelompok perlakuan 3 (P3) 10ml/kgBB dapat menjadi dosis optimal dibandingkan dengan dosis perlakuan 1 (P1) 2,5 ml/kgBB dan perlakuan 2 (P2) 5 ml/kgBB.

Dari hasil ini dapat ditarik kesimpulan bahwa adanya paparan radikal bebas akibat rokok mampu menurunkan antioksidan plasenta yang diukur dengan aktivitas SOD plasenta. Kefir susu sapi yang mengandung antioksidan terbukti pada penelitian ini mampu menetralkan radikal bebas sehingga mendukung pencegahan penurunan aktivitas SOD plasenta dan kelompok perlakuan 3 (P3) dapat disebut sebagai kelompok perlakuan dengan dosis optimal sebesar 10ml/kgBB.

Penelitian lain menyebutkan bahwa suplementasi kefir yang diberi pada hewan percobaan dengan penggunaan timbal selama enam minggu pengobatan dapat meningkatkan glutathione peroxidase dan mengurangi malondyaldehyda (Ozcan and K, 2009). Hal ini mendukung hipotesis bahwa kefir mampu sebagai alat potensial dalam pengendalian stres oksidatif.

Berdasarkan hasil uji korelasi *Pearson* didapatkan nilai korelasi sebesar $(r) = 0,909$ dengan arah korelasi positif dan nilai p yang signifikan sebesar $p= 0,000$ ($p<0,05$), artinya terdapat hubungan yang sangat kuat antara pemberian kefir susu sapi dengan aktivitas SOD yang mana semakin tinggi dosis kefir susu sapi diberikan, semakin tinggi hasil aktivitas SOD plasenta dan semakin rendah efek akibat

asap rokoknya. Dan juga berdasarkan hasil uji regresi menggunakan regresi linear didapatkan hasil sebesar 82,6% yang artinya aktivitas SOD plasenta dipengaruhi oleh kefir susu sapi sebesar 82,6%.

Uji korelasi dan regresi ini menguatkan hasil penelitian bahwa kefir susu sapi sebagai antioksidan eksogen dalam mencegah penurunan aktivitas SOD (antioksidan endogen) plasenta tikus putih yang dipapar asap rokok sebagai radikal bebas memiliki hubungan yang sangat kuat dan saling mempengaruhi.

Dengan demikian berdasarkan fakta-fakta dan hasil kajian analisa data diatas maka hipotesa yang menyatakan bahwa pemberian kefir susu sapi dapat mencegah penurunan aktivitas SOD (*Superoxide Dismutase*) plasenta tikus putih (*Rattus norvegicus*) bunting yang dipaparkan asap rokok **terbukti**.

Keterbatasan penelitian ini adalah tidak diketahuinya apakah dosis diantara perlakuan 2 (5 ml/kgBB) dan perlakuan 3 (10ml/kgBB) sudah dapat mencapai aktivitas SOD dalam kondisi normal. Dikarenakan pada penelitian ini dosis pada perlakuan 2 sebesar 5ml/kgBB belum dapat mencapai aktivitas SOD dalam kondisi normal sedangkan perlakuan 3 dengan dosis 10ml/kgBB sudah dapat mencapai aktivitas SOD dalam kondisi normal. Selain itu pada penelitian ini tidak ada kelompok kontrol yang hanya diberikan kefir susu sapi saja tanpa asap rokok, sehingga masih belum dapat ditentukan sejauh mana kefir susu sapi ini dapat mempengaruhi aktivitas SOD tanpa adanya radikal bebas dan aman bagi kehamilan.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

1.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian kefir susu sapi dapat mencegah penurunan aktivitas SOD plasenta tikus putih yang dipapar asap rokok dan dosis 10 ml/kgBB terbukti dapat menjadi dosis optimal.

1.2 Saran

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan menambahkan kelompok kontrol yang hanya diberi dosis kefir susu sapi tanpa asap rokok sebagai radikal bebas sehingga masih belum dapat ditentukan sejauh mana kefir susu sapi ini dapat mempengaruhi aktivitas SOD tanpa adanya radikal bebas dan aman bagi kehamilan.
2. Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan memasukkan dosis antara 5ml/kgBB dan 10ml/kgBB untuk mengetahui apakah diantara dosis tersebut juga dapat mencegah penurunan aktivitas SOD plasenta dan membuat aktivitas SOD plasenta mencapai kondisi normal.
3. Diperlukan penelitian lebih lanjut dalam mengembangkan kefir susu sapi sebagai bentuk pencegahan *stress oksidatif* akibat radikal bebas pada masa kehamilan, sehingga diharapkan penelitian tentang kefir tidak berhenti sampai penelitian saja namun ada bentuk *real* yang dapat dikonsumsi masyarakat khususnya ibu hamil.

DAFTAR PUSTAKA

- Aditama. 1997. *Rokok dan Kesehatan*. Jakarta: UII Press.
- Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. 2005. Role of Oxidative Stress in Female Reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* .
- Akbar, B. 2010. *Tumbuhan Dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi sebagai Bahan Antifertilitas*. Jakarta: Adabia Press UIN Syarif Hidayatullah.
- Ambrose, J A., Barua, R S. 2004. The Pathophysiology of Cigarette Smoking and Cardiovascular Disease. *Journal of The American College of Cardiology*, 43, 1731-1737.
- Anim, J. S. 2005. Antioxidative Activities of kefir. *Asian-Aust*, 18, 567-573.
- Astuti, D. 2009. *Cepat Tuntas Kuasai Kimia*. Jakarta: PT Galang Press Media.
- AVMA. 2013. *Guidelines for the Euthanasia of Animals*. Schaumburg: American Veterinary Medical Association.
- Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI. 2013. *Riset Kesehatan Dasar Tahun 2013*.
- Baker, DEJ., Lindsey, JR., and Weisborth, SH. 1980. The Laboratory Rat. Vol II. Research applications. *Academic Press Inc*. London.

- Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pasca panen Pertanian. 2007. Kefir, Susu Fermentasi dengan Rasa Menyegarkan. *Warta Penelitian dan Perkembangan Pertanian*, 29, 12-14.
- Brewer, S. 1994. Kefir. Food Savety Research. *Cultured Daury Product Journal*.
- Casanueva, E., & Viteri, F. E. 2009. Iron and Oxidative Stress in Pregnancy. *The Journal of Nutrition*, 133, 1700S-1708S.
- Chelchowska, M., Ambroszkiewicz, J., Gajewska, J., Laskowska, T., Leibschang J. 2011. The Effect of Tobacco Smoking During Pregnancy on Plasma Oxidant and Antioxidant Status in Mother and Newborn. *European Journal of Obstetric & Gynecology and Reproductive Biology* , 155, 132-136.
- Clarkson, P., & Thompson, H. 2000. Antioxidants: What Role Do They Play in Physical Activity and Health? *Am J Clin Nutr*, 637S-646S.
- Cousens, G. 2003. *Rainbow Life Food Cuisine*. California: North Atlantic Books.
- Depkes. 2012. *Profil Kesehatan Provinsi Jawa Timur Tahun 2012*. Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur. Surabaya. 1-230
- Devasagayam, T., Tilak, J., Boloor, K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., & Lele, R. 2004. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Provinsi JaStatus and Future Prospects. *JAPI* , 52, 794-804.
- Dorlan, W. 2011. *Kamus Saku Kedokteran Dorland*. Jakarta: EGC.

- Fahmy H.A, Amel F.M, Ismail. Gastroprotective Effect of Kefir on Ulcer Induced in Irradiated Rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2015, 144: 85-93.
- Gamagita LP. 2016. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Naga Merah (Hylocereus polyrhizus) terhadap Berat Badan Bayi Baru Lahir (BBL) Tikus Putih 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., Nikam V., Khadse A., Kashid V. 2011. The Magic of Kefir: a Review. *Journal of Pharmacologyonline*, 1: 376-386.
- Grishina *et al.* 2011. Antigenotoxic Effect of Kefir and Ayrans Supernatants on Fecal Water-Induced DNA Damage in Human Colon Cells. *Nutr Cancer*, 63, 73-79.
- Güven, A., & Gülmez, M. 2003. 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 Infect Dis Vet Public Health* , 50, 412-416.
- Halliwell, B. 2006. Reactive Species and Antioxidants: Redox Biology is A Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol* , 312-322.
- Halliwell, B., & Whiteman, M. 2004. Measuring Reactive Species and Oxidative Damage in Vivo and in Cell Culture: How Should You Do It and What Do The Results Mean? *British Journal of Pharmacology* , 144, 231-255.

Hapsari, S. 2011. *Efektivitas Pemberian Ekstrak Etanol Purwoceng (Pimpinella alpina) selama 1-13 Hari Kebuntingan terhadap Bobot Ovarium dan Uterus Tikus Putih (Rattus sp)*. Skripsi. Tidak diterbitkan. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Hariyatmi. 2004. Kemampuan Vitamin E sebagai Antioksidan terhadap Radikal Bebas pada Lanjut Usia. *Pendidikan FKIP Biologi UMS Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam*, 14, 52-60.

Herdiani, N. 2016. Pengaruh Ekstrak Kelopak Rosella Merah Meningkatkan Kadar Superoksida Dismutase (SOD) Tikus Wistar yang Diberi Minyak Jelantah. *Medica Majapahit* , 8, 41-52.

Hsieh, H. H., Wang, S. Y., Chen, T. L., Huang, Y. L., & Chen, M. J. (2012). Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. *International Journal of Food Microbiology*, 157, 73–81.

Inglish, J. K. 1980. *Introduction to Laboratory Animal Science and Technology*. Oxford: Pergamon Press.

Irawati, Lili., Julizar, Irahmah, Miftah. 2011. Hubungan Jumlah dan Lamanya Merokok dengan Viskositas Darah. *Majalah Kedokteran Andalas*. Juli-Desember 2011, Vol 35, hal 137-146

Jauniaux, E., Burton, GJ. 2007. Morphological and Biological Effect of Maternal Exposure to Tobacco Smoke on the Feto-Placental Unit. *Early Hum Dev*, 83, 699-706

Jong, F. 2017. *Kefir*. (Online),
(<http://www.foodnutritiontable.com/nutritions/nutrient/?id=706> diakses 12 Mei 2017)

Kankofer M. 2002. Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase Activities in Bovine Placenta: Spectrophotometric and Electrophoretic Analysis. *Revue Med Vet*, 153: 121–124.

Kaufman MH. 1992. *The Atlas of Mouse Development*. London: Academic Press Limited.

Kesenkaşa, Harun, Nayil Dinkçia, Kemal Seçkinb, Özer Kinika and Siddik Gönça. 2011. Antioxidant Properties of Kefir Produced from Different Cow and Soy Milk Mixtures. *Journal Agricultural Sciences*, 17. 253-259

Kevin, Kregel, J, H., & Zhang. 2006. An Integrated View of Oxidative Stress in Aging: Basic Mechanisms, Functional Effects, and Pathological Considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* , R18-R36.

Kosikowski., F. C. 1982. Cheese and Fermented Milk Food. F.V. *Kosikowski and Associates Brooktondale*.

Kunchandy, E. and Rao, M.N.A,1990, Oxigen Radical Scavenger Activity of Curcumin, *International Journal of Pharmaceutica*, 58, hal. 237-240

Kunaepah, U. 2008. *Pengaruh Lama Fermentasi dan Konsentrasi Glukosa terhadap Aktivitas Antibakteri, Polifenol Total dan Mutu Kimia Kefir Susu Kacang Merah*. Tesis. Tidak diterbitkan. Program Pascasarjana Universitas Diponegoro, Semarang.

- Leech, Joe. 9 *Evidence-Based Health Benefits of Kefir*, (Online), (<https://authoritynutrition.com/9-health-benefits-of-kefir/>, diakses 07 Mei 2017)
- Liu J, L. Y. 2005. Antioxidative Activities of kefir. *Asian Australasian Association of Animal Production Societies*.
- Liu J. R., MJ Chen, Lin CW. 2005. Antimutagenic and Antioxidant Properties of Milk Kefir and Soymilk Kefir. *Journal Agric Food Chem*. 53(7)
- Liszewski, W., Ritner, C., Aurigui, J., Wong, S., Hussain, N., Krueger, W., *et al*. 2012. Development Effects to Tobacco Smoke Exposure during Human Embryonic Stem Cell Differentiation are Mediated Through The Transforming Growth Factor-B Superfamily Member, Nodal. *National Institutes of Health*. 83(4): 169-178
- Malole MBM dan Pramono CSU. 1989. *Penggunaan Hewan-Hewan Percobaan di Laboratorium*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB, Bogor.
- Maria R. Prado¹, L. M.-S. 2015. Milk Kefir: Composition, Microbial Cultures, Biological Activities, and Related Products. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-10.
- Marks, D. B., Marks, A. D., & Smith, C. 2000. *Biokimia Kedokteran Dasar: Sebuah Pendekatan Klinis*. Jakarta: EGC.
- Muchtadi, D., N. S. Palupi, dan M. Astawan. 1993. *Metabolisme Zat Gizi*. Jakarta: Pustaka Sinar Harapan.

- Musdholifah, & Elok, S. 2016. Studi Aktivitas Antioksidan Kefir Teh Daun Sirsak dari Berbagai Merk di Pasaran. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* , 4, 29-39.
- Ngatidjan. 2006. *Metode Laboratorium dalam Toksikologi*. Bag. Farmakologi & Toksikologi FK UGM. Yogyakarta. Hal : 86-135.
- Nursyah, D. 2012. *Gambaran Siklus Estrus Tikus Putih (Rattus Norvegicus) Ovariectomi yang Diberi Tepung Daging Teripang (Holothuria Scabra)*. Skripsi. Tidak Diterbitkan. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- N/A. 2005. *Seluk-Beluk Food Supplement Kesehatan*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama
- Nopya *et al.* 2013. Identification of Stable Cytotoxic Factorsv in The Gas Phase Extraxt of Cigarette Smoke and Pharmacological Characterization of Their Citotoxicity. *Toxicology* , 314, 1-10.
- Oktavianis. 2011. *Efek Pemberian asap rokok terhadap Kehamilan Tikus Putih (Rattus norvegicus)*. Skripsi. Tidak Diterbitkan. Program Studi Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Andalas, Padang.
- Ozcan A., K. N. 2009. Effect of Kefir on The Oxidative Stress Due to Lead in Rats. *Journal Appl Anim Res*, 35, 91-93.
- Pangkalan Ide. 2008. *Health of Kefir*. Jakarta: PT Elex Media Komputindo
- Partodiharjo, S. 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Jakarta: Mutiara Jakarta.

- Paucean, A. and Carmen, S. 2008. Probiotic activity of mixed cultures of kefir's actobacilli and non-lactose fermenting yeasts Bulletin UASVM, *Agriculture*. 65(2).
- Pratimasari, D. 2009. *Uji Aktivitas Penangkap Radikal Buah Carica Papaya I. Dengan Metode DPPH dan Penetapan Kadar Fenolik serta Flavonoid Totalnya*. Skripsi. Tidak Diterbitkan. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah, Surakarta.
- Pray-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. 2008. Free Radical, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomed Science* , 4, 89-96.
- Ramos, Pena and Xiong. 2001. Antioxidative Activity of Whey Protein Hydrolysates in A Liposomal System. *J. Dairy Sci.* 84(2)
- Ross, S. 2006. *Birth Right*. Jakarta: Trans Media.
- Samsuria, 2009. *Efek Asap Rokok pada Tikus Rattus norvegicus Bunting Terhadap Tampilan Fisiologis Induk dan Anaknya Setelah Dilahirkan*. Tesis. Tidak diterbitkan. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Sie, J. O. 2013. *Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis (Garcinia Mangostana Linn) Hasil Pengadukan dan Reflux*. Jurnal Ilmiah Mahasiswa Universitas Surabaya. (1) :2.
- Simpson, D. 2009. *Tembakau: Ancaman Global*. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo.
- Sirajuddin, T., Hartono, R & Manjilala. 2011. Pengaruh Paparan Asap Rokok terhadap Kejadian Berat Badan Lahir Bayi di Sulawesi Selatan. *Media Gizi Pangan Vol XII Edisi 1*.

Siti, N. 2009. *Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daging Pisang Raja Jika Dibandingkan Dengan Antioksidan Lain Yaitu Vitamin A, Vitamin C, Dan Katekin Melalui Penghitungan Bilangan Peroksida*. Skripsi. Di Terbitkan. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta

Smith, T. 2006. *Hati-hati dengan Nyeri Dada (Angina)*. Jakarta: Arcan.

Smith, JB dan Mangkoewidjojo, S. 1988. *Pemeliharaan Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.

Solimun. 2001. *Diktat Metodologi Penelitian LKIP dan PKM Kelompok Agrokompleks*. Universitas Brawijaya, Malang.

Sukmana, T. 2009. *Mengenal Rokok dan Bahayanya*. Be Champions: Yogyakarta.

Syamsudin, D. 2011. *Farmakologi Eksperimental*. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia (UI-Press).

Tambayong, J. 2000. *Patofisiologi untuk Keperawatan*. Jakarta: EGC.

Tapan, E. 2005. *Kanker, Antioksidan, dan Terapi Komplementer*. Jakarta: PT Elex Media Komputindo.

Valavanidis. 2009. Tobacco Smoke: Involvement of Reactive Oxygen Species and Stable Free Radicals in Mechanisms of Oxydative Damage, Carcinogenesis and Synergistic Effect with Other Respirable Particles. *Environmental Resarcheh and Public Health* , 6, 445-462.

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronim, M., Mazur, M., & Telser, J. 2007. Review: Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Humas Disease. *Inter J Biochem Cell Biol* , 44-84.
- Wardayati, K Tatik. 2012. *Kefir Turunkan Kolesterol*, (Online), (<http://intisari.grid.id/Techno/Science/Kefir-Turunkan-Kolesterol>, diakses 07 Mei 2017)
- Wati, Y. E., Muktiati, N. S., & Astuti, T. 2013. Kadar Malondyaldehide dan Aktivitas Superoksida Dismutase Plasma pada Tuberkulosis Paru Lesi Minimal dan Lesi Luas. *Studi Stres Oksidatif* , 33, 163-166.
- WHO. 2013. WHO Recommendations for The Prevention and Management of Tobacco Use and Second Hand Smoke Exposure in Pregnancy. *Office of information* , 22-23.
- Widodo, W. 2002. Bioteknologi Fermentasi Susu. *Pusat Pengembangan Bioteknologi Universitas Muhammadiyah Malang*.
- Wijayanti, A. 2. 2002. Pengaruh Penambahan Susu Skim Bubuk dan Lama Penyimpanan Pada Refrigerator Terhadap Kadar Protein, Kadar Alkohol dan Viskositas Kefir. Skripsi. Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya, Malang.
- Winarno, F. G., & Ivone, F. E. 2007. *Susu dan Produk Fermentasinya*. Bogor: M-BRIO PRESS.
- Winarsih, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas: Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius.

Wresdiyati, T., Made, A., Lusya, Y H. 2006. Profil Imunohistokimia Superoksida Dismutase (SOD) pada Jaringan Hati Tikus dengan Kondisi Hiperkolesterolemia. *Hayati*, 13, 85-89

Zhang, J., Liu, Y., Shi, J., Larson, D. F., & Watson, R. R. 2002. Side-Stream Cigarette Smoke Induces Dose-Response in Systemic Inflammatory Cytokine Production and Oxidative Stress. *Exp Biol Med (Maywood)*, 227, 823.

Zisovska. 2010. Tobacco Influence On The Neonatal Outcome. *Italian Journal Of Public Health*, 7, 249-255.

