

**PENGARUH PEMBERIAN SUPLEMEN EKSTRAK
KECAMBAH KACANG HIJAU (*Phaseolus radiatus L.*)
TERHADAP KADAR *GLUTATHIONE PEROKSIDASE*,
KATALASE DAN *SUPEROXIDE DISMUTASE***

**(Studi Eksperimental Pada Tikus Jantan Galur Wistar Yang Diinduksi
Herbisida Paraquat)**

Tesis



Magister Ilmu Biomedik

Asti Salekhah Alfatih
MBK. 1710010128

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG 2021**

USULAN PENELITIAN
PENGARUH PEMBERIAN SUPLEMEN EKSTRAK KECAMBAH
KACANG HIJAU (*Phaseolus radiatus L.*) TERHADAP KADAR
GLUTATHIONE PEROKSIDASE, KATALASE DAN SUPEROXIDE
DISMUTASE

(Studi Eksperimental Pada Tikus Jantan Galur Wistar Yang Diinduksi
Herbisida Paraquat)

disusun oleh :

Asti Salekhab Alfatin
MBK. 1710010128

yang akan dipertahankan di depan Tim Penguji
pada Agustus 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima,

Menyetujui,

Pembimbing

Pembimbing I,

Pembimbing II,

Dr.dr. H. Setyo Trisnadi, SH, Sp KF
NIK. 210199049

Dr.Ir.Titiik Sumarawati M.Kes
NIK. 220198045

Mengetahui,

a.n. Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik,

Sekretaris Program Studi Biomedik

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang



Dr.Ir. Hj. Titiik Sumarawati M.Kes
NIK. 220198045

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum / tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.



RIWAYAT HIDUP


1. Identitas Diri

Nama : Asti Salekhah Alfatih
 Tempat / tanggal lahir : Brebes, 28 Oktober 1993
 Agama : Islam
 Jenis Kelamin : Perempuan

2. Riwayat Pendidikan Formal

1. SD N Trayeman 01 : Lulus tahun 2005
2. SMP N 01 Slawi : Lulus tahun 2008
3. SMA Insan Kamil Bogor : Lulus tahun 2011
4. D3 Kebidanan Universitas Harapan Bangsa Purwokerto : Lulus tahun 2014
5. D4 Bidan Pendidik Universitas Nasional Jakarta : Lulus tahun 2016
6. Magister Ilmu Biomedik FK UNISSULA : tahun 2017-
sekarang

3. Riwayat Keluarga

Nama Orang Tua :  جامعته سلطان أبجوع الإسلامية
 Ibu : Titik Khayati
 Ayah : Syaefullah Syukur
 Nama Saudara Kandung
 Adik : Ajeng Kusuma Alfatih
 Nama Suami : Ilham Taufiq Ma'ruf, S.Tr. Log
 Nama Anak : Kireyna Adzkia Ma'ruf

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan yang Maha Esa, atas segala karunia dan ridho-NYA, sehingga tesis dengan judul “Pengaruh Pemberian Suplemen Ekstrak Kecambah Kacang Hijau (*Phaseolus Radiatus L.*) Terhadap Kadar *Glutathione Peroksidase*, Katalase Dan *Superoxide Dismutase*” ini dapat diselesaikan.

Tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar Magister Biomedik di program studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa hormat dan menghaturkan terima kasih yang sebesar-besarnya, kepada :

1. Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Drs. H. Bedjo Santoso, M.T.,Ph.D
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Dr. dr. H. Setyo Trisnadi Sp.KF. SH.
3. Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, Bapak Prof. Dr. dr. Taufiqurrachman N, M.Kes, Sp.And (K), Alm.
4. Bapak Dr.dr. H. Setyo Trisnadi, SH, Sp KF atas bimbingan, arahan dan waktu yang telah diluangkan kepada penulis untuk berdiskusi selama menjadi dosen pembimbing pertama.
5. Ibu Dr.Ir.Titiek Sumarawati M.Kes selaku dosen pembimbing kedua yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan proposal.
6. Dr. dr. H. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes selaku penguji pertama yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.

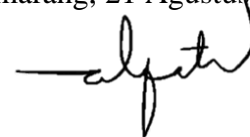
7. Dr. dr. M. Saugi Abduh, Sp.PD, K-KV., FINASIM selaku penguji kedua yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
8. dr. Nur Anna C. Sa'Dyah, Sp. PD KEMD FINASIM selaku penguji ketiga yang telah memberikan masukan dan saran serta menyempatkan waktu kesibukannya saat bimbingan tesis.
9. Seluruh Dosen Program Studi Magister Ilmu Biomedik, yang telah memberikan arahan dan bimbingan untuk mendalami ilmu Biomedik.
10. Suami saya Ilham Taufiq Ma'ruf, anak saya tercinta Kireyna Adzkia Ma'ruf yang selalu membuat saya semangat dan seluruh keluarga saya yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu atas segala dukungan dan doanya.
11. Teman yang selalu ada dan sebagai penyemangat saya terima kasih atas segala motivasi, perhatian, dan dukungan yang telah diberikan selama ini.
12. Kepada semua pihak yang telah membantu yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Dengan keterbatasan pengalaman, ilmu maupun pustaka yang ditinjau, penulis menyadari bahwa tesis ini masih banyak kekurangan dan pengembangan lanjut agar benar benar bermanfaat. Oleh sebab itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran agar tesis ini lebih sempurna serta sebagai masukan bagi penulis untuk penelitian dan penulisan karya ilmiah di masa yang akan datang.

Akhir kata, penulis berharap tesis ini memberikan manfaat bagi kita semua terutama untuk pengembangan ilmu pengetahuan yang ramah lingkungan.

Wassalamua'laikum warohmatullahi wabarakatuh

Semarang, 21 Agustus 2021



Asti Salekhah Alfatin

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	<i>i</i>
HALAMAN PERSETUJUAN	<i>ii</i>
HALAMAN PERNYATAAN	<i>iii</i>
RIWAYAT HIDUP	<i>iv</i>
KATA PENGANTAR	<i>v</i>
DAFTAR ISI	<i>vii</i>
DAFTAR GAMBAR	<i>ix</i>
DAFTAR TABEL	<i>x</i>
DAFTAR LAMPIRAN	<i>xi</i>
DAFTAR SINGKATAN	<i>xii</i>
ABSTRAK	<i>xiv</i>
ABSTRACT	<i>xv</i>
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Umum	4
1.4 Tujuan Khusus	4
1.5 Originalitas Penelitian	5
1.6 Manfaat Penelitian	6
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Superoksida Dimutase</i>	7
2.2 Katalase	9
2.3 <i>Glutathione Paroksidase</i>	10
2.4 Faktor – faktor yang mempengaruhi sekresi <i>Glutathione Peroksidase</i> , Katalase, dan <i>Superoksida Dimutase</i>	11
2.5 Kecambah kacang hijau	13
2.6 Herbisida Paraquat	17

2.7 Efek suplemen ekstrak kecambah kacang hijau terhadap kadar Glutation, Katalase, dan Superoksida Dimutase	21
--	----

BAB III. KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori.....	24
3.2 Kerangka Konsep	26
3.3 Hipotesis.....	26

BAB IV. METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	27
4.2 Populasi Penelitian	28
4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional.....	29
4.4 Alat dan Bahan Penelitian.....	32
4.5 Cara Penelitian	32
4.6 Tempat dan Waktu Penelitian	37
4.7 Analisis Data	37

BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian	38
5.2 Pembahasan.....	45
5.3 Keterbatasan Penelitian.....	50

BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan	51
6.2 Saran.....	52

DAFTAR PUSTAKA	53
-----------------------------	-----------

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 SOD, CAT, dan GPX dalam Menetralsir ROS.....	11
3.1 Skema Kerangka Teori.....	25
3.2 Skema Kerangka Konsep.....	26
4.1 Skema Rancangan Penelitian.....	27
5.1 Grafik Rerata Kadar GPx.....	40
5.2 Grafik Rerata Kadar Katalase.....	42
5.3 Grafik Rerata Kadar SOD.....	44



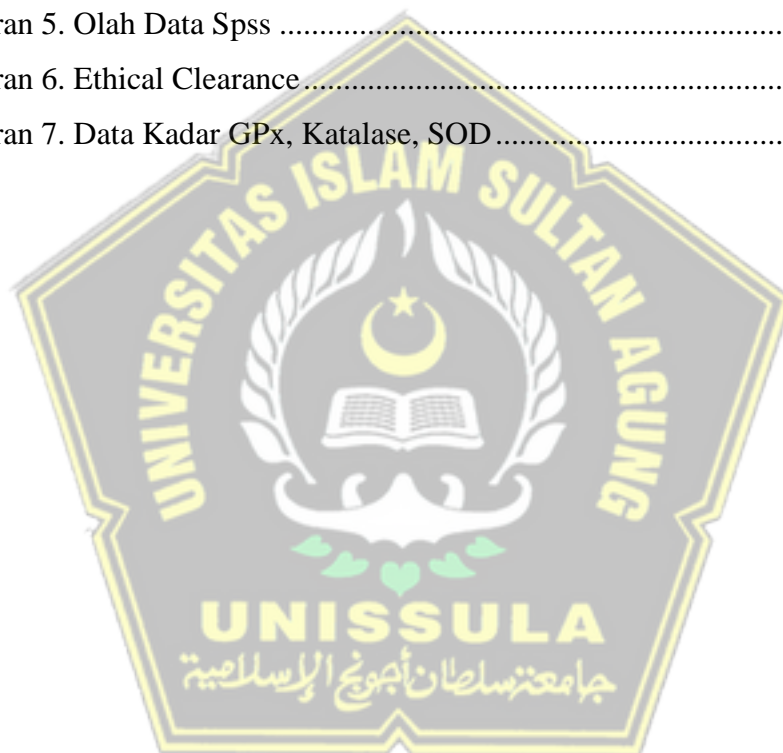
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1.1 Original Penelitian	5
5.1 Hasil analisis rerata kadar GPx, Katalase dan SOD.....	38
5.2 Perbedaan Kadar GPx Antar 2 Kelompok	39
5.3 Perbedaan Kadar Katalase Antar 2 Kelompok.....	41
5.4 Perbedaan Kadar SOD Antar 2 Kelompok	43



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1. Tabel Konversi Dosis Hewan Dengan Manusia	57
Lampiran 2. Penentuan Dosis	58
Lampiran 3. Berat Badan Tikus Jantan Galur Wistar	60
Lampiran 4. Dokumentasi Kegiatan Penelitian	61
Lampiran 5. Olah Data Spss	63
Lampiran 6. Ethical Clearance	70
Lampiran 7. Data Kadar GPx, Katalase, SOD	71



DAFTAR SINGKATAN

ADMA	: <i>Asymmetrical dimethylarginine</i>
AGEs	: <i>Advanced glycation end products</i>
AHA	: <i>American Heart Association</i>
CAT	: <i>Catalase</i>
Cu, Zn SOD	: <i>Copper Zinc Superoxide dismutase</i>
DHEA	: <i>Dihydroepiandrosteron</i>
DNA	: <i>Deoxy Nukleat Acid</i>
ELFA	: <i>Enzyme Linked Fluorescent Immuno-Assay</i>
Fe SOD	: <i>Ferri Superoxide dismutase</i>
GPx	: <i>Glutathione peroksidase</i>
GSH	: <i>Glutathione tereduksi</i>
GS-SG	: <i>Glutathione teroksidasi</i>
H ₂ O ₂	: <i>Hydrogen Peroxide</i>
HDL	: <i>High-density lipoprotein</i>
HPA	: <i>Hipotalamus-hipofisis adrenal</i>
IDL	: <i>Intermediate-density lipoprotein</i>
LDL	: <i>Low-density lipoprotein</i>
Lp(a)	: <i>Lipoproteina kecil</i>
LPO	: <i>Lipid Peroksidase</i>
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
Mn SOD	: <i>Mangan Superoxide dismutase</i>
NAC	: <i>N-Acetylcysteine</i>
NADPH	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NO	: <i>Nitrit oxide</i>
O ₂	: <i>Oksigen</i>
PD	: <i>Peritoneal dialysis</i>
PUFA	: <i>Poly Unsaturated Fatty Acid</i>
RNS	: <i>Reactive Nitrogen Spesies</i>

ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
SH	: <i>Sulphydryl</i>
SHBG	: <i>Sex Hormone Binding Globulin</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismutase</i>
SOR	: <i>Senyawa oksigen reaktif</i>
SPR	: <i>Solid Phase Receptacle</i>
TBA	: <i>Tiobarbiturat</i>
TCA	: <i>Trichloroacetic acid</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Faktor</i>
VCAM-1	: <i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VLDL	: <i>Very low-density lipoprotein</i>



**PENGARUH PEMBERIAN SUPLEMEN EKSTRAK KECAMBAH
KACANG HIJAU (*Phaseolus radiatus L.*) TERHADAP KADAR
GLUTATION PEROKSIDASE, KATALASE DAN SUPEROKSIDA
DISMUTASE**

(Studi Eksperimental Pada Tikus Jantan Galur Wistar Yang Diinduksi Herbisida Paraquat)

Asti Salekhah Alfatin¹, Setyo Trisnadi², Titiek Sumarawati³
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang

ABSTRAK

Latar Belakang : Paparan herbisida paraquat berpengaruh ke organ-organ tubuh manusia yang menyebabkan produksi ROS yang melebihi kapasitas enzim antioksidan dalam tubuh dapat menimbulkan stress oksidatif. Hal ini menyebabkan antioksidan endogen mengalami penurunan, sehingga dalam pencegahannya memerlukan antioksidan eksogen seperti suplemen kecambah kacang hijau.

Tujuan : Membuktikan pengaruh pemberian suplemen ekstrak kecambah kacang hijau terhadap peningkatan kadar *glutathione peroksidase*, katalase dan *superoxide dismutase* pada tikus wistar jantan yang diinduksi herbisida paraquat.

Metode : Penelitian menggunakan *ekperimental dengan posttest only controlled Group Design*. Subyek penelitian berjumlah 25 ekor tikus jantan galur *wistar* yang dibagi secara acak menjadi 5 kelompok yaitu K1, K2, K3, K4, dan K5. Kelompok K3, K4, dan K5 diberi suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dosis 21,6mg/hari, 43,2mg/hari, 86,4mg/hari Pada hari ke 16 dilakukan pengambilan darah untuk pemeriksaan kadar GPx, Katalase, dan SOD. Data di analisis menggunakan uji *One Way Anova* untuk kadar GPx dan SOD. Kadar Katalase menggunakan uji *Kruskal Wallis*.

Hasil : Rerata kadar GPx, Katalase dan SOD tertinggi pada kelompok K1 dibanding kelompok K3, K4, dan K5. Uji *One Way Anova* pada kadar GPx dan SOD menunjukkan perbedaan signifikan terhadap antar kelompok dengan nilai $p = 0,000$. Hasil uji *Kruskal Wallis* pada kadar Katalase menunjukkan perbedaan bermakna diantara kelompok ($p=0,000$).

Kesimpulan: Pemberian suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dosis 21,6 mg/200g BB/ekor/hari, 43,2 mg/200g BB/ekor/hari, dan 86,4 mg/200g dapat meningkatkan kadar GPx, Katalase, dan SOD pada tikus jantan galur *wistar* yang diinduksi herbisida paraquat .

Kata Kunci : *Kecambah Kacang Hijau, glutathione peroksidase, katalase, superoxide dismutase*

**EFFECT OF SUPPLEMENTATION GREEN BEAN SPROUT EXTRACT
(*Phaseolus radiatus L.*) AGAINST GLUTATION LEVELS OF
PEROXIDASE, CATALASE AND SUPEROXIDE DISMUTASE**

(Experimental Study In Male Rats Wistar Strain Induced Herbicide Paraquat)

Asti Salekhah Alfatin¹, Setyo Trisnadi², Titiek Sumarawati³
Faculty of Medicine, Sultan Agung Islamic University of Semarang

ABSTRACT

Background: Exposure to paraquat herbicides has an effect on the organs of the human body that cause ROS reduction that exceeds the capacity of antioxidant enzymes in the body can cause oxidative stress. This causes endogenous antioxidants to decrease, so in its prevention requires exogenous antioxidants such as green bean sprout supplements.

Purpose : To prove the effect of supplement administration of green bean sprout extract to increase levels of *glutathione peroxidase*, catalase and *superoxide dismutase* in male *wistar* rats induced herbicide paraquat.

Method : Research using experimental with *posttest only controlled Group Design*. The study subjects numbered 25 *wistar* strain male rats that were randomly divided into 5 groups namely K1, K2, K3, K4, and K5. Group K3, K4, and K5 were given green bean sprout extract supplements at a dose of 21.6mg /day, 43.2mg / day, 86.4mg / day On the 16th day of blood retrieval for examination of GPx, catalase, and SOD levels. The data in the analysis uses One Way Anova test for GPx and SOD levels. Catalase levels using *the Kruskal Wallis* test.

Result : Average GPx, catalase and SOD levels are highest in group K1 compared to group K3, K4, and K5. The *One Way Anova* test at GPx and SOD levels showed significant differences groups with a value of $p = 0.000$. *Kruskal Wallis* test results on catalase levels showed significant differences between groups ($p=0.000$).

Conclusion: Administration of green bean sprout extract supplement at a dose of 21.6 mg/200g BB/tail/day, 43.2 mg/200g BB/tail/day, and 86.4 mg/200g can increase levels of GPx, catalase, and SOD in *wistar-induced* strain male rats paraquat herbicides.

Keywords: *Green Bean Sprouts, glutathione peroxidase, catalase, superoxide dismutase*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Proses menua (*aging*) merupakan proses alami yang disertai adanya penurunan fisik, psikologis maupun sosial yang saling berinteraksi satu sama lain. Proses penuaan bisa disebabkan dari berbagai faktor yaitu faktor eksternal (radikal bebas, sinar matahari, polutan) dan faktor internal (kesehatan, berkurangnya struktur elastin dan kolagen pada kulit, sistem imun, perubahan hormonal, *Reactive Oxygen Species/ROS*). Paparan pestisida kimia mampu menyebabkan peningkatan jumlah radikal bebas dan menyebabkan stress oksidatif sel.^{1,2} Stres oksidatif terjadi karena sistem antioksidan tubuh berkurang akibat ketidakmampuan pertahanan tubuh dalam meredam produksi radikal bebas, sehingga dibutuhkan suplai antioksidan sintetik dari luar tubuh seperti suplemen ekstrak kecambah kacang hijau.² Kecambah kacang hijau memiliki potensi yang mampu mengurangi tingkat stress oksidatif, sehingga perlu diketahui lebih lanjut efeknya terhadap kadar *glutathione peroksidase*, katalase, dan *superoxide dismutase*.³

Menurut data *Pesticide Action Network (PAN)* Internasional tahun 2007 hampir 1 sampai 41 juta orang mengalami dampak kesehatan dari pestisida.⁴ *World Health Organization (WHO)* memperkirakan setiap tahun

terjadi 1-5 juta kasus keracunan pada pekerja pertanian, dan 80% dari jumlah ini terjadi di negara berkembang dengan tingkat kematian sebesar 5,5% atau sekitar 220.000 jiwa.⁵ Kejadian keracunan pestisida di Indonesia setiap tahun lebih dari 12.000 kematian. Menurut Data Sentra Informasi Keracunan Nasional (SIKERNAS) pada tahun 2014 terdapat 710 kasus keracunan pestisida diberbagai wilayah di Indonesia disebabkan oleh paparan pestisida baik disengaja maupun tidak disengaja, akibat penggunaan pestisida yang tidak tepat dan terpapar dengan cara terhirup. Paparan pestisida mengakibatkan meningkatnya produksi radikal bebas yang berdampak mempercepat proses penuaan.⁶

Kecambah kacang hijau memiliki kandungan vitamin E (α -tokoferol), vitamin C, fenol, flavonoid, fitosterol dan beberapa mineral yang berfungsi sebagai antioksidan.⁷ Sebuah penelitian menyebutkan pemberian ekstrak etanolik kecambah kacang hijau pada dosis 2 g/kg selama 35 hari dapat memulihkan jumlah, dan morfologi normal spermatozoa menciit yang terpapar 2-Methoxyethanol.⁸ Sebuah penelitian lain juga menyebutkan dosis kecambah kacang hijau 0,67 g merupakan dosis optimal untuk mencegah peningkatan tekanan darah dan perubahan histopatologi aorta tikus *sprague dawley*.⁹ Penelitian yang dilakukan Novidiyanto (2016)¹⁰ menunjukkan bahwa pemberian kecambah kacang hijau dosis 0,5 mL/gBB dapat menurunkan

kadar MDA plasma pada jaringan hati tikus *sprague dawley* yang diberi pakan lemak tinggi.¹⁰

Pestisida jenis herbisida paraquat dapat menyebabkan toksisitas dalam tubuh dengan mempengaruhi siklus redoks dan membentuk *Reactive Oxygen Species* (ROS). Produksi ROS yang melebihi kapasitas enzim antioksidan dalam tubuh dapat menimbulkan stress oksidatif.¹¹ Stres oksidatif terjadi akibat adanya ketidakseimbangan antara produksi ROS dengan antioksidan endogen sehingga kadar *glutathione peroksidase*, katalase dan *superoxide dismutase* menurun. Keadaan ini dalam pencegahannya memerlukan antioksidan eksogen seperti kecambah kacang hijau. Ekstrak kecambah kacang hijau diketahui memiliki kandungan antioksidan yang cukup tinggi diantaranya kandungan vitamin E (*α-tokoferol*), vitamin C, fenol, flavonoid dan fitosterol yang berfungsi sebagai antioksidan.¹² Antioksidan enzimatik dan non enzimatik bekerjasama secara sinergis untuk menetralkan ROS dengan mendonorkan ion *hydrogen*, yang diharapkan dapat mencegah terjadinya penurunan kadar *glutathione peroksidase*, katalase dan *superoxide dismutase*. Oleh karena itu perlu penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh suplemen ekstrak kecambah kacang hijau terhadap kadar *glutathione peroksidase*, katalase dan *superoxide dismutase* pada tikus jantan yang diinduksi herbisida paraquat.¹³

1.2. Perumusan Masalah

Apakah suplemen ekstrak kecambah kacang hijau (*Phaseolus radiatus L.*) berpengaruh terhadap peningkatan kadar *glutathione peroksidase*, katalase dan *superoxide dismutase* pada tikus wistar jantan (*rattus norvegicus*) yang diinduksi herbisida paraquat ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk membuktikan pengaruh pemberian suplemen ekstrak kecambah kacang hijau terhadap peningkatan kadar *glutathione peroksidase*, katalase dan *superoxide dismutase* pada tikus wistar jantan (*rattus norvegicus*) yang diinduksi herbisida paraquat.

1.3.2. Tujuan Khusus

- a. Untuk membuktikan pengaruh pemberian suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dosis 21,6 mg/hari, 43,2 mg/hari dan 86,4 mg/hari terhadap peningkatan kadar *glutathione peroksidase* tikus yang diinduksi herbisida paraquat.
- b. Untuk membuktikan pengaruh pemberian suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dosis 21,6 mg/hari, 43,2 mg/hari dan 86,4 mg/hari terhadap peningkatan katalase tikus yang diinduksi herbisida paraquat.

- c. Untuk membuktikan pengaruh pemberian suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dosis 21,6 mg/hari, 43,2 mg/hari dan 86,4 mg/hari terhadap peningkatan *superoxide dismutase* tikus yang diinduksi herbisida paraquat.

1.4. Originalitas Penelitian

Perbedaan penelitian yang akan dilakukan dengan penelitian sebelumnya adalah variabel bebas menggunakan suplemen ekstrak kacang hijau dan variabel tergantung menggunakan *glutathione peroksidase*, katalase, dan *superoxide dismutase* pada tikus jantan galur wistar yang diinduksi herbisida paraquat.

Tabel 1. Originalitas Penelitian

Peneliti	Judul Penelitian	Metode	Hasil
Ain Yuanita Insani, Anciah Caesarina Novi Marchianti, Septa Surya Wahyudi, 2018 ¹⁴	Perbedaan Efek Paparan Pestisida Kimia dan Organik terhadap Kadar Glutathion (GSH) Plasma pada Petani Padi	Penelitian observasional rancangan penelitian <i>cross sectional</i> , Uji statistika menggunakan uji <i>Unpaired T-test</i>	Kadar GSH plasma petani anorganik dan organik $p < 0.05$. Petani anorganik memiliki rata-rata kadar GSH plasma petani organik. Hal tersebut terjadi karena para petani organik menggunakan bahan alami sehingga tidak menimbulkan residu dalam tubuh.
Tajuddin Abdullah, Vol. XIII No. 2, 2017 ¹⁵	Pengaruh Perebusan Kecambah Kacang Hijau (<i>Phaseolus radiates L.</i>) terhadap Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH	Penelitian eksperimen laboratorium	Perebusan kecambah kacang hijau (<i>Phaseolus radiates L.</i>) dengan metode DPPH memberikan efek antioksidan pada suhu peredaman 100°C dengan nilai % inhibisi = 0,2454 dan dari hasil

			analisis menggunakan SPSS menunjukkan hasil yang signifikan.
Zhaohui Xue, Cen Wang, Lijuan Zhai, Wancong Yu, Huiru Chang, Xiaohong Kou and Fengjuan Zhou. Czech J. Food Sci., 34, 2016 (1): 68-78 ¹⁶	<i>Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Mung Bean (Vigna radiata L.), Soybean (Glycine max L.) and Black Bean (Phaseolus vulgaris L.) during the Germination Process.</i>	Penelitian eksperimen laboratorium	<i>The analysis of relative contribution revealed that total phenolics and total flavonoids made the highest (44.87–90.31%) contribution to total antioxidant activity.</i>

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1. Manfaat secara Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang pengaruh suplemen ekstrak kecambah kacang hijau terhadap kadar *glutathione peroksidase*, katalase dan *superoxide dismutase* pada tikus wistar jantan (*rattus norvegicus*) yang diinduksi herbisida paraquat.

1.5.2. Manfaat secara Praktis

Memberikan pengetahuan tambahan kepada masyarakat tentang manfaat mengonsumsi kecambah kacang hijau sehingga dapat dijadikan sebagai pengobatan alternatif dalam peningkatan antioksidan enzimatik.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Superoxide Dismutase* (SOD)

2.1.1 Pengertian

Superoxide Dismutase merupakan metaloenzim yang mengkatalis dismutasi radikal anion *superoxide* (O_2^-) menjadi *hidrogen peroksida* (H_2O_2) dan oksigen (O_2) di dalam mitokondria. Selanjutnya H_2O_2 didalam mitokondria akan mengalami detoksifikasi oleh enzim katalase menjadi senyawa H_2O dan O_2 , sedangkan H_2O_2 yang berdifusi ke dalam sitosol akan didetoksifikasi oleh enzim *glutathion peroksidase*. SOD merupakan enzim antioksidan yang berefek sangat kuat dan merupakan pertahanan tubuh pertama dalam menghadapi radikal bebas. Keberadaan SOD dapat ditemukan di otak, hati, sel darah merah, ginjal, tiroid, testis, otot jantung, mukosa lambung, kelenjar pituitari, pankreas dan paru. SOD ditemukan pada seluruh makhluk hidup yang penting bagi perlindungan sistem aerobik untuk mencegah keracunan oksigen. Aktivitas SOD dapat dijadikan acuan pengukuran stress oksidatif dalam tubuh.^{17,18}

Klasifikasi antioksidan dibagi menjadi 2 yaitu:

1. Antioksidan enzimatik

Antioksidan enzimatik merupakan antioksidan endogen yang terdiri atas enzim *superoxide dismutase* (SOD), katalase (CAT), *glutathione peroksidase* (GPx), dan *glutathion reduktase* (GR). Kerja enzim tersebut yaitu melindungi jaringan dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh oksidan contohnya seperti anion *superoxide* ($O_2 \bullet^-$), radikal *hidroksil* ($OH \bullet$) radikal *peroksil* ($ROO \bullet$) dan *hidrogen peroksida* (H_2O_2).

2. Antioksidan non enzimatik

Antioksidan non enzimatik terdapat pada sayuran dan buah-buahan yang meliputi *glutathione* (GSH), vitamin C, E, β -karoten, flavonoid, isoflavon, flavon, antosiin, katekin, dan isokatekin, dan asam lemak. Senyawa-senyawa tersebut mampu mencegah kerusakan sel akibat dari radikal bebas. Selain multivitamin, mineral juga berperan dalam perbaikan respon hipersensitivitas tipe kulit tertunda pada manusia dengan berusia 59-85 tahun.¹⁸

2.1.2. Jenis- Jenis *Superoxide Dismutase* (SOD)

Berikut Jenis-jenis *Superoxide Dismutase* (SOD):

- 1) Cu, Zn SOD

Superoxide dismutase adalah protein dimerik dengan dua subunit yang identik diikat secara non kovalen. Cu, Zn SOD berperan penting sebagai sistem pertahanan tubuh terhadap radikal bebas. Terletak dalam sitoplasma dan organel dengan ukuran 32.000 kDA.

2) Mn SOD

Bekerja sebagai antioksidan utama dalam menghambat kerja *superoxide dismutase* di dalam mitokondria. Mn SOD berukuran 40.000 kDA yang terdiri dari 4 sub unit dengan atom mangan. Tipe ini disintesis terbanyak di cairan ekstraseluler oleh beberapa sel saja, contohnya sel endotel dan fibroblast.

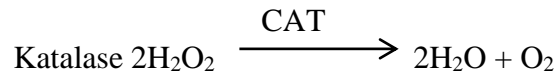
3) Fe SOD

Enzim yang banyak ditemukan pada prokariot, tumbuhan dan bakteri. Terdiri dari tiga ion besi yang berikatan dengan tiga histidin, satu aspartat, dan satu molekul air.¹⁸

2.2. Katalase (CAT)

Katalase merupakan enzim yang mengkatalisa penguraian hidrogen peroksida menjadi H₂O dan O₂. Hidrogen peroksida bersifat toksik terhadap sel karena bahan ini menginaktifkan enzim dalam sel. Hidrogen peroksida terbentuk sewaktu metabolisme aerob, sehingga mikroorganisme yang tumbuh dalam lingkungan aerob pasti menguraikan bahan tersebut.^{17,18}

Adapun reaksinya adalah:

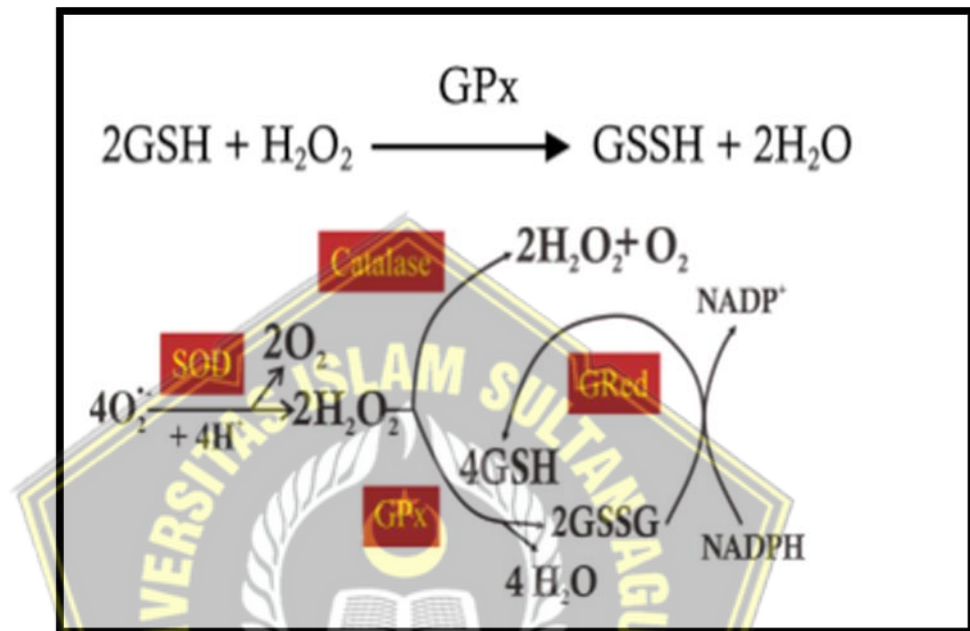


Katalase merupakan suatu enzim yang terdiri dari 4 sub unit protein. Setiap sub unitnya mengandung gugus Fe (III) yang terikat pada sisi aktifnya. Selain itu tiap sub unit biasanya juga mengandung satu unit NADPH yang membantu menstabilkan enzim. Katalase ditemukan pada darah, sumsum tulang belakang, membrane mukosa, jantung, ginjal dan hati. Sehingga pada organisme letak enzim katalase paling banyak terdapat di bagian abdomen. Katalase termasuk dalam enzim *oksidoreduktase*.¹⁸

2.3. *Glutathione Peroksidase (GPx)*

Glutathione peroksidase merupakan senyawa yang mengandung gugus *sulfhidril* (-SH). Senyawa yang mengandung *sulfhidril* dibagi menjadi dua kelompok yaitu senyawa gugus -SH protein dan kelompok gugus -SH nonprotein. *Glutathione* merupakan salah satu dari senyawa gugus -SH nonprotein. GPx disintesis oleh enzim γ -*glutamil-sisteinsintetase* dan *glutathion sintetase* yang terdapat di sitoplasma.^{17,18} Sel GPx berperan dalam sintesis prekursor DNA, reduksi ikatan disulfida protein, transpor asam amino, koenzim untuk beberapa enzim dan melindungi sel terhadap radikal bebas dan komponen toksik lain, baik yang berasal dari dalam atau dari luar tubuh. Sebagai antioksidan, GPx dapat bertindak sebagai substrat untuk *glutathione peroksidase* ataupun dapat secara langsung sebagai radikal bebas.

Adanya gugus *sulhidril* bebas dalam struktur molekul *glutathione* menyebabkan glutathione mampu melindungi sel terhadap beban oksidatif.¹⁷



Gambar 2.1. SOD, CAT, dan GPx Dalam Menetralisir ROS¹⁸

2.4. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Sekresi *Glutathione Peroksidase*, Katalase dan *Superoxide Dismutase*

Banyak faktor yang mempengaruhi stress oksidatif yang merupakan kondisi ketidak seimbangan dimana kadar radikal bebas lebih tinggi dibandingkan antioksidan. Kondisi yang mempengaruhi faktor tersebut seperti, usia, sinar *ultraviolet*, pestisida, sinar X dan asap rokok.

a. Usia

Seiring dengan bertambahnya usia, maka bertambah pula penumpukan radikal bebas dalam tubuh, hingga terjadi stres oksidatif. Lambat laun kondisi yang seperti ini dapat menginisiasi penuaan (*aging*).¹⁹ Aging akan mempengaruhi keseimbangan antioksidan dan prooksidan dalam tubuh. Hal tersebut yang akan mempengaruhi penurunan tajam pada *malondialdehyde* (MDA) dan antioksidan enzimatik meliputi katalase (CAT), *superoxide dismutase* (SOD), dan *glutathione peroxidase* (GPx). Antioksidan enzimatik tersebut memainkan peran penting dalam menetralkan produksi ROS yang berlebih. SOD mengblokir radikal bebas untuk menjadi air dan H₂O₂, sedangkan CAT dianggap sebagai pemulung H₂O₂ yang paling utama.²⁰

b. Ultraviolet

Pajanan UV berarti terdapat transmisi *foton* energik melalui lapisan kulit dan diabsorpsi molekul sel kromofor atau *photosensitizer* sehingga timbul efek biologik. *Ultraviolet A* bereaksi dengan *photosensitizer* atau kromofor pada kulit, seperti sitokrom, riboflavin, heme dan porfirin. Kromofor menyerap energi dari panjang gelombang UVA. Energi dilepaskan sehingga stabil dengan mentransfer molekul oksigen dan terbentuk singlet oksigen dan ROS lain. Polutan lingkungan seperti hidrokarbon aromatik polisiklik dapat diubah menjadi ROS diperantarai *quinon*. Suatu penelitian *in vitro* dan *in vivo* memperlihatkan hidrokarbon

aromatik polisiklik dan *benzoapyrene* bekerja sebagai *photosensitizer* bersama paparan UVA secara sinergis menghasilkan *superoxide* dan singlet *oxygen*.²¹

c. Pestisida

Pestisida dapat merusak keseimbangan antara prooksidan dan antioksidan dalam tubuh dan menyebabkan terjadinya peroksidasi lemak di dalam membran lemak. Masuknya zat racun dari pestisida kimia dapat memicu adanya stres oksidatif. Saat terjadi stress oksidatif terjadi pelepasan 2 molekul GPx untuk menangkal radikal bebas sehingga, ketika stress oksidatif meningkat akibat akumulasi zat-zat kimia dari pestisida maka molekul GPx yang digunakan semakin banyak dan berakibat pada penurunan GPx.^{17,22}

2.5. Kecambah Kacang Hijau

2.5.1. Deskripsi Kacang Hijau

Kacang hijau (*Phaseolus radiatus L.*) merupakan golongan dari tanaman polong-polongan yang kaya akan protein, vitamin, dan mineral. Genus *Vigna* terdapat 150 spesies, dimana dua puluh dua spesies asli India dan enam belas dari Asia Tenggara, akan tetapi jumlah utama spesies berasal dari Afrika. Biji kacang hijau rata-rata mengandung 26% karbohidrat, 1,4%, 4,2%, dan vitamin.²³ Berbagai organisasi kesehatan diseluruh dunia

merekomendasikan agar meningkatkan asupan nabati makanan untuk mencegah penyakit kronis dan meningkatkan kesehatan manusia. *Phaseolus radiatus L.* merupakan salah satu tanaman yang tumbuh pada musim panas dengan siklus pertumbuhan yang pendek yaitu 70 hingga 90 hari.²⁴

Kandungan gizi yang terkandung dalam biji kacang hijau kering yaitu karbohidrat, lemak, protein, asam lemak, asam amino serat, abu, dan mikronutrient seperti (mangan, seng, besi, selenium, tembaga) serta juga mengandung *thiamin*, asam *pantoteat*, *niasin*, *riboflavin*, karotenoid (β -*karoten* dan *xantofil*), vitamin C, vitamin E (*tokoferol*). Vitamin C mengandung sekisar 0-10 mg/ 100 g dengan rata-rata 3,1 mg/ 100 g. Kacang hijau juga mengandung *tokoferol* dan *tokotrienol* sekisar α 10,9 mg/100 g lemak, β 0,9 mg/100 g lemak, dan pada cop *tokoferol* 1458 mg/100 g lemak, sedangkan α 2,7 mg/100 g lemak, β 0,9 mg/100 g lemak, dan pada *cot-tokotrienol* 1,9 mg/100 g lemak serta kandungan *tokoferol* 12,5 mg/100 g lemak.²⁵

2.5.2. Kecambah Kacang Hijau

Kecambah kacang hijau merupakan hasil pertumbuhan dari biji kacang hijau yang disemai. Proses ini disertai dengan mobilisasi cadangan makanan dari jaringan penyimpanan atau keping biji ke bagian vegetatif (sumber pertumbuhan embrio atau lembaga). Germinasi selama 2 hari dapat menghasilkan kecambah dengan panjang mencapai 4 cm, dan dalam 3-5 hari

dapat mencapai 5-7 cm. Faktor-faktor lingkungan yang berpengaruh dalam perkecambahan adalah: air, gas, suhu dan cahaya. Temperatur optimum untuk perkecambahan adalah 34°C.^{26,27}

Biji kacang hijau dapat berkecambah apabila berada dalam lingkungan yang memenuhi syarat untuk perkecambahan, yaitu kandungan air kacang hijau dan kelembaban udara sekeliling harus tinggi. Kadar air biji kacang hijau berkisar 5-15%, pada kadar air ini kelembaban terlalu rendah untuk berlangsungnya metabolisme sehingga tahap perkecambahan adalah kadar air biji kacang hijau harus dinaikkan dengan cara dilakukan perendaman atau ditempatkan pada lingkungan yang jenuh uap air.²⁴

Proses perkecambahan mampu meningkatkan kadar antioksidan vitamin C dan vitamin E. Perkecambahan itu juga meningkatkan kadar niasin dan riboflavin secara signifikan.²⁴ Kecambah diproduksi berbasis komersial, diperlukan suatu varietas baik yang memiliki sifat diinginkan seperti hasil yang tinggi, dapat beradaptasi pada kondisi iklim yang berbeda dan toleran terhadap hama penyakit. Serta memiliki folat dan protein yang dapat memperkecil risiko timbulnya penyakit kardiovaskular dan merendahkan LDL (*Low Density Lipoprotein*) dalam darah.^{24,13}

Vitamin E adalah salah satu fitonutrien yang secara alami memiliki 8 isomer, yaitu dikelompokkan dalam 4 *tokoferol* (α , β , γ , δ) dan 4 *tokotrienol* (α , β , γ , δ). Suplemen vitamin E di alam yang terbanyak adalah dalam bentuk

α-tokoferol. Senyawa ini telah diketahui sebagai antioksidan yang mampu mempertahankan integritas membran sel. Senyawa ini juga dilaporkan bekerja sebagai *scavenger* radikal bebas oksigen, peroksidasi lipid, dan oksigen singlet³⁰. Sebagai antioksidan, vitamin E berfungsi sebagai donor ion hidrogen yang mampu mengubah radikal peroksil menjadi radikal *tokoferol* yang kurang reaktif, sehingga tidak mampu merusak rantai asam lemak. Kandungan vitamin E dinilai sebagai kandungan antioksidan yang paling besar kadarnya dalam kecambah jika ditinjau efek antioksidan yang dapat ditimbulkan.^{13,25} Kandungan vitamin E dalam kecambah kacang hijau adalah 1,53 mg per 10 g.²⁸

Fitosterol merupakan senyawa *sterol* tanaman. Senyawa ini sebenarnya banyak terkandung dalam minyak nabati yang berhubungan dengan sifat hipokolesterolemia. Berdasarkan laporan penelitian menunjukkan bahwa *fitosterol* dan komponennya (*β-sitosterol*, *stigmasterol*, dan *campesterol*) dapat melawan peroksidasi lipid yang dapat diakibatkan oleh peningkatan *low density lipoprotein* (LDL). *Fitosterol* secara kimiawi bertindak sebagai suatu antioksidan, *scavenger* radikal bebas, dan secara fisik sebagai penyetabil membran. Mekanisme kerja antioksidan terhadap radikal bebas yaitu dengan mencegah atau menghambat terbentuknya radikal bebas baru, inaktivasi ataupun menangkap radikal, memotong propagasi (pemutusan rantai), serta dan perbaikan sel (*repair*) kerusakan sel akibat radikal bebas.¹³

2.6. Herbisida Paraquat

2.6.1. Deskripsi Herbisida Paraquat

Herbisida paraquat adalah salah satu jenis herbisida non-selektif dan secara luas sering digunakan, terutama pada sistem pertanian dan oleh agen pemerintah dan perindustrian untuk mengontrol hama tanaman. Paraquat berbentuk kristal putih padat, higroskopis, warna merah tua dan memiliki aroma amoniak yang menyengat. Paraquat dalam larutan, cepat mengalami penguraian oleh sinar ultraviolet sebagaimana telah terbukti bahwa larutan kation *1,1-dimetil-4,4-bipiridilium* klorida ditempat gelap selama tujuh hari tidak mengalami pengurangan yang signifikan tetapi pada tempat yang terang terjadi pengurangan hingga 85%.²⁸

Tingginya intensitas aplikasi dan jumlah herbisida yang diaplikasikan menimbulkan kekhawatiran yang cukup beralasan mengenai bahaya pencemaran yang berasal dari residu herbisida yang tertinggal dilingkungan, khususnya dalam tanah dan air. Residu herbisida dalam air dan tanah dikhawatirkan akan menimbulkan gangguan kesehatan bagi manusia dan hewan serta dapat mengganggu pertumbuhan tanaman budidaya pada musim berikutnya. Penggunaan herbisida paraquat memberikan manfaat bagi petani, yaitu meningkatkan hasil produksi pertanian dengan mencegah hama. Disisi lain, herbisida juga memberikan dampak pencemaran lingkungan yang signifikan bagi ekosistem, hal ini dikarenakan bahan aktif pestisida adalah persisten organic pollutant. Penggunaan herbisida dengan sembarangan juga

dapat mengakibatkan terjadinya keracunan herbisida. Faktor-faktor yang mempengaruhi adalah tingkat pendidikan, lama menyemprot, frekuensi penyemprotan, dan status gizi.²⁹

Herbisida paraquat memberikan efek toksik pada manusia. Efek toksik yang ditimbulkan berbeda, tergantung bagaimana zat tersebut masuk kedalam tubuh manusia. Beberapa diantaranya yaitu:

1. Oral

Merupakan jalan masuknya zat yang paling sering yang didasari adanya tujuan bunuh diri. Tertelannya paraquat juga dapat terjadi secara kebetulan atau dari masuknya butiran semprotan kedalam faring, namun biasanya tidak menimbulkan keracunan secara sistemik.³⁰

2. Inhalasi

Belum ada kasus keracunan sistemik yang dilaporkan dari paraquat akibat inhalasi droplet paraquat yang ada di udara.³⁰

3. Kulit

Kulit normal yang intak merupakan barier yang baik mencegah absorpsi dan keracunan sistemik. Namun, jika terjadi kontak yang lama dan lesi kulit yang luas, keracunan sistemik dapat terjadi dan dapat menyebabkan keracunan yang berat sampai kematian. Kontak yang lama dan trauma dapat memperburuk kerusakan kulit, namun ini terbilang jarang.³⁰

4. Mata

Konsentrat paraquat yang terpercik dapat menyebabkan iritasi mata yang jika tidak diobati dapat menyebabkan erosi atau ulkus dari kornea dan epitel konjungtiva. Inflamasi tersebut berkembang lebih dari 24 jam dan ulserasi yang terjadi menjadi faktor resiko infeksi sekunder. Jika diberikan pengobatan yang adekuat, penyembuhan biasanya sempurna walaupun memakan waktu lama.³⁰

2.5.2. Mekanisme Toksisitas Herbisida Paraquat Diklorida Dalam Tubuh Terhadap Kadar Glutation, Katalase dan Superoxide Dismutase

Herbisida dapat menimbulkan efek pada hama khususnya tanaman pengganggu, namun herbisida dapat mempengaruhi mekanisme yang penting bagi bentuk kehidupan yang lebih tinggi seperti manusia dan hewan. Herbisida tidak berbahaya bagi manusia dan hewan dalam dosis kecil, karena ukurannya yang jauh lebih besar dari hama tanaman pengganggu, tetapi dalam jumlah dosis tertentu akan membahayakan manusia dan hewan. Kontak dengan herbisida akan mengakibatkan efek bakar yang langsung dan dapat terlihat pada penggunaan kadar tinggi karena kandungan asam *sulfat* 70%, besi *sulfat* 30%, tembaga *sulfat* 40%, dan paraquat. Keracunan herbisida menyebabkan rusaknya lapisan selaput lendir saluran pernafasan, dehidrasi, rasa terbakar di saluran pencernaan, terganggunya sistem pernafasan yang akhirnya menyebabkan korban kejang, muntah, koma akibat kekurangan

oksigen hingga kematian mendadak jika tidak segera mendapatkan pertolongan.^{31,29}

Paraquat dapat menyebabkan induksi toksisitas dalam tubuh dikarenakan kemampuannya untuk mempengaruhi siklus redoks dan membentuk *Reactive Oxygen species* (ROS). Ini merupakan bahan reduksi alternatif dan reoksidasi berulang akan menyebabkan terbentuknya oksigen *free radicals*, seperti *superoxide*, *hidrogen peroksida*, dan *hidroksil radikal*, yang menyebabkan kerusakan oksidatif pada lemak, protein, dan DNA. Paraquat akan menyebabkan peningkatan reaksi oksidasi di dalam tubuh dengan cara dimetabolisme oleh berbagai enzim seperti *Nikotinamideadenine dinukleotide phosphate oxidase* (NADPH) sehingga akan meningkatkan ROS.³¹

Selain dapat menyebabkan kerusakan lokal dan disfungsi organ akibat hilangnya regulasi intra seluler Ca^{2+} , hasil metabolisme dari paraquat oleh berbagai enzim seperti NADPH akan menyebabkan terjadinya toksisitas mitokondria. Toksisitas mitokondria disebabkan karena berkurangnya kompleks *NADH-ubiquinone oxidoreductase* di mitokondria sehingga mencetuskan terbentuknya *superoxide*. Paraquat juga meningkatkan permeabilitas membran mitokondria bagian dalam dikarenakan lipid peroksida sehingga menyebabkan depolarisasi membran, dan pembengkakan matriks mitokondria, khususnya pada hati yang memiliki peran sebagai detoksifikasi paraquat. Paparan herbisida golongan paraquat diklorida

berpengaruh ke organ-organ tubuh seperti paru-paru, jantung, ginjal, hati, otot, limpa, kulit, mata dan otak. Pada kulit, paraquat menyebabkan kerusakan kulit lokal termasuk dermatitis kontak yang menimbulkan eritema, abrasi dan ulserasi.³¹

2.7. Efek Suplemen Ekstrak Kecambah Kacang Hijau Terhadap Kadar *Gluthatione Peroksidase, Katalase dan Superoxide Dismutase*

Efek dari toksisitas herbisida paraquat diklorida adalah menimbulkan stress oksidatif sehingga akan membentuk radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan pada jaringan.³¹ Stres oksidatif merupakan suatu kondisi yang terjadi karena adanya ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas dengan sistem pertahanan antioksidan di dalam tubuh. Disebut juga salah satu kondisi ketidakseimbangan antara ROS yang terbentuk dengan mekanisme pertahanan antioksidan, baik disebabkan oleh produksi ROS yang meningkat, berkurangnya produksi antioksidan, atau keduanya.²⁹

Stres oksidatif berperan besar pada penuaan kulit, terutama yang terjadi secara intrinsik, dengan menimbulkan kerusakan oksidatif pada berbagai komponen selular, merangsang apoptosis, mengganggu proses komunikasi antar sel, serta menjadi penyebab atau ikut berperan pada penyakit terkait penuaan. Kerusakan akibat ROS bergantung pada sifat masing-masing molekul. O₂-bersifat sangat reaktif dan tidak mudah berdifusi ke luar sel, sehingga kerusakan yang diakibatkan oleh molekul ini bersifat lokal. Molekul H₂O₂ mudah larut

dalam lemak, sehingga dapat berdifusi ke luar sel dan mengakibatkan kerusakan yang jauh dari tempat produksinya. Molekul OH. memiliki waktu paruh yang sangat singkat dan bereaksi hampir dengan seluruh komponen di sekitarnya, misalnya mtDNA, lipid, dan protein.³²

Kecambah kacang hijau diketahui memiliki berbagai kandungan zat antioksidan seperti vitamin E (*α-tokoferol*), vitamin C. Peningkatan beberapa vitamin B1 (*thiamin*), B2 (*riboflavin*), B3 (*niacin*), *piridoksin*, dan *biotin*, juga terjadi selama proses perkecambahan²⁵. Vitamin yang ditemukan dalam tauge adalah vitamin C, *thiamin*, *riboflavin*, *niacin*, asam *pantothenik*, vitamin B6, folat, kolin, *β-karoten*, vitamin A, vitamin E (*atokoferol*), dan vitamin K.²⁵ Kecambah kacang hijau memiliki kandungan *fitosterol* (15mg/100g) yang berfungsi sebagai antioksidan. Kandungan vitamin E dinilai sebagai kandungan antioksidan yang paling besar kadarnya dalam kecambah jika ditinjau efek antioksidan yang dapat ditimbulkan.¹³

Antioksidan sangat diperlukan oleh tubuh untuk mengatasi dan mencegah stres oksidatif. Antioksidan melindungi sel dari kerusakan radikal bebas dengan mendonorkan satu elektron bebas ke radikal bebas atau menerima satu elektron yang tidak stabil sehingga menjadi stabil dan menghentikan reaksi rantai serta mencegah kerusakan lipid, protein dan DNA. Antioksidan merupakan radikal yang paling tidak reaktif. Antioksidan “radikal” dapat distabilkan oleh antioksidan lain. Antioksidan yang diproduksi dalam tubuh (*gluthatione peroksidase*, katalase dan *superoxide dismutase*) akan bekerjasama dengan

antioksidan dari luar tubuh seperti vitamin C (asam *askorbat*), vitamin E (*alfa tokoferol*), vitamin A (*retinoid*) dan *ubiquinone* untuk bekerja sama secara sinergis untuk menetralkan radikal bebas (ROS).^{13,32}



BAB III

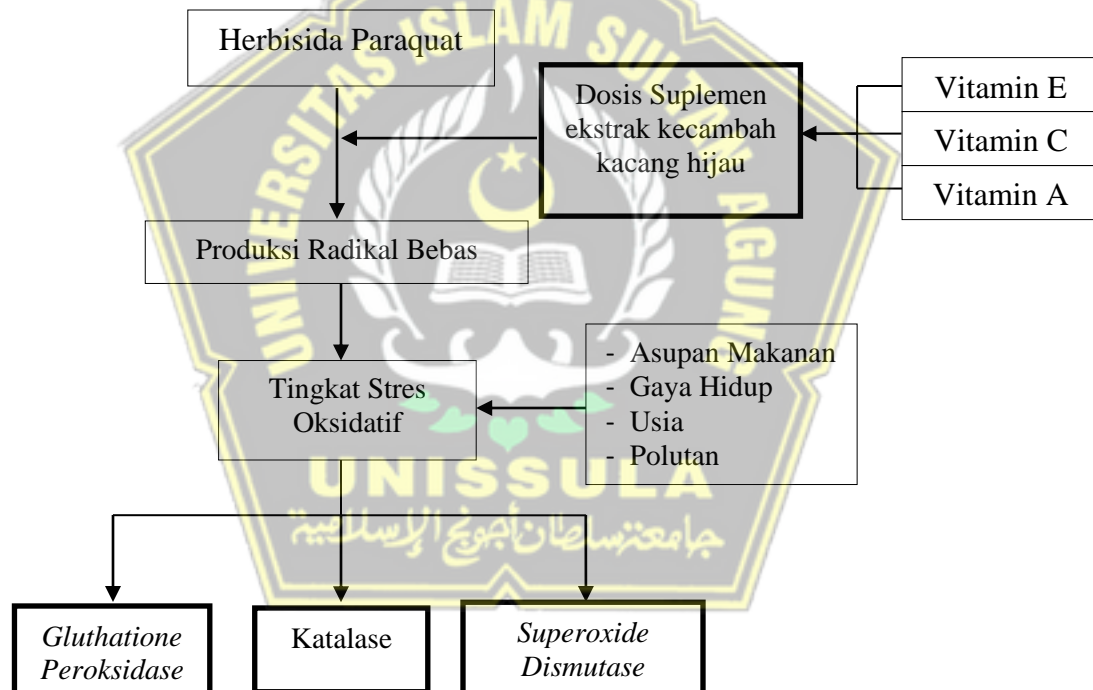
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori

Kecambah kacang hijau diketahui memiliki berbagai kandungan zat antioksidan seperti vitamin E (*α-tokoferol*), vitamin C. Peningkatan beberapa vitamin B1 (*thiamin*), B2 (*riboflavin*), B3 (*niacin*), *piridoksin*, dan *biotin*, juga terjadi selama proses perkecambahan. Vitamin yang ditemukan dalam tauge adalah vitamin C, *thiamin*, *riboflavin*, *niacin*, asam *pantothenik*, vitamin B6, folat, kolin, *β-karoten*, vitamin A, vitamin E (*atokoferol*), dan vitamin K.²⁵ Kecambah kacang hijau memiliki kandungan *fitosterol* (15mg/100g) yang berfungsi sebagai antioksidan. Kandungan vitamin E dinilai sebagai kandungan antioksidan yang paling besar kadarnya dalam kecambah jika ditinjau efek antioksidan yang dapat ditimbulkan.^{13, 25}

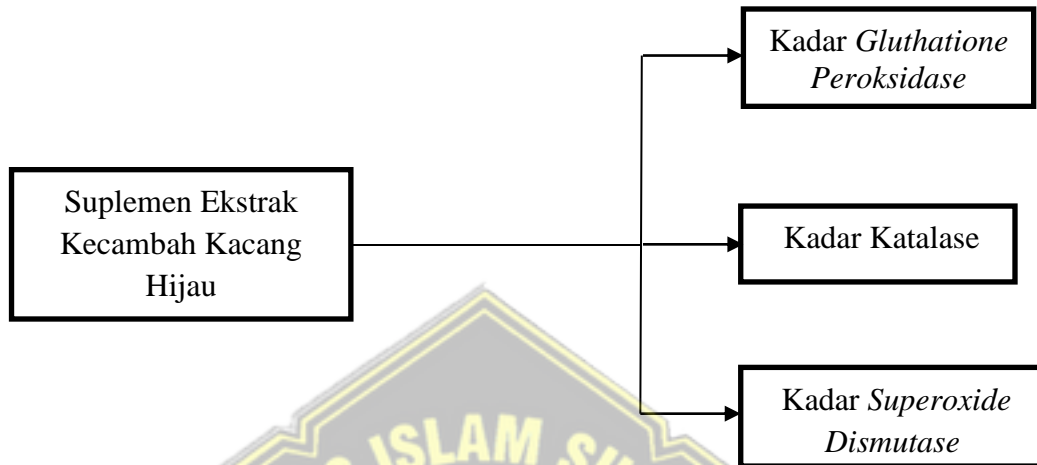
Penggunaan suplemen ekstrak kecambah kacang hijau pada penelitian ini diharapkan mampu menekan kadar ROS (*Reactive Oxygen Species*) dan tingkat stress oksidatif yang ditimbulkan dari paparan herbisida paraquat sehingga dapat mencegah kerusakan pada antioksidan enzimatik. Paparan pestisida seperti herbisida yang berulang juga diketahui dapat meningkatkan produksi ROS, dan salah satu herbisida yang dapat meningkatkan produksi ROS adalah paraquat. Ketidakseimbangan faktor *prooksidan* (ROS) dan antioksidan menyebabkan stres oksidatif, menyebabkan kerusakan seluler pada lipid, karbohidrat protein, dan struktur DNA *irreversible*.²⁵

Antioksidan enzimatik terdiri atas *superoxide dismutase*, katalase dan *gluthatione peroksidase*.³³ Antioksidan enzimatik bekerja untuk menstabilkan H_2O_2 . *Superoxide dismutase* mengkatalisis anion *superoxide* menjadi H_2O_2 yang merupakan ROS yang kurang reaktif. *Hidrogen peroksida* ini kemudian oleh katalase dan GPx akan diuraikan menjadi H_2O dan O_2 . Antioksidan non enzimatik yang terkandung pada kecambah kacang hijau salah satunya adalah *alfa tokoferol* (vitamin E), asam askorbat (vitamin C).^{32,33}



3.1 Skema Kerangka Teori

3.2. Kerangka Konsep



3.2 Skema Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

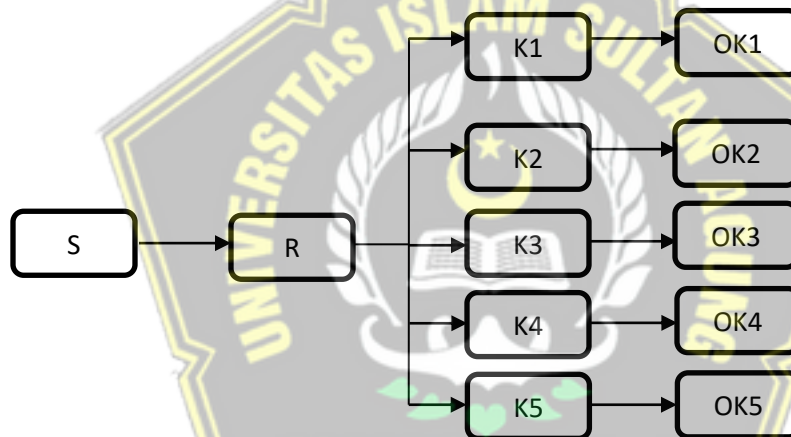
Pemberian suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dapat meningkatkan kadar *gluthatione peroksidase*, katalase dan *superoxide dismutase* pada tikus wistar jantan yang diinduksi herbisida paraquat.

BAB VI

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan jenis penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan penelitian *Posttest Only Controlled Group Design*.



Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

- S : Subyek penelitian
- R : Randomisasi menjadi 5 kelompok
- K1 : Kelompok kontrol dengan pemberian pakan *standard* tanpa diinduksi herbasida paraquat.
- K2 : Kelompok perlakuan dengan pemberian pakan *standard* dan diinduksi herbasida paraquat.
- K3 : Kelompok perlakuan diberi suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dosis 21,6 mg/hari dan diinduksi herbasida paraquat.
- K4 : Kelompok perlakuan diberi suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dosis 43,2 mg/hari dan diinduksi herbasida paraquat.
- K5 : Kelompok perlakuan diberi suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dosis 86,4 mg/hari dan diinduksi herbasida paraquat.
- OK1 : Observasi pada kelompok 1

- OK2 : Observasi pada kelompok 2
- OK3 : Observasi pada kelompok 3
- OK4 : Observasi pada kelompok 4
- OK5 : Observasi pada kelompok 5

4.2. Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1. Populasi Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah tikus putih *rattus norvegicus* jantan galur wistar yang diperoleh dari Unit Pelayanan Hewan Percobaan Universitas Gajah Mada Yogyakarta sebanyak 25 ekor.

4.2.2. Sampel Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan secara acak (*simple random sampling*) sesuai kriteria inklusi, eksklusi dan *drop out*.

a) Kriteria Inklusi :

- Berumur 8-12 minggu
- Berat badan sekitar 150-200 gram

b) Kriteria Eksklusi :

- Terdapat kecacatan anatomi
- Tikus menjadi sakit selama perlakuan

c) Kriteria *drop out* :

- Mati selama penelitian

4.2.3. Besar Sampel

Untuk menghitung besar sampel digunakan rumus Frederer (1995), yaitu :

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

Keterangan :

n = jumlah hewan yang diperlukan

t = jumlah kelompok perlakuan

Dari rumus diatas maka besar sampel dapat dihitung sebagai berikut :

Diketahui t = 5

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

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

$$4 (n-1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n = 19/4$$

$$n = 4,75$$

Dari rumus yang digunakan maka diperoleh besar sampel adalah 4,75 atau dibulatkan menjadi 5 ekor tikus per kelompok. Hal ini sesuai dengan kriteria WHO tahun 2000, bahwa besar sampel penelitian dalam tiap kelompok perlakuan berjumlah 5 ekor. Untuk mencegah terjadinya *drop out* di tengah-tengah penelitian karena tikus mati atau sakit, maka dilakukan koreksi besar sampel. Untuk antisipasi *drop out* jadi

dalam penelitian ini didapatkan besar sampel tiap perlakuan minimal enam ekor tikus, sehingga jumlah total tikus yang dibutuhkan sebanyak 25 ekor tikus.

4.3. Variabel Penelitian

- 1) Variabel Independen : dosis suplemen ekstrak kecambah kacang hijau (21,6 mg/hari, 43,2 mg/hari dan 86,4 mg/hari BB)
- 2) Variabel Dependen : kadar *gluthatione peroksidase*, katalase dan *superoxide dismutase*.
- 3) Variabel Prakondisi : Herbisida Paraquat

4.4. Definisi Operasional

- 1) Variabel Independen

Dosis suplemen ekstrak kecambah kacang hijau

Suplemen ekstrak kecambah kacang hijau yang diberikan pada hewan coba berupa bubuk dari hasil ekstraksi kecambah yang kemudian diencerkan dengan aquades sehingga berbentuk cairan yang diberikan per oral dengan menggunakan sonde tumpul dengan berbagai macam dosis yang berbeda pada tiap kelompok percobaan, yaitu dosis 21,6 mg/hari, 43,2 mg/hari dan 86,4 mg/hari BB.

Skala data : Rasio

2) Variabel Dependent

a. Kadar *Gluthatione Peroksidase* (GPx)

Kadar GPx diperoleh dari hasil pemeriksaan sampel darah yang diambil dari sinus orbital kemudian dimasukkan ke dalam tabung *Eppendorf* yang diisi antikoagulan berupa heparin, kemudian sentrifugasi selama 15 menit. Sebelum diperiksa, bawa semua reagen dan sampel ke suhu kamar sebelum digunakan. Menggunakan metode ELISA dengan satuan unit aktivitas enzim per milligram (U/mg). Skala data : Rasio

b. Katalase

Pemeriksaan Kadar Katalase sebagai parameter antioksidan yang diukur dengan spektrofotometri. Aktivitas katalase yang diambil adalah aktivitas spesifik katalase. Menggunakan metode ELISA dengan satuan unit aktivitas enzim per milliliter (U/ml). Skala data : Rasio

c. *Superoxide Dismutase* (SOD)

Pemeriksaan Kadar SOD sebagai parameter antioksidan yang diukur dengan spektrofotometri dan hasil pengukuran dalam satuan unit/ml pada setiap kelompok perlakuan. Kadar normal SOD pada penelitian ini sesuai dengan kadar SOD pada kelompok kontrol. Menggunakan metode ELISA dengan satuan persen (%). Skala data : Rasio

4.5. Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1. Alat

Kandang tikus dengan tempat pakan dengan ukuran P: 40 cm, L: 30 cm, T: 30 cm, Timbangan tikus “*Nigushi Scale*”, Sarung tangan, pipet tetes, tabung *ependorf*, kamera digital, spektrofotometer, mikropipet, ELISA *reader*.

4.5.2. Bahan

- a. *Suplemen Ekstrak Kecambah Kacang Hijau*
- b. *Aquadest*
- c. Reagen Kit GPx
- d. Reagen Kit Katalase
- e. Reagen Kit SOD

4.6. Cara Penelitian

4.6.1. Cara Persiapan Sebelum Perlakuan

- a. Sampel penelitian yaitu hewan coba harus masuk dalam kriteria inklusi, diambil secara acak sederhana sebanyak 30 ekor dengan rincian terdapat 5 kelompok dengan jumlah masing-masing sampel tiap kelompoknya adalah 6 ekor, terdiri dari kelompok kontrol dan empat kelompok perlakuan, kemudian diadaptasikan terlebih dahulu selama satu minggu.

- b. Sampel sebanyak 25 ekor tikus jantan galur wistar diaklimatisasi di laboratorium PSPG UGM.
- c. Pemeliharaan hewan coba dengan 5 kelompok tadi diberikan pakan standar terdiri dari protein 20-25%, pati 45-55%, lemak 10-12%, dan serat kasar 4% serta minum air putih yang sama setiap hari selama 7 hari.³⁴

4.6.2 Cara Pemberian dan Pembuatan Dosis Suplemen Ekstrak Kecambah Kacang Hijau

Suplemen ekstrak kecambah yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai kandungan optimal yaitu sebagai antioksidan, didalamnya ada kandungan seperti vitamin E yang berguna untuk antioksidan manusia dengan dosis 15 mg perhari. Dosis utama yang diberikan ditentukan berdasarkan hasil konversi dari manusia ke tikus yang setara dengan pemberian 9,8 g ekstrak kecambah pada orang dewasa dengan berat badan 70 kg. Dosis pemberian ekstrak kecambah pada penelitian ini dibedakan dalam tiga dosis, yaitu dosis I = 43,2mg/g BB, dosis II = 86,4 mg/g BB dan dosis III = 129,6 mg/g BB tikus. Masing-masing dosis yang disondekan tersebut adalah suplemen ekstrak kecambah yang telah diencerkan dengan aquades.

4.6.3 Cara Pemberian Herbisida Paraquat

Pada penelitian yang dilakukan oleh Rofiqoh, menyatakan bahwa pemberian dosis herbisida paraquat 20 mg/kg BB secara oral dapat menurunkan aktivitas antioksidan tubuh. Pemberian induksi herbisida paraquat pada penelitian ini adalah dosis 4 mg/200g BB.

4.6.4 Prosedur Pemeriksaan *Gluthatione Peroksidase*

Aktivitas enzim *Gluthatione Peroksidase* (GPx) plasma dilakukan dengan cara sebanyak 100 uL plasma diencerkan dengan 200 uL NaCl fisiologis (larutan 0,85% NaCl). Diambil 0,1 mL larutan tersebut dan ditambahkan 0,4 mL triton-X 0,5%, dan seterusnya disebut hemolisat. Ke dalam tabung uji diambil 100 uL hemolisat dan ditambahkan 100 uL larutan Drabkin lalu dikocok, kemudian ditambahkan 2,6 mL bufer fosfat dan dikocok perlahan. Berturut-turut ditambahkan 0,1 mL NADPH, 0,01 mL GSSG-R, 0,01 mL NaN₃, 0,1 mL GSH, dan dikocok. Sebelum dibaca laju absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm, ke dalam kuvet silika yang berisi larutan yang akan dibaca absorbansinya ditambahkan 1 mL H₂O₂. Pembacaan absorbansi dilakukan dengan selang waktu 1 sampai 2 menit. Untuk pembuatan blanko digunakan 100 uL akuades sebagai pengganti hemolisat.⁹ Satu unit aktivitas GPx didefinisikan sebagai banyaknya GPx yang diperlukan untuk mengoksidasi 1 umol NADPH per menit.

4.6.5 Prosedur Pemeriksaan SOD

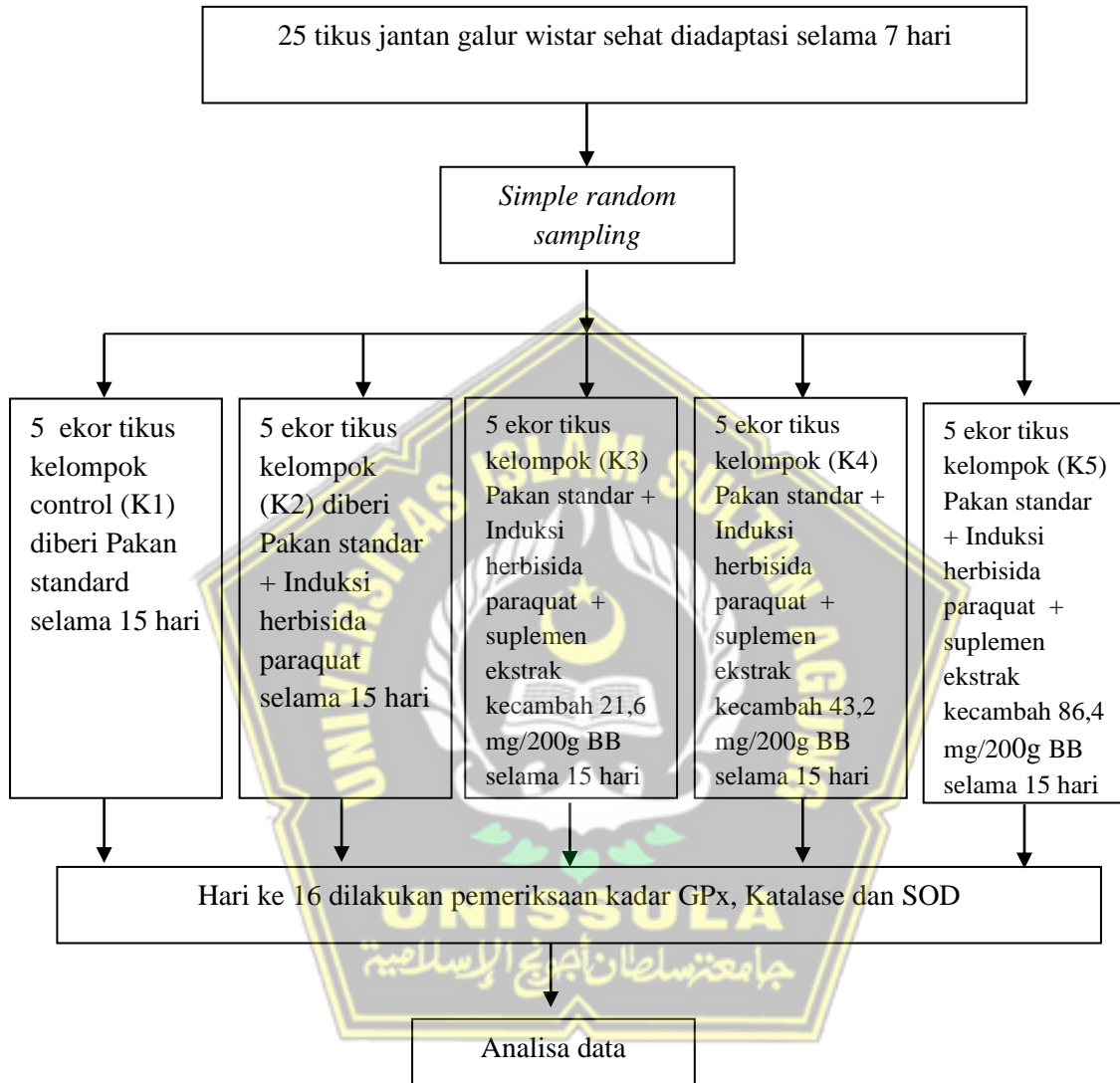
Aktivitas enzim *superoksida dismutase* (SOD) total plasma pada awalnya dibuat larutan stok SOD. Aktivitas SOD diukur berdasarkan laju penghambatan reduksi ferisitokrom c oleh anion superoksida yang dihasilkan oleh xantin/xantin oksidase. Xantin teroksidasi menjadi asam urat, sedangkan anion superoksida yang terbentuk selanjutnya mereduksi ferisitokrom c. Reduksi ferisitokrom c diamati berdasarkan kenaikan absorbansi pada panjang

gelombang 550 nm. Pengukuran aktivitas ini berlangsung pada suhu 25 oC, larutan xantin oksidase harus tetap dalam keadaan dingin sebelum digunakan. Medium reaksi segera disiapkan sebelum pengukuran dengan memasukkan 2,9 mL larutan A (campuran larutan 0,76 mg xantin dalam 10 mL 0,001 M NaOH, dengan larutan 1,8 mg sitokrom c dalam 100 mL bufer fosfat pH 7,8 tanpa EDTA) ke dalam tabung reaksi 3 mL. Selanjutnya ditambahkan 50 uL larutan baku (kontrol) atau sampel dan divorteks perlahan. Reaksi dimulai dengan menambahkan 50 uL larutan B (xantin oksidase 2,88 mg/mL dalam bufer fosfat EDTA) dan divorteks perlahan. Diamati perubahan absorbansi yang terjadi pada spektrofotometer

4.6.6 Prosedur Pemeriksaan Katalase

Aktivitas enzim katalase plasma diawali dengan pembuatan lisat: 200 uL plasma ditambahkan 800 uL larutan 0,5% triton X-100, kemudian dipersiapkan larutan standar untuk pengukuran sampel. Dibuat larutan induk dengan melarutkan 10 uL katalase dalam 50 mL bufer fosfat. Larutan standar dibuat dengan melarutkan 0,5 mL larutan induk dalam 9,5 mL bufer fosfat (1/20) dan 0,5 mL larutan induk dalam 19,5 mL bufer fosfat (1/40). Sebanyak 10 uL lisat dicampurkan dengan 12,5 mL bufer fosfat. Reaksi mulai terjadi setelah ditambahkan 1 mL H₂O₂. Seluruh larutan divorteks perlahan, lalu penurunan absorbansi dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 240 nm, dengan selang waktu 15 detik, 30 detik, 45 detik, dan 60 detik. Nilai A₂₄₀ berkisar 0,02–0,10.

4.7 Alur Kerja



4.8. Teknik Pengumpulan Data

Data diperoleh dengan menghitung kadar *glutathion peroksidase*, katalase dan *superoxide dismutase* pada tikus, selanjutnya data ditabulasikan ke dalam tabel pengumpulan data.

4.9 Tempat dan Waktu Penelitian

- a. Penelitian menggunakan hewan coba tikus dilakukan di Laboratorium PSPG Universitas Gadjah Mada pada bulan Juni-Agustus 2021.
- b. Pemeriksaan kadar kadar *glutathione peroksidase*, katalase dan *superoxide dismutase* dilakukan di Laboratorium PSPG Universitas Gadjah Mada pada bulan Juni-Agustus 2021.

4.10 Analisis Data

Data rerata kadar *glutathione peroksidase*, katalase dan *superoxide dismutase* disajikan secara deskriptif dalam bentuk tabel dan grafik. Data kemudian dilakukan uji normalitas dengan uji *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas data dengan uji *Levene test*. Distribusi data Katalase didapatkan normal dan tidak homogen, sehingga dilanjutkan dengan uji non parametrik uji *Kruskal Wallis* antar kelompok didapatkan dengan nilai $p < 0,05$ dilanjut dengan uji beda non parametrik dua kelompok menggunakan uji *Mann Whitney*. Distribusi data GPx dan SOD didapatkan normal dan homogen, sehingga dilanjutkan dengan uji parametrik uji *One Way Anova* yang didapatkan dengan nilai $p < 0,05$ dilanjut dengan uji *post hoc* dengan uji *Tukey*..

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

Penelitian pemberian suplemen ekstrak kecambah kacang hijau terhadap kadar *glutathione peroksidase*, katalase dan *superoxide dismutase* pada tikus wistar jantan (*rattus norvegicus*) yang diinduksi herbisida paraquat telah dilakukan selama 15 hari. Hasil penelitian tersebut tertera pada tabel 5.1

Tabel 5.1 Hasil analisis rerata kadar GPx, Katalase dan SOD

Variabel	Kelompok					Sig.(p)
	K1 N=5 Mean	K2 N=5 Mean	K3 N=5 Mean	K4 N=5 Mean	K5 N=5 Mean	
Kadar GPx	73,46	24,08	50,00	58,34	64,82	
Std.deviasi	1,48	1,48	1,84	1,60	2,11	
Shapiro Wilk	0.926*	0.926*	0.899*	0.756*	0.833*	
Levene Test						0,925**
One Way Anova						0.000***
Kadar Katalase	5,93	1,78	3,84	4,76	5,11	
Std.deviasi	0,21	0,05	0,86	0,10	0,17	
Shapiro Wilk	0,896*	0,884*	0,957*	0,904*	0,795*	
Levene Test						0.045
Kruskal Wallis						0.000***
Kadar SOD	82,30	32,78	52,78	62,30	73,77	
Std.deviasi	3,15	3,66	3,15	2,59	2,59	
Shapiro Wilk	0,928*	1.000*	0.928*	0.968*	0.967*	
Levene Test						0,966**
One Way Anova						0.000***

Keterangan: *Normal >0,05 **Homogen >0,05 ***Signifikan<0,05

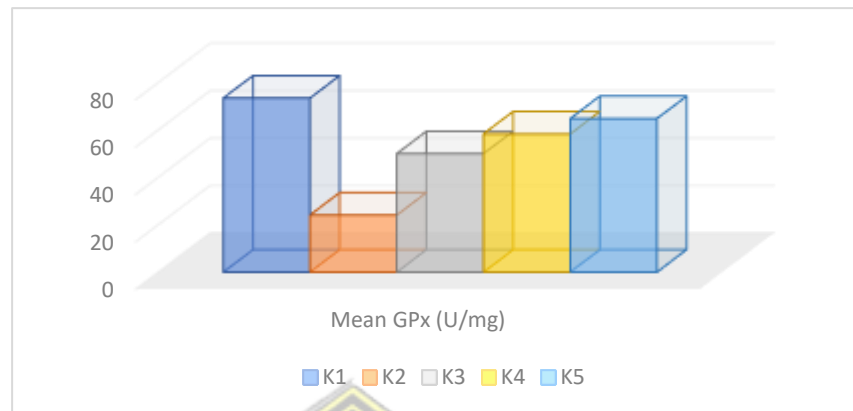
5.1.1 Kadar *glutathione peroksidase* (GPx)

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa rerata kadar GPx tertinggi yaitu pada kelompok kontrol (K1), kemudian berturut-turut diikuti oleh kelompok perlakuan kelima (K5), kelompok perlakuan keempat (K4) dan kelompok perlakuan ketiga (K3). Kelompok perlakuan kedua (K2) mendapatkan rerata kadar GPx yang paling rendah. Seluruh kelompok kadar GPx berdasarkan uji *shapiro wilk* menunjukkan seluruh kelompok data berdistribusi normal ($p>0,05$) dan uji homogenitas dengan menggunakan *levene test* hasilnya homogen ($p=0,925$) maka analisis data menggunakan uji parametrik *One Way Anova*. Hasil uji *One Way Anova* menunjukkan perbedaan bermakna antar kelompok ($p=0,000$). Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda bermakna dilakukan uji *post Hoc* dengan Uji *Tukey* seperti yang disajikan di tabel 5.2.

Tabel 5.2 Perbedaan Kadar GPx Antar 2 Kelompok

Kelompok	<i>p-Value</i>
K1 vs K2	0,000*
K1 vs K3	0,000*
K1 vs K4	0,000*
K1 vs K5	0,000*
K2 vs K3	0,000*
K2 vs K4	0,000*
K2 vs K5	0,000*
K3 vs K4	0,000*
K3 vs K5	0,000*
K4 vs K5	0,000*

* Uji *post Hoc* dengan nilai signifikan $p<0,05$



Gambar 5.1 Grafik Rerata Kadar GPx

Hasil uji *post Hoc* dengan Uji *Tukey* pada tabel 5.2 menunjukkan kadar GPx pada kelompok kontrol (K1) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok perlakuan kedua (K2), kelompok perlakuan ketiga (K3), kelompok perlakuan keempat (K4), dan kelompok perlakuan kelima (K5) ($p=0,000$). Hasil pada kelompok perlakuan kedua (K2) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok perlakuan ketiga (K3), kelompok perlakuan keempat (K4) dan kelompok perlakuan kelima ($p=0,000$). Kelompok perlakuan ketiga (K3) terdapat perbedaan yang signifikan terhadap kelompok perlakuan keempat (K4) dan kelompok perlakuan kelima (K5) ($p=0,000$). Kelompok perlakuan keempat (K4) terdapat perbedaan yang signifikan terhadap kelompok perlakuan kelima (K5) ($p=0,000$). Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dosis 21,6 mg/200g BB/ekor/hari, dosis 43,2 mg/200g BB/ekor/hari dan dosis 86,4 mg/200g BB/ekor/hari berpengaruh secara signifikan terhadap peningkatan kadar GPx pada

pada tikus wistar jantan (*rattus norvegicus*) yang diinduksi herbisida paraquat sehingga pernyataan hipotesis diterima.

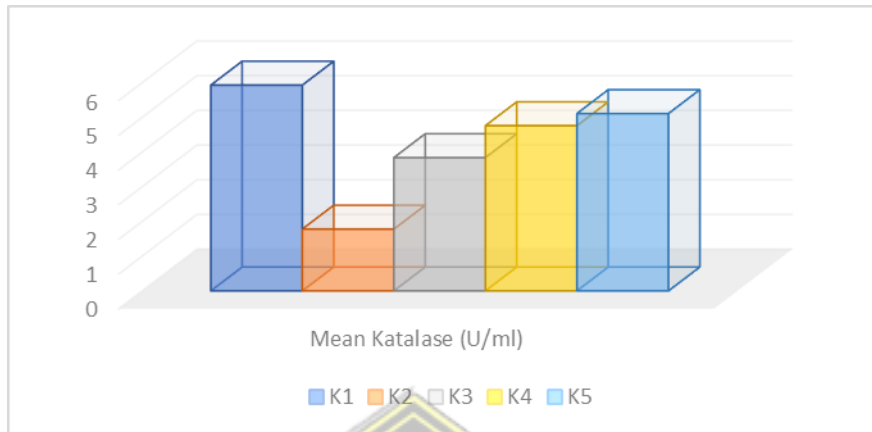
5.1.2 Kadar Katalase

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa rerata kadar katalase tertinggi yaitu pada kelompok kontrol (K1), kemudian berturut-turut diikuti oleh kelompok perlakuan kelima (K5), kelompok perlakuan keempat (K4) dan kelompok perlakuan ketiga (K3). Kelompok perlakuan kedua (K2) mendapatkan rerata kadar katalase yang paling rendah. Seluruh kelompok kadar katalase berdasarkan uji *shapiro wilk* menunjukkan seluruh kelompok data berdistribusi normal ($p>0,05$) dan uji homogenitas dengan menggunakan *levene test* hasilnya tidak homogen ($p=0,045$) maka analisis data menggunakan uji non parametrik *Kruskal Wallis*. Hasil uji *Kruskal Wallis* menunjukkan perbedaan bermakna antar kelompok ($p=0,000$). Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda bermakna dilakukan uji *Mann Whitney* seperti yang disajikan di tabel 5.3.

Tabel 5.3 Perbedaan Kadar Katalase Antar 2 Kelompok

Kelompok	p-Value
K1 vs K2	0,009*
K1 vs K3	0,009*
K 1vs K4	0,009*
K1 vs K5	0,009*
K2 vs K3	0,009*
K2 vs K4	0,009*
K2 vs K5	0,009*
K3 vs K4	0,009*
K3 vs K5	0,009*
K4 vs K5	0,012*

* Uji *Mann Whitney* dengan nilai signifikan $p<0,05$



Gambar 5.2 Grafik Rerata Kadar Katalase

Hasil uji *Mann whitney* pada tabel 5.3 menunjukkan kadar katalase pada kelompok kontrol (K1) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok perlakuan kedua (K2), kelompok perlakuan ketiga (K3), kelompok perlakuan keempat (K4), dan kelompok perlakuan kelima (K5) ($p=0,009$). Hasil pada kelompok perlakuan kedua (K2) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok perlakuan ketiga (K3), kelompok perlakuan keempat (K4) dan kelompok perlakuan kelima ($p=0,009$). Kelompok perlakuan ketiga (K3) terdapat perbedaan yang signifikan terhadap kelompok perlakuan keempat (K4) dan kelompok perlakuan kelima (K5) ($p=0,009$). Kelompok perlakuan keempat (K4) terdapat perbedaan yang signifikan terhadap kelompok perlakuan kelima (K5) ($p=0,012$). Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dosis 21,6 mg/200g BB/ekor/hari, dosis 43,2 mg/200g BB/ekor/hari dan dosis 86,4 mg/200g BB/ekor/hari berpengaruh secara signifikan terhadap peningkatan kadar katalase

pada pada tikus wistar jantan (*rattus norvegicus*) yang diinduksi herbisida paraquat sehingga pernyataan hipotesis diterima.

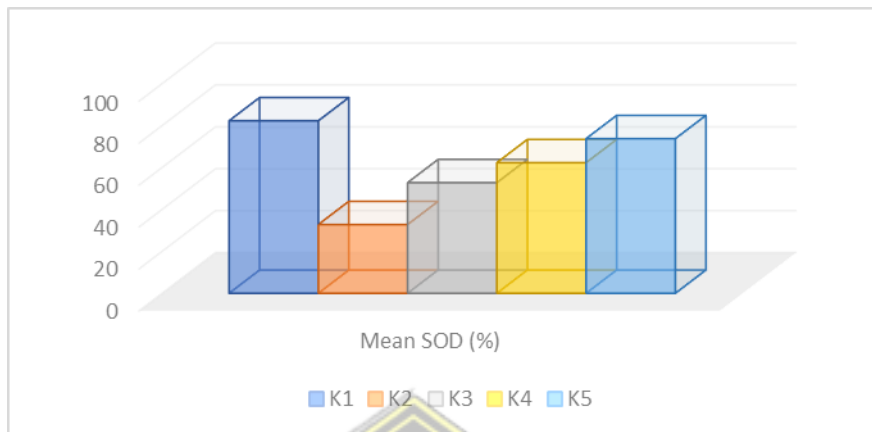
5.1.3 Kadar *Superoxide Dismutase* (SOD)

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa rerata kadar SOD tertinggi yaitu pada kelompok kontrol (K1), kemudian berturut-turut diikuti oleh kelompok perlakuan kelima (K5), kelompok perlakuan keempat (K4) dan kelompok perlakuan ketiga (K3). Kelompok perlakuan kedua (K2) mendapatkan rerata kadar SOD yang paling rendah. Seluruh kelompok kadar SOD berdasarkan uji *shapiro wilk* menunjukkan seluruh kelompok data berdistribusi normal ($p>0,05$) dan uji homogenitas dengan menggunakan *levene test* hasilnya homogen ($p=0,966$) maka analisis data menggunakan uji parametrik *One Way Anova*. Hasil uji *One Way Anova* menunjukkan perbedaan bermakna antar kelompok ($p=0,000$). Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda bermakna dilakukan uji *post Hoc* dengan Uji *Tukey* seperti yang disajikan di tabel 5.3.

Tabel 5.4 Perbedaan Kadar SOD Antar 2 Kelompok

Kelompok	<i>p-Value</i>
K1 vs K2	0,000*
K1 vs K3	0,000*
K 1vs K4	0,000*
K1 vs K5	0,000*
K2 vs K3	0,000*
K2 vs K4	0,000*
K2 vs K5	0,000*
K3 vs K4	0,000*
K3 vs K5	0,000*
K4 vs K5	0,000*

* Uji *post Hoc* dengan nilai signifikan $p<0,05$



Gambar 5.3 Grafik Rerata Kadar SOD

Hasil uji *post Hoc* dengan Uji *Tukey* pada tabel 5.2 menunjukkan kadar SOD pada kelompok kontrol (K1) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok perlakuan kedua (K2), kelompok perlakuan ketiga (K3), kelompok perlakuan keempat (K4), dan kelompok perlakuan kelima (K5) ($p=0,000$). Hasil pada kelompok perlakuan kedua (K2) terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok perlakuan ketiga (K3), kelompok perlakuan keempat (K4) dan kelompok perlakuan kelima ($p=0,000$). Kelompok perlakuan ketiga (K3) terdapat perbedaan yang signifikan terhadap kelompok perlakuan keempat (K4) dan kelompok perlakuan kelima (K5) ($p=0,000$). Kelompok perlakuan keempat (K4) terdapat perbedaan yang signifikan terhadap kelompok perlakuan kelima (K5) ($p=0,000$). Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dosis 21,6 mg/200g BB/ekor/hari, dosis 43,2 mg/200g BB/ekor/hari dan dosis 86,4 mg/200g BB/ekor/hari berpengaruh secara signifikan terhadap peningkatan kadar SOD

pada pada tikus wistar jantan (*rattus norvegicus*) yang diinduksi herbisida paraquat sehingga pernyataan hipotesis diterima.

5.2 Pembahasan

Penelitian ini menggunakan sampel 25 ekor tikus wistar jantan (*rattus norvegicus*) yang terbagi menjadi 5 kelompok masing-masing berjumlah 5 ekor tikus, yaitu kelompok kontrol (K) dengan pemberian pakan standard tanpa diinduksi herbisida paraquat, kelompok perlakuan kedua (K2) dengan pemberian pakan standard yang diinduksi herbisida paraquat, kelompok perlakuan ketiga (K3) diberi suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dosis 21,6 mg/200g BB/ekor/hari yang diinduksi herbisida paraquat, kelompok perlakuan keempat (K4) diberi suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dosis 43,2 mg/200g BB/ekor/hari yang diinduksi herbisida paraquat dan kelompok perlakuan kelima (K5) diberi suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dosis 86,4 mg/200g BB/ekor/hari yang diinduksi herbisida paraquat. Hari ke 16 dilakukan pemeriksaan kadar *glutathione peroksidase*, katalase dan *superoxide dismutase*. Penelitian ini menggunakan tikus jantan galur wistar karena telah diketahui sifat-sifatnya dengan sempurna, mudah dipelihara, hewan yang relatif sehat sangat cocok untuk berbagai macam penelitian.

Herbisida merupakan salah satu bahan kimia yang sering digunakan oleh para petani untuk mematikan tanaman pengganggu. Disisi lain penggunaan herbisida sering tidak sesuai prosedur sehingga dapat menimbulkan efek samping

terhadap manusia. Paparan herbisida paraquat berpengaruh ke organ-organ tubuh manusia. Paraquat yang terakumulasi di paru-paru akan mengalami reaksi redoks yang menyebabkan terjadinya penekanan oksidasi. Stres oksidatif ini akan membentuk *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang akan menyebabkan penyakit akut penyakit paru-paru. Selain itu, pembentukan ROS yang berlebihan menyebabkan kerusakan oksidasi lipid, oksidasi protein dan DNA.³⁵ Kelompok perlakuan yang diinduksi herbisida paraquat dengan dosis 4 mg/200g BB setiap hari adalah K2, K3, K4 dan K5.

Hasil pemeriksaan kadar GPx pada kelompok K2 yang diinduksi herbisida paraquat tanpa pemberian suplemen ekstrak kecambah kacang hijau mengalami penurunan yang signifikan dibanding dengan kelompok kontrol (K1), kelompok yang diberi suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dosis 21,6 mg/200g BB/ekor/hari (K3), 43,2 mg/200g BB/ekor/hari (K4), dan 86,4 mg/200g BB/ekor/hari (K5) seperti pada tabel 5.1. Hal ini dikarenakan herbisida paraquat menyebabkan produksi radikal bebas melebihi kemampuan antioksidan endogen yang menetralsirnya sehingga dalam oksidasi stres terjadi penurunan kadar *glutathion peroksidase* (GPx).³¹ Peroksidase berguna untuk mencegah akumulasi H₂O₂, yang berbahaya jika bersama dengan O₂ karena dapat membentuk radikal OH yang merupakan radikal bebas paling reaktif dan paling berbahaya, tetapi stress oksidatif yang berat dapat berakibat pada habisnya antioksidan yang tersedia. Penelitian lain yang dilakukan oleh Agustin (2021)

menyatakan bahwa adanya penurunan kadar GPx pada tikus wistar yang dipapar asap rokok elektrik selama 30 hari.³⁶

Peningkatan kadar GPx pada kelompok K3 yang diinduksi herbisida paraquat dan pemberian suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dosis 21,6 mg/200g BB/ekor/hari mengalami perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol (K1), kelompok K4 yang diberi suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dosis 43,2 mg/200g BB/ekor/hari dan kelompok K5 yang diberi suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dosis 86,4 mg/200g BB/ekor/hari seperti pada tabel 5.1. Hal ini dikaitkan dengan kandungan total fenolik, vitamin C, tokoferol, aktivitas vitamin E pada suplemen kecambah kacang hijau sebagai senyawa bioaktif yang cukup tinggi. Kandungan tersebut mampu sebagai *free radical scavenging* yang menyumbangkan elektronnya ke molekul radikal bebas sehingga membantu antioksidan endogen dalam meningkatkan kadar GPx. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Novidiyanto¹⁰ bahwa Pemberian Kecambah Kacang Hijau dosis 1 mL/g BB berpengaruh terhadap penurunan kadar malondealdehid (MDA) plasma dan jaringan hati tikus yang diberi pakan tinggi lemak.

Hasil pemeriksaan kadar katalase pada kelompok K2 yang diinduksi herbisida paraquat tanpa pemberian suplemen ekstrak kecambah kacang hijau mengalami penurunan yang signifikan dibanding dengan kelompok kontrol (K1), kelompok yang diberi suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dosis 21,6 mg/200g BB/ekor/hari (K3), 43,2 mg/200g BB/ekor/hari (K4), dan 86,4

mg/200g BB/ekor/hari (K5) seperti pada tabel 5.1. Paraquat dapat menyebabkan induksi toksisitas dalam tubuh disebabkan karena kemampuannya untuk membentuk *Reactive Oxygen species* (ROS). Metabolisme paraquat melalui sistem enzim ini menyebabkan terbentuknya paraquat mono-cation radical (PQ+) di dalam sel sehingga aktivitas enzim katalase menurun.³¹

Peningkatan kadar katalase pada kelompok K3 yang diinduksi herbisida paraquat dan pemberian suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dosis 21,6 mg/200g BB/ekor/hari mengalami perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol (K1), kelompok K4 yang diberi suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dosis 43,2 mg/200g BB/ekor/hari dan kelompok K5 yang diberi suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dosis 86,4 mg/200g BB/ekor/hari seperti pada tabel 5.1. Kecambah kacang hijau terdapat kandungan antioksidan vitamin C dan vitamin E yang mempunyai mekanisme sebagai *free radical scavenger* sehingga menghambat peroksidasi lipid akibat dari radikal bebas. Antioksidan tersebut mendonorkan satu atom ion hidrogennya ke radikal peroksil yang akan mencegah kerusakan rantai asam lemak.³⁷ Penelitian ini sesuai yang dilakukan oleh A'yuni³⁷ bahwa pemberian suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dosis 21,6 mg/ gram BB/ hari, 43,2 mg/ gram BB/ hari, dan 86,4 mg/ gram BB/ hari, dapat meningkatkan morfologi sperma pada tikus wistar jantan yang diinduksi herbisida paraquat.³⁷

Hasil pemeriksaan kadar SOD pada kelompok K2 yang diinduksi herbisida paraquat tanpa pemberian suplemen ekstrak kecambah kacang hijau

mengalami penurunan yang signifikan dibanding dengan kelompok kontrol (K1), kelompok yang diberi suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dosis 21,6 mg/200g BB/ekor/hari (K3), 43,2 mg/200g BB/ekor/hari (K4), dan 86,4 mg/200g BB/ekor/hari (K5) seperti pada tabel 5.1. Hal ini disebabkan dari mekanisme paraquat toksisitas adalah melalui siklus redoks (oksidasi- reduksi) yang menghasilkan stres oksidatif. Melalui pembawa transpor aktif, paraquat molekul melintasi sel dan memasuki matriks mitokondria. Dalam matriks mitokondria, paraquat mengalami siklus redoks, paraquat- kation direduksi oleh NADPH menjadi radikal bentuk tereduksi. Selanjutnya, radikal tereduksi bereaksi dengan molekul oksigen untuk membentuk anion superoksida. Anion superoksida menghasilkan hidrogen peroksida yang selanjutnya diubah menjadi hidroksil radikal karena interaksinya dengan Fe^{2+} .

Peningkatan kadar SOD pada kelompok K3 yang diinduksi herbisida paraquat dan pemberian suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dosis 21,6 mg/200g BB/ekor/hari mengalami perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol (K1), kelompok K4 yang diberi suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dosis 43,2 mg/200g BB/ekor/hari dan kelompok K5 yang diberi suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dosis 86,4 mg/200g BB/ekor/hari seperti pada tabel 5.1. Kecambah kacang hijau kaya akan kandungan vitamin E (α -tokoferol), vitamin C, fenol dan beberapa mineral (selenium, mangan, tembaga, seng dan besi) yang merupakan senyawa antioksidan alami yang mengurangi efek buruk radikal bebas, dengan menghambat

peroksidasi lipid melalui aktivasi peroksidase melawan hemoglobin, yang merupakan antioksidan endogen (enzimatik). Vitamin C bisa langsung bereaksi dengan superoksida anion, radikal hidroksil, oksigen singlet dan lipid peroksida. Sebagai zat pereduksi, vitamin C akan menyumbangkan satu elektron untuk membentuk semi dehydro-ascorbate yang tidak reaktif kemudian mengalami reaksi disproporsionasi untuk membentuk dehidro- askorbat yang tidak stabil. Askorbat bisa langsung menangkap radikal bebas oksigen, baik dengan atau tanpa katalis enzim. Secara tidak langsung askorbat dapat mengurangi aktivitas radikal bebas dengan mengubah tokoferol berkurang.³⁵ Penelitian ini sesuai dengan yang dilakukan Yulianti menunjukkan bahwa pemberian ekstrak buah Makasar dosis 20 mg/kgBB secara signifikan meningkatkan tingkat SOD pada tikus jantan Swiss Webster yang diinduksi dengan paraquat.³⁵

Herbisida paraquat dapat menyebabkan stress oksidatif yang dapat merusak berbagai macam organ diantaranya adalah jantung, ginjal, paru-paru, otot, limfa, kelenjar suprarenal, susunan saraf pusat dan juga dapat merusak hati. Hati merupakan organ target primer dari toksisitas paraquat baik akut maupun kronik khususnya yang masuk ke dalam tubuh secara ingesti. Hati merupakan organ yang mempunyai kemampuan untuk memetabolisme dan mengekresi beberapa zat-zat kimia.³⁸ Proses terjadinya kerusakan pada organ hati sebagai organ yang mendetoksifikasi zat kimia seperti herbisida paraquat, dapat terjadi akibat toksisitas langsung atau melalui konversi zat kimia yang terkandung dalam herbisida paraquat menjadi toksin aktif oleh hati sehingga dapat menyebabkan

timbulnya beberapa kelainan pada hati seperti pembengkakan hepatosit, kongesti sinusoid hati, fibrosis, sirosis, dan nekrosis. Dari uraian diatas maka keterbatasan penelitian ini diharapkan dapat melakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh suplemen ekstrak kecambah kacang hijau terhadap pembengkakan hepatosit dan kadar MDA jaringan hepar pada tikus jantan galur wistar yang diinduksi herbisida paraquat.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa :

- 6.1.1. Pemberian suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dengan dosis dosis 21,6 mg/200g BB/ekor/hari, dosis 43,2 mg/200g BB/ekor/hari, dan 86,4 mg/200g dapat meningkatkan kadar *glutathione peroksidase* pada tikus wistar jantan (*rattus norvegicus*) yang diinduksi herbisida paraquat.
- 6.1.2. Pemberian suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dengan dosis dosis 21,6 mg/200g BB/ekor/hari, dosis 43,2 mg/200g BB/ekor/hari, dan 86,4 mg/200g dapat meningkatkan kadar katalase pada tikus wistar jantan (*rattus norvegicus*) yang diinduksi herbisida paraquat.
- 6.1.3. Pemberian suplemen ekstrak kecambah kacang hijau dengan dengan dosis dosis 21,6 mg/200g BB/ekor/hari, dosis 43,2 mg/200g BB/ekor/hari, dan 86,4 mg/200g dapat meningkatkan kadar *superoxide dismutase* pada tikus wistar jantan (*rattus norvegicus*) yang diinduksi herbisida paraquat.
- 6.1.4. Dosis 86,4 mg/ml/hari menjadi dosis terbaik dalam meningkatkan kadar *glutathione peroksidase*, katalase, dan *superoxide dismutase* pada tikus wistar jantan (*rattus norvegicus*) yang diinduksi herbisida paraquat.

6.2 Saran

- 6.2.1 Perlu dilakukan pemeriksaan MDA jaringan hati pasca pemberian suplemen ekstrak kecambah kacang hijau pada tikus jantan galur *wistar* yang diberi herbisida paraquat.
- 6.2.2 Perlu dilakukan pengaruh suplemen ekstrak kecambah kacang hijau terhadap pembengkakan hepatosit pada tikus jantan galur *wistar* yang diberi herbisida paraquat.



DAFTAR PUSTAKA

1. Guerra-Araiza C, Álvarez-Mejía AL, Sánchez-Torres S, et al. Effect of natural exogenous antioxidants on aging and on neurodegenerative diseases. *Free Radic Res.* 2013;47(6-7):451-462. doi:10.3109/10715762.2013.795649
2. Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, Trost A, Richter K. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules.* 2015;5(2):545-589. doi:10.3390/biom5020545
3. Mahardhika DS. PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KECAMBAH KACANG HIJAU (*Phaseolus Radiatus*) TERHADAP KADAR HDL DALAM DARAH DAN INDIKASI SEL LEMAK PADA HISTOPATOLOGI HEPAR PADA KELINCI NEW ZEALAND WHITE (*Oryctolagus Caniculus*) PASCA INDUKSI PROGESTERON. 2018.
4. Puspitarani D. Gambaran Perilaku Penggunaan Pestisida dan Gejala Keracunan yang ditimbulkan pada Petani Penyemprot Sayur di Desa Sidomukti Kecamatan Bandungan Kabupaten Semarang. *Resma.* 2016;3(2).
5. Suparti S, Anies, Setiani O. Beberapa Faktor Risiko yang Berpengaruh terhadap Kejadian Keracunan Pestisida pada Petani. *J Pena Med.* 2016;6(2):125-138.
6. Putri TE, Andreswari D, Efendi R. Implementasi Metode Cbr (Case Based Reasoning) Dalam Pemilihan Pestisida Terhadap Hama Padi Sawah Menggunakan Algoritma K- Nearest Neighbor (Knn) (Studi Kasus Kabupaten Seluma). *J Rekursif.* 2016;4(1):51. <http://ejournal-ittihad.alittihadiahsumut.or.id/index.php/ittihad/article/view/21>.
7. Sri Haryanti RB. Morfoanatomi, Berat Basah Kotiledon dan Ketebalan Daun Kecambah Kacang Hijau (*Phaseolus vulgaris* L.) pada Naungan yang Berbeda. *Anat Fisiol.* 2015;XXIII(1):47-56. doi:10.14710/baf.v23i1.8735
8. Maruliyanda C, Hayati A, Pidada I. R. Pengaruh Ekstrak Etanolik Kecambah Kacang Hijau (*Phaseolus radiatus*) Terhadap Jumlah dan Morfologi Spermatozoa Mencit yang Terpapar 2-Methoxyethanol. *J Ilm.* 2004;1(1):1-10.
9. Hadi NS, Farmawati A, Ghozali A. Pencegahan hipertensi dan penebalan dinding aorta dengan pemberian kecambah kacang hijau (*Phaseolus radiatus* (L)) pada tikus putih Sprague Dawley. *J Gizi Klin Indones.* 2016;12(3):116. doi:10.22146/ijcn.22454

10. Novidiyanto N, Farmawati A, Lestari LA. Pengaruh pemberian kecambah kacang hijau (*Phaseolus radiatus* (L.)) terhadap kadar malondealdehyd (MDA) plasma dan jaringan hati tikus Sprague Dawley yang diberi pakan lemak tinggi. *J Gizi Klin Indones*. 2016;13(2):82. doi:10.22146/ijcn.22923
11. Lascano R, Munoz N, Robert G, et al. Paraquat: An Oxidative Stress Inducer. *Herbic - Prop Synth Control Weeds*. 2012;(January). doi:10.5772/32590
12. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, et al. Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *J Am Coll Nutr*. 2003;22(1):18-35. doi:10.1080/07315724.2003.10719272
13. . N, Asrullah M, Arsanti Lestari L, Helmyati S, Farmawati A. Effect Supplementation of Mung Bean Sprouts (*Phaseolus radiatus* L.) and Vitamin E in Rats Fed High Fat Diet. *KnE Life Sci*. 2019;4(11):36. doi:10.18502/cls.v4i11.3850
14. Insani AY, Caesarina A, Marchianti N, Wahyudi SS. Perbedaan Efek Paparan Pestisida Kimia dan Organik terhadap Kadar Glutation (GSH) Plasma pada Petani Padi. 2018;17(2):63-67.
15. Tajuddin A. No Title. *DPPH, Pengaruh Perebusan Kecambah Kacang Hijau (Phaseolus radiates L) Terhadap Akt Antioksidan dengan Metod*. 2017;XIII(2):117-121.
16. Xue Z, Wang C, Zhai L, Yu W, Chang H. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Mung Bean (*Vigna radiata* L .), Soybean (*Glycine max* L .) and Black Bean (*Phaseolus vulgaris* L .) during the Germination Process. 2016;2016(31271979):68-78. doi:10.17221/434/2015-CJFS
17. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med*. 2018;54(4):287-293. doi:10.1016/j.ajme.2017.09.001
18. Zulaikhah ST. The Role of Antioxidant to Prevent Free Radicals in The Body. *Sains Med*. 2017;8(1):39. doi:10.26532/sainsmed.v8i1.1012
19. Neki NS. Oxidative stress and aging. *Bangladesh J Med Sci*. 2015;14(3):221-227. doi:10.3329/bjms.v14i3.23468
20. Luo S, Jiang X, Jia L, et al. In vivo and in vitro antioxidant activities of methanol extracts from olive leaves on caenorhabditis elegans. *Molecules*. 2019;24(4). doi:10.3390/molecules24040704
21. Kuo YH, Chiang HL, Wu PY, et al. Protection against ultraviolet a-induced

- skin apoptosis and carcinogenesis through the oxidative stress reduction effects of n-(4-bromophenethyl) caffeamide, a propolis derivative. *Antioxidants*. 2020;9(4). doi:10.3390/antiox9040335
22. Čermak AMM, Pavičić I, Želježić D. Redox imbalance caused by pesticides: A review of OPENTOX-related research. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2018;69(2):126-134. doi:10.2478/aiht-2018-69-3105
 23. Teame G, Ephrem S, Lemma D, Getachew B. Adaptation Study of Mung Bean (*Vigna Radiate*) Varieties in Raya Valley, Northern Ethiopia. *Curr Res Agric Sci*. 2017;4(4):91-95. doi:10.18488/journal.68.2017.44.91.95
 24. Yi-Shen Z, Shuai S, Fitzgerald R. Mung bean proteins and peptides: Nutritional, functional and bioactive properties. *Food Nutr Res*. 2018;62:1-11. doi:10.29219/fnr.v62.1290
 25. Dahiya PK, Linnemann AR, Van Boekel MAJS, Khetarpaul N, Grewal RB, Nout MJR. Mung Bean: Technological and Nutritional Potential. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2015;55(5):670-688. doi:10.1080/10408398.2012.671202
 26. H. K, M.H. K, M. K. *Acacia mangium* Willd.: Ecology, silviculture and productivity. *Acacia mangium Willd Ecol Silv Product*. 2011. doi:10.17528/cifor/003392
 27. Widjajaseputra AI, Widyastuti TEW, Trisnawati CY. Potency of mung bean with different soaking times as protein source for. *Food Res*. 2019;3(October):501-505.
 28. A'yuni A. PENGARUH PEMBERIAN SUPLEMEN EKSTRAK KECAMBAH KACANG HIJAU (*Vigna radiata* L.) TERHADAP KADAR FOLICEL STIMULATING HORMONE (FSH), JUMLAH SEL SERTOLI, DAN KUALITAS SPERMA. 2019;(14):63-65. doi:10.15900/j.cnki.zylf1995.2018.02.001
 29. Jabłońska-Trypuć A. Pesticides as Inducers of Oxidative Stress. *React Oxyg Species*. 2017;3(8):96-110. doi:10.20455/ros.2017.823
 30. Prepared by Meriel Watts PhD Contents. *Alternatives*. 2011.
 31. Gawarammana IB, Buckley NA. Medical management of paraquat ingestion. *Br J Clin Pharmacol*. 2011;72(5):745-757. doi:10.1111/j.1365-2125.2011.04026.x
 32. Leverage X. Oxidative, stress and antioxidants? *Cah Nutr Diet*. 2009;44(5):219-224. doi:10.1016/j.cnd.2009.09.001

33. Montenegro L. Nanocarriers for skin delivery of cosmetic antioxidants. *J Pharm Pharmacogn Res.* 2014;2(4):73-92.
34. Upa FT, Saroyo S, Katili DY. Komposisi Pakan Tikus Ekor Putih (*Maxomys hellwandii*) di Kandang. *J Ilm Sains.* 2017;17(1):7. doi:10.35799/jis.17.1.2017.14900
35. Yuliati MEP, Aman IGM, Dewi NNA. Macassar fruit extract (*Brucea javanica* (L.) Merr) increased the level of superoxide dismutase (SOD) but had no effect on the level of malondialdehyde (MDA) in paraquat-treated male Swiss Webster mice. *IJAAM (Indonesian J Anti-Aging Med.)* 2019;3(2):29. doi:10.36675/ijaam.v3i2.41
36. Agustin MP, Lisdiana. Pengaruh Paparan Rokok Elektrik terhadap kadar GPx dan Catalase pada darah Tikus. *Life Sci J Biol.* 2021;10(1):14.
37. A'yuni QA, Taufiqurrachman, Chodidjah. Suplemen Kecambah Kacang Hijau Terhadap Morfologi Sperma Tikus Wistar Yang Diinduksi Paraquat. 2020;1:25-29.
38. Muhartono M, Fratiwi Y, Windarti I, Susianti S. Pengaruh Herbisida Paraquat Diklorida Oral Terhadap Hati Tikus Putih. *J Ilmu Kedokt.* 2017;9(1):41. doi:10.26891/jik.v9i1.2015.41-46
39. Mae Sri Hartati Wahyuningsih. Penghitungan Dosis Herbal. 2018:16-49.



LAMPIRAN 1

Tabel Konversi Dosis Hewan Dengan Manusia

	20 g Mencit	200 g Tikus	400 g Marmot	1,5 kg Kelinci	1 kg Kucing	4kg Kera	12 kg Anjing	70 kg Manusia
20 g mencit	1,00	7,00	12,29	27,80	23,70	64,10	124,20	287,90
200 g Tikus	0,14	1,00	1,74	3,30	4,20	9,20	17,80	56,00
400 g Marmot	0,08	0,57	1,00	2,25	2,0	5,20	10,20	31,50
1,5 kg Kelinci	0,04	0,25	1,44	1,00	1,08	2,40	4,50	14,20
1 kg Kucing	0,03	0,23	0,41	0,92	1,00	2,20	4,10	13,00
4 kg Kera	0,016	0,11	0,19	0,42	0,5	1,00	1,90	6,10
12 kg Anjing	0,008	0,06	0,10	0,22	0,2	0,52	1,00	3,10
70 kg Manusia	0,0026	0,018	0,31	0,07	0,13	0,16	0,32	1,00

(Sumber : Wahyuningsih³⁹)

Tabel Maksimum Larutan Sediaan Uji Untuk Hewan

Jenis Hewan Uji	Volume Maksimal (ml) sesuai Jalur Pemberian				
	i.v.	i.m.	i.p.	s.c.	p.o.
Mencit (20-30 gr)	0,5	0,05	1,0	0,5-10	1,0
Tikus (100 gr)	1,0	0,1	2,5	2,5	5,0
Hamster (50 gr)	-	0,1	1-2	2,5	2,5
Marmot (250 gr)	-	0,25	2-5	5,0	10,0
Merpati (300 gr)	2,0	0,5	2,0	2,0	10,0
Kelinci (2,5 kg)	5-10	0,5	10-20	5-10	20,0
Kucing (3 kg)	5-10	1,0	10-20	5-10	50,0
Anjing (5 kg)	10-20	5,0	20-50	10,0	100,0

(Sumber : Wahyuningsih³⁹)

LAMPIRAN 2

PENENTUAN DOSIS

1. Pemberian Suplemen Ekstrak Kecambah Kacang Hijau

Menurut (Mulyani, 2016) pemberian ekstrak kecambah kacang hijau pada mencit dengan dosis 108 mg/Kg BB, 216 mg/Kg BB, 432 mg/Kg BB. Dosis manusia 10-12 g/hari atau setara dengan 2,5 sendok the, sehingga untuk tikus $12 \times 0,018 = 0,216$ g/200 g BB atau 216 mg/Kg BB. Dalam penelitian ini mengambil dosis 108 mg/Kg BB, 216 mg/Kg BB, 432 mg/Kg BB.

$$\text{Dosis I} \quad : \quad \frac{100}{1000} \times 200 = 21,6 \text{ mg/gram BB}$$

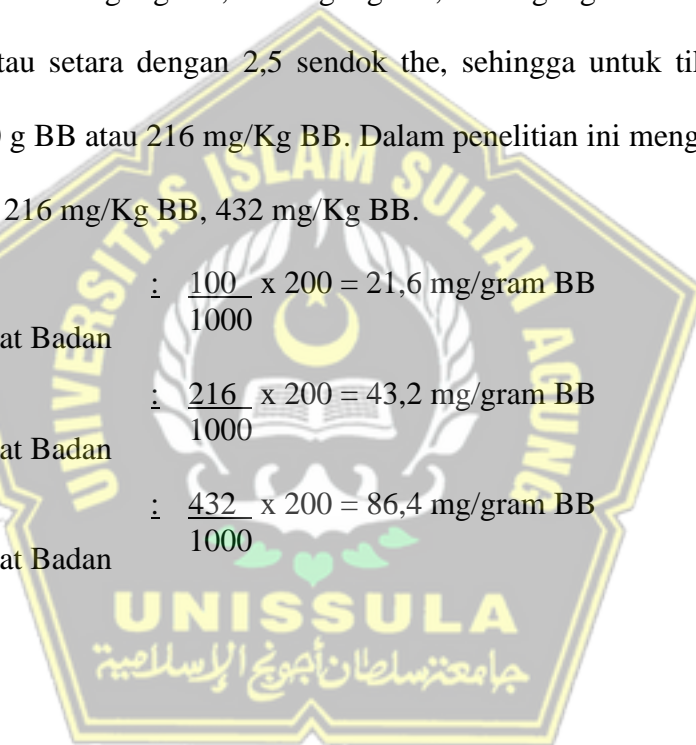
Dosis x Berat Badan

$$\text{Dosis II} \quad : \quad \frac{216}{1000} \times 200 = 43,2 \text{ mg/gram BB}$$

Dosis x Berat Badan

$$\text{Dosis III} \quad : \quad \frac{432}{1000} \times 200 = 86,4 \text{ mg/gram BB}$$

Dosis x Berat Badan



2. Pemberian Dosis Herbisida Paraquat

Menurut (Anggraini, 2007) secara peroral dosis paraquat diberikan pada mencit jantan yaitu 20 mg/Kg diberikan 2 kali dalam seminggu selama 21 hari, sehingga pada penelitian ini pemberian dosis herbisida paraquat 20 mg/Kg setara dengan 0,02 mg/mL gramoxone 276 SL 6 kali hari ke 10, 11,12, 13, 14, 15.

Paraquat Gramoxone mengandung 276 SL setara dengan 200 mg/mL

$$\text{Dosis x BB} : \frac{20}{1000} \times 200 = 4 \text{ mg/gram}$$

$$\frac{\text{Berat dosis per berat badan tikus}}{200 \text{ mg/mL}} : \frac{4}{200} \times 200 = 0,02 \text{ mg/mL}$$

Sehingga pada tikus galur wistar jantan menggunakan dosis 4 mg/g setara dengan 0,02 mg/mL paraquat gramoxone 276 SL dengan dilarutkan 2 mL aquades.

LAMPIRAN 3

BERAT BADAN TIKUS JANTAN GALUR WISTAR

Kelompok			Sebelum Perlakuan (gram)	Sesudah Perlakuan (gram)
I	(1)	:	156	177
	(2)	:	158	178
	(3)	:	161	179
	(4)	:	157	176
	(5)	:	153	173
II	(1)	:	154	162
	(2)	:	158	164
	(3)	:	155	163
	(4)	:	154	165
	(5)	:	157	168
III	(1)	:	158	172
	(2)	:	154	169
	(3)	:	161	176
	(4)	:	158	170
	(5)	:	155	168
IV	(1)	:	153	169
	(2)	:	158	176
	(3)	:	152	170
	(4)	:	157	172
	(5)	:	153	171
V	(1)	:	158	177
	(2)	:	160	180
	(3)	:	157	177
	(4)	:	153	173
	(5)	:	156	176

LAMPIRAN 4 DOKUMENTASI KEGIATAN PENELITIAN



Pembagian tikus *wistar* jantan secara random menjadi 5 Kelompok



Satu Kelompok berjumlah 5 tikus



Ekstrak Kecambah Kacang Hijau



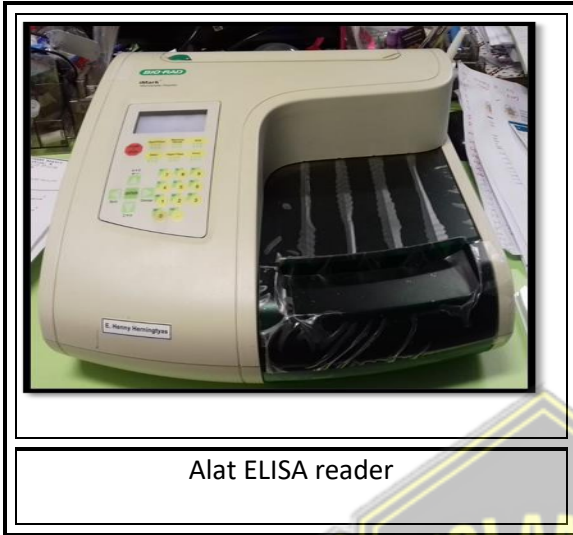
Pengecekan alat dan bahan



PSPG UGM



Pemberian larutan dosis herbisida paraquat melalui oral.



LAMPIRAN 5 OLAH DATA SPSS

1. Rerata (Mean) dan Standar Deviasi

- GPx

		Statistics				
		Kelompok 1	Kelompok 2	Kelompok 3	Kelompok 4	Kelompok 5
N	Valid	5	5	5	5	5
	Missing	1	1	1	1	1
Mean		73.4660	24.0760	50.0080	58.3400	64.8240
Std. Deviation		1.48477	1.48477	1.84170	1.59984	2.11330

- Katalase

		Statistics				
		Kelompok 1	Kelompok 2	Kelompok 3	Kelompok 4	Kelompok 5
N	Valid	5	5	5	5	5
	Missing	1	1	1	1	1
Mean		5.9260	1.7980	3.8420	4.7580	5.1080
Std. Deviation		.20574	.04658	.08585	.10159	.17341

- SOD

		Statistics				
		Kelompok 1	Kelompok 2	Kelompok 3	Kelompok 4	Kelompok 5
N	Valid	5	5	5	5	5
	Missing	1	1	1	1	1
Mean		82.2980	32.7880	52.7880	62.2960	73.7700
Std. Deviation		3.15460	3.66380	3.15460	2.58833	2.59307

2. Uji Normalitas (*Shapiro Wilk*)

- GPx

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kelompok 1	.142	5	.200*	.978	5	.926
Kelompok 2	.142	5	.200*	.978	5	.926
Kelompok 3	.174	5	.200*	.974	5	.899
Kelompok 4	.179	5	.200*	.953	5	.756
Kelompok 5	.168	5	.200*	.964	5	.833

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

a. Lilliefors Significance Correction

- Katalase

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kelompok 1	.173	5	.200*	.973	5	.896
Kelompok 2	.154	5	.200*	.971	5	.884
Kelompok 3	.156	5	.200*	.984	5	.957
Kelompok 4	.214	5	.200*	.975	5	.904
Kelompok 5	.187	5	.200*	.958	5	.795

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

a. Lilliefors Significance Correction

- SOD

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kelompok 1	.141	5	.200*	.979	5	.928
Kelompok 2	.127	5	.200*	.999	5	1.000
Kelompok 3	.141	5	.200*	.979	5	.928
Kelompok 4	.136	5	.200*	.987	5	.968
Kelompok 5	.136	5	.200*	.987	5	.967

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

a. Lilliefors Significance Correction

3. Uji Homogenitas (*Levene test*)

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
GPx (U/mg)	.219	4	20	.925
Katalase (U/ml)	2.957	4	20	.045
SOD (%)	.139	4	20	.966

Jadi dapat disimpulkan bahwa

- Kadar GPx menunjukkan normal dan homogen sehingga dilakukan uji One Way Anova kemudian dilanjut dengan uji post hoc dengan uji Tukey
- Kadar Katalase menunjukkan normal dan tidak homogen sehingga dilakukan uji Kruskal Wallis kemudian dilanjut dengan uji Man Whitney
- Kadar SOD menunjukkan normal dan homogen sehingga dilakukan uji One Way Anova kemudian dilanjut dengan uji post hoc dengan uji Tukey

4. Uji One Way Onova

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
GPx (U/mg)	Between Groups	7130.998	4	1782.750	601.205	.000
	Within Groups	59.306	20	2.965		
	Total	7190.304	24			
SOD (%)	Between Groups	7407.432	4	1851.858	198.060	.000
	Within Groups	187.000	20	9.350		
	Total	7594.432	24			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: GPx (U/mg)

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K1	K2	49.39000*	1.08909	.000	46.1310	52.6490
	K3	23.45800*	1.08909	.000	20.1990	26.7170
	K4	15.12600*	1.08909	.000	11.8670	18.3850
	K5	8.64200*	1.08909	.000	5.3830	11.9010
K2	K1	-49.39000*	1.08909	.000	-52.6490	-46.1310
	K3	-25.93200*	1.08909	.000	-29.1910	-22.6730
	K4	-34.26400*	1.08909	.000	-37.5230	-31.0050
	K5	-40.74800*	1.08909	.000	-44.0070	-37.4890
K3	K1	-23.45800*	1.08909	.000	-26.7170	-20.1990
	K2	25.93200*	1.08909	.000	22.6730	29.1910
	K4	-8.33200*	1.08909	.000	-11.5910	-5.0730
	K5	-14.81600*	1.08909	.000	-18.0750	-11.5570
K4	K1	-15.12600*	1.08909	.000	-18.3850	-11.8670
	K2	34.26400*	1.08909	.000	31.0050	37.5230
	K3	8.33200*	1.08909	.000	5.0730	11.5910
	K5	-6.48400*	1.08909	.000	-9.7430	-3.2250
K5	K1	-8.64200*	1.08909	.000	-11.9010	-5.3830
	K2	40.74800*	1.08909	.000	37.4890	44.0070
	K3	14.81600*	1.08909	.000	11.5570	18.0750

K4	6.48400*	1.08909	.000	3.2250	9.7430
----	----------	---------	------	--------	--------

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

Multiple Comparisons

Dependent Variable: SOD (%)

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K1	K2	49.51000*	1.93391	.000	43.7230	55.2970
	K3	29.51000*	1.93391	.000	23.7230	35.2970
	K4	20.00200*	1.93391	.000	14.2150	25.7890
	K5	8.52800*	1.93391	.002	2.7410	14.3150
K2	K1	-49.51000*	1.93391	.000	-55.2970	-43.7230
	K3	-20.00000*	1.93391	.000	-25.7870	-14.2130
	K4	-29.50800*	1.93391	.000	-35.2950	-23.7210
	K5	-40.98200*	1.93391	.000	-46.7690	-35.1950
K3	K1	-29.51000*	1.93391	.000	-35.2970	-23.7230
	K2	20.00000*	1.93391	.000	14.2130	25.7870
	K4	-9.50800*	1.93391	.001	-15.2950	-3.7210
K4	K5	-20.98200*	1.93391	.000	-26.7690	-15.1950
	K1	-20.00200*	1.93391	.000	-25.7890	-14.2150
	K2	29.50800*	1.93391	.000	23.7210	35.2950
	K3	9.50800*	1.93391	.001	3.7210	15.2950
K5	K4	-11.47400*	1.93391	.000	-17.2610	-5.6870
	K1	-8.52800*	1.93391	.002	-14.3150	-2.7410
	K2	40.98200*	1.93391	.000	35.1950	46.7690
	K3	20.98200*	1.93391	.000	15.1950	26.7690
	K4	11.47400*	1.93391	.000	5.6870	17.2610

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

5. Uji Kruskal Wallis

Test Statistics ^{a,b}	
	Katalase (U/ml)
Chi-Square	22.995
df	4
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok

6. Uji Mann Whitney

- K1 dengan K2

Test Statistics ^a	
	Katalase (U/ml)
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

- K1 dengan K3

Test Statistics ^a	
	Katalase (U/ml)
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

- K1 dengan K4

Test Statistics ^a	
	Katalase (U/ml)
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

- K1 dengan K5

Test Statistics ^a	
	Katalase (U/ml)
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

- **K2 dengan K3**

Test Statistics ^a	
	Katalase (U/ml)
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

- a. Grouping Variable: Kelompok
b. Not corrected for ties.

- **K3 dengan K4**

Test Statistics ^a	
	Katalase (U/ml)
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

- a. Grouping Variable: Kelompok
b. Not corrected for ties.

- **K2 dengan K4**

Test Statistics ^a	
	Katalase (U/ml)
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

- a. Grouping Variable: Kelompok
b. Not corrected for ties.

- **K3 dengan K5**

Test Statistics ^a	
	Katalase (U/ml)
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

- a. Grouping Variable: Kelompok
b. Not corrected for ties.

- **K2 dengan K5**

Test Statistics ^a	
	Katalase (U/ml)
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

- a. Grouping Variable: Kelompok
b. Not corrected for ties.

- **K4 dengan K5**

Test Statistics ^a	
	Katalase (U/ml)
Mann-Whitney U	.500
Wilcoxon W	15.500
Z	-2.514
Asymp. Sig. (2-tailed)	.012
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

- a. Grouping Variable: Kelompok
b. Not corrected for ties.

LAMPIRAN 6
ETHICAL CLEARANCE

KOMISI BIOETIKA PENELITIAN KEDOKTERAN/KESEHATAN
FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG SEMARANG

Sekretariat : Gedung C Lantai I Fakultas Kedokteran Unissula
Jl. Raya Kaligawe Km 4 Semarang, Telp. 024-6583584, Fax 024-6594366

Ethical Clearance

No. 199/VII/2021/Komisi Bioetik

Komisi Bioetika Penelitian Kedokteran/Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang, setelah melakukan pengkajian atas usulan penelitian yang berjudul :

**PENGARUH PEMBERIAN SUPLEMEN EKSTRAK
KECAMBAH KACANG HIJAU (*Phaseolus radiatus L.*)
TERHADAP KADAR GLUTATHIONE PEROKSIDASE,
KATALASE DAN SUPEROXIDE DISMUTASE**

Peneliti Utama : Asti Salekhah Alfatih
Pembimbing : Prof.Dr.dr. Taufiqurrachman N, M.Kes, Sp.And (K)
Dr.Ir.Titiek Sumarawati M.Kes
Tempat Penelitian : Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada

dengan ini menyatakan bahwa usulan penelitian diatas telah memenuhi prasyarat etik penelitian. Oleh karena itu Komisi Bioetika merekomendasikan agar penelitian ini dapat dilaksanakan dengan mempertimbangkan prinsip-prinsip yang dinyatakan dalam Deklarasi Helsinki dan panduan yang tertuang dalam Pedoman Nasional Etik Penelitian Kesehatan (PNEPK) Departemen Kesehatan RI tahun 2004.

Semarang, 30 Juli 2021

Komisi Bioetika Penelitian Kedokteran/Kesehatan

Fakultas Kedokteran Unissula

Ketua,



(dr. Sofwan Dahlan, Sp.F(K))

LAMPIRAN 7
DATA KADAR GPx, Katalase, SOD

	GPx		SOD		Katalase	
	Abs	U / mg	Abs	%	Abs	U / ml
0.095	73.31	0.045	81.97	0.339	5.65	
0.098	75.63	0.047	78.69	0.350	5.83	
0.093	71.77	0.042	86.89	0.354	5.90	
0.096	74.08	0.044	83.61	0.370	6.17	
0.094	72.54	0.046	80.33	0.365	6.08	
0.032	24.69	0.072	37.70	0.111	1.85	
0.030	23.15	0.078	27.87	0.107	1.78	
0.029	22.38	0.074	34.43	0.110	1.83	
0.034	26.24	0.075	32.79	0.104	1.73	
0.031	23.92	0.076	31.15	0.108	1.80	
0.065	50.16	0.060	57.38	0.234	3.90	
0.063	48.62	0.065	49.18	0.230	3.83	
0.068	52.48	0.062	54.10	0.228	3.80	
0.062	47.85	0.064	50.82	0.224	3.73	
0.066	50.93	0.063	52.46	0.237	3.95	
0.078	60.19	0.056	63.93	0.277	4.62	
0.074	57.11	0.059	59.02	0.283	4.72	
0.076	58.65	0.055	65.57	0.287	4.78	
0.073	56.33	0.057	62.30	0.294	4.90	
0.077	59.42	0.058	60.66	0.286	4.77	
0.087	67.14	0.051	72.13	0.308	5.13	
0.080	61.74	0.050	73.77	0.298	4.97	
0.084	64.82	0.049	75.41	0.294	4.90	
0.086	66.37	0.052	70.49	0.319	5.32	
0.083	64.05	0.048	77.05	0.313	5.22	
		1	0.158			
		2	0.034			
		3	0.097			