

**PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN E TOPIKAL DAN
SISTEMIK TERHADAP KADAR *MALONDIALDEHYDE* LENSA
TIKUS PERCOBAAN YANG DIBERI PAPARAN ASAP ROKOK**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar

Dokter Spesialis Mata

Oleh :

**RINCE LIYANTI
No.BP : 1450301202**



**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS MATA
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2019**

**PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN E TOPIKAL DAN
SISTEMIK TERHADAP KADAR *MALONDIALDEHYDE* LENSA
TIKUS PERCOBAAN YANG DIBERI PAPARAN ASAP ROKOK**



Tesis ini telah disetujui oleh Pembimbing

Nama	Jabatan	Tanda tangan
DR. Dr. Hendriati, SpM (K)	Pembimbing I	
dr. Andrini Ariesti, SpM (K)	Pembimbing II	

TESIS

Judul Penelitian : Pengaruh Pemberian Vitamin E Topikal dan Sistemik Terhadap Kadar *Malondialdehyde* Lensa Tikus Percobaan yang Diberi Paparan Asap Rokok

Cabang Ilmu : Ilmu Kesehatan Mata

Data Peserta PPDS

Nama Lengkap : dr. Rince Liyanti

Nomor Buku Pokok : 1450301202

Tanggal Lahir : 07 Maret 1982

Tahun Masuk PPDS FK : 01 Juli 2014

Unand

Nama PA : dr. Andrini Ariesti, SpM(K)

Jenis Penelitian : Studi eksperimental (*Posttest-Only Control Design*)



Padang, Oktober 2019

Diketahui oleh :

Koordinator Program Studi PPDS IK Mata

Peserta PPDS

DR.dr. Hendriati, SpM (K)
NIP. 197007012000122001

dr. Rince Liyanti
NBP. 1450301202

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb

Bismillahirrahmanirrohiim

Sujud syukur dipersembahkan kepadaMu ya Allah, Tuhan Yang Maha Agung dan Maha Kuasa, atas takdirMu peneliti bisa menjadi pribadi yang berpikir, berilmu, beriman dan bersabar. Atas rahmat dan karuniaMu jua peneliti dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan tugas akhir yang berjudul :



PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN E TOPIKAL DAN SISTEMIK TERHADAP KADAR *MALONDIALDEHYDE* LENSA TIKUS PERCOBAAN YANG DIBERI PAPARAN ASAP ROKOK

Pada kesempatan ini peneliti ingin menyampaikan rasa hormat dan ucapan terimakasih yang setulus-tulusnya kepada :

1. DR. dr. Hj. Hendriati, SpM (K) selaku Ketua Program Studi (KPS) Program Pendidikan Dokter Spesialis (PPDS) Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Andalas / RS Dr. M. Djamil Padang dan selaku pembimbing I, yang telah membimbing penulis selama mengikuti pendidikan dan dalam persiapan, pelaksanaan penelitian hingga penyusunan tugas akhir.
2. dr. H. M. Hidayat, SpM (K), selaku Kepala Bagian Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Andalas / RS Dr. M. Djamil Padang yang telah banyak membimbing penulis selama mengikuti pendidikan.
3. dr. Andrini Ariesti, SpM (K) selaku Sekretaris Program Studi (SPS) Program Pendidikan Dokter Spesialis (PPDS) Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Andalas / RS Dr. M. Djamil Padang, selaku pembimbing II, dan Pembimbing Akademik, yang telah membimbing penulis selama mengikuti pendidikan dan dalam persiapan, pelaksanaan penelitian hingga penyusunan tugas akhir.

4. dr. Hj. Getry Sukmawati, SpM (K) selaku Ketua Program Studi (KPS) Program Pendidikan Dokter Spesialis (PPDS) Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Andalas / RS Dr. M. Djamil Padang pada awal pendidikan, terima kasih karena telah menjadi orang tua kedua peneliti selama pendidikan, atas bantuan, nasehat, dan ilmu bermanfaat yang selama ini dilimpahkan dengan rasa tulus dan ikhlas.
5. dr. H. Ardizal Rahman, SpM (K), Prof. dr. H. Khalilul Rahman, SpM (K), dr. H. Muslim, SpM (K), dan dr. H. Yaskur Syarif, SpM yang telah banyak membimbing penulis selama mengikuti pendidikan, membagi pengalaman dan nasehat yang sangat berguna bagi penulis.
6. dr. Hj. Kemala Sayuti, SpM (K), dr. Hj. Irayanti, SpM (K), dr. Sri Handayani Mega Putri, SpM (K), dr. Weni Helvinda, SpM (K), dr. Fitratul Ilahi, SpM (K), dr. Havriza Vitresia, SpM (K), dr. Rinda Wati, SpM (K), dr. Julita, SpM, dan dr. M. Syauqie, yang telah membimbing penulis selama mengikuti pendidikan.
7. dr. H. Zuhri Zainun, SpM dan dr. Hj. Sri Hartanti, SpM sebagai staf pengajar di BKIM Padang yang telah membantu kelancaran pendidikan peneliti.
8. Bapak Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Andalas yang telah memberi kesempatan penulis menuntut ilmu dan menyediakan fasilitas selama penulis mengikuti PPDS di Bagian Ilmu Kesehatan Mata
9. Direktur RS Dr. M. Djamil Padang yang telah menyediakan fasilitas selama penulis mengikuti PPDS di Bagian Ilmu Kesehatan Mata.
10. Kepala UPTD BKIM Padang yang telah menyediakan fasilitas selama penulis mengikuti PPDS di Bagian Ilmu Kesehatan Mata.
11. Teman-teman sejawat residen Bagian Ilmu Kesehatan Mata RS Dr. M. Djamil Padang atas kerjasama yang telah terbina selama ini.
12. Rekan-rekan paramedis bangsal dan poliklinik Bagian Ilmu Kesehatan Mata RS. Dr. M. Djamil Padang serta paramedis di BKIM Padang atas kerjasama yang telah terbina selama ini.

Disamping itu, peneliti mengucapkan terimakasih yang tak terhingga kepada :

13. Kedua orang tua tercinta dan kedua mertua tercinta, Ayahnda Drs. H. Yanwir Kamal, Mkes, Ayahnda H. Darisman (Alm) dan ibunda Hj. Delizar, ibunda Hj. Yusnidar.

Apa yang peneliti dapatkan hari ini, belum mampu membayar semua kebaikan, keringat, dan juga air mata yang telah dikeluarkan. Terima kasih atas segala dukungan, pengorbanan dan jerih payah serta doa yang tidak pernah putus.

14. Kepada suamiku tercinta, Hengky Firdaus, ST atas cinta dan kasih sayang, dukungan serta pengorbanan selama mendampingi peneliti menjalani pendidikan.

15. Kepada anak-anakku tersayang, Keisha Nameera Azzahra dan Khayla Azeeza Rizqah yang selalu menjadi sumber kekuatan dan semangat dalam menyelesaikan pendidikan ini.

16. Kepada adik-adikku tersayang, Ricky Arief Budiman, Widya Aryani, Al Firdaus, Adela Ilvania, terimakasih atas dukungan, bantuan dan doanya selama ini.

17. Kepada semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, yang telah memberikan bantuannya selama menjalani pendidikan, semoga semua bantuan Bapak, Ibu dan rekan-rekan sejawat sekalian diberikan pahala oleh Allah SWT.



Peneliti menyadari bahwa penelitian ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu diharapkan saran dan kritik yang membangun untuk kesempurnaan tesis ini. Semoga penelitian ini akan menjadi kontribusi yang bermamfaat khususnya bagi Bagian Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Andalas / RS Dr. M. Djamil Padang dan dunia kedokteran pada umumnya. Aamiin...

Padang, Oktober 2019

dr. Rince Liyanti

PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN E TOPIKAL DAN SISTEMIK TERHADAP KADAR *MALONDIALDEHYDE* LENSA TIKUS PERCOBAAN YANG DIBERI PAPARAN ASAP ROKOK

Rince Liyanti, Hendriati, Andri Ariesti

Bagian Ilmu kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Andalas
RSUP Dr. M. Djamil Padang

Abstrak

Pendahuluan : Radikal bebas dan oksidan memiliki berperan ganda, sebagai zat merugikan dan bermanfaat bagi tubuh. Saat jumlah radikal bebas dalam tubuh berlebih dan tidak dapat dihancurkan, berakumulasi dalam tubuh menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Reaksi antara asap rokok dan asam lemak tak jenuh ganda pada membran lensa menyebabkan kerusakan pada sel lensa, dan penggunaan antioksidan merupakan salah satu upaya melindungi kerusakan sel tubuh dari serangan radikal bebas.

Tujuan : Mengetahui pengaruh pemberian vitamin E topikal dan sistemik terhadap kadar *Malondialdehyde* (MDA) lensa tikus percobaan yang diberi paparan asap rokok.

Metode : Dua puluh empat tikus wistar secara acak dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok kontrol (K), kelompok yang mendapat paparan asap rokok (P1), kelompok yang mendapat paparan asap rokok dan antioksidan topikal (P2), dan kelompok yang mendapat paparan asap rokok dan antioksidan sistemik (P3). Paparan asap rokok diberikan 2 batang tiap kelompok, 2 kali sehari selama 21 hari berturut-turut. Pada akhir penelitian, mata tikus dienukleasi untuk pengukuran kadar MDA lensa.

Hasil : Rerata kadar MDA kelompok K lebih rendah dibandingkan kelompok P1, P2, dan P3. Kelompok P1 memiliki nilai rerata kadar MDA paling tinggi. Rerata kadar MDA pada kelompok P2 lebih tinggi dibandingkan kelompok P3, namun tidak signifikan secara statistik, sementara kelompok K juga memiliki kadar MDA yang tidak berbeda signifikan secara statistik dengan kelompok P3.

Kesimpulan : Paparan asap rokok menyebabkan stres oksidatif dilensa tikus coba dan penggunaan antioksidan vitamin E baik sistemik dan topikal efektif mengurangi dampak stres oksidatif dilensa. Toksik asap rokok mempengaruhi struktur *tear films* dan kornea, menyebabkan berkurangnya absorpsi obat topikal ke intra okular, sehingga pada penelitian ini pemberian antioksidan secara sistemik ternyata lebih efektif melindungi lensa tikus coba dibanding pemberian topikal.

Kata kunci : radikal bebas, antioksidan, vitamin E, *α Tocopherol*, *malondialdehyde*

Effect of Topical and Sistemic Antioxidant Vitamin E on Malondialdehyde Lens of Experiment Mice Which are Cigared by Cigarette

Rince Liyanti, Hendriati, Andri Ariesti

Department of Ophthalmology, Medical Faculty of Andalas University
M. Djamil Hospital Padang

Abstract

Introduction: Free radicals and oxidants have a dual role, as substances that are harmful and beneficial to the body. When the amount of free radicals in the body is excessive and cannot be destroyed, accumulation in the body causing oxidative stress. The reaction between cigarette smoke and polyunsaturated fatty acids in the lens membrane can causes damage to the lens cells, and the use of antioxidants is an efforts to protect risk of damage to body cells from free radical attack.

Objective: To determine the effect of topical and systemic vitamin E administration on the levels of Malondialdehyde (MDA) lens of experimental mice given cigarette smoke exposure.

Methods: Twenty-four wistar rats were randomly divided into 4 groups, namely the control group (K), the group receiving exposure to cigarette smoke (P1), the group receiving exposure to cigarette smoke and topical antioxidants (P2), and the group receiving exposure to smoke cigarettes and systemic antioxidants (P3). Exposure to cigarette smoke was given 2 sticks per group, 2 times a day for 21 consecutive days. At the end of the study, rat eyes were elucleated to measure the level of MDA lens.

Results: The mean MDA levels in group K was lower than groups P1, P2 and P3. Group P1 had the highest MDA level average value. The mean MDA level in group P2 was higher than group P3, but it was not statistically significant

Conclusion: Exposure to cigarette smoke can cause oxidative damage in rat lens and the presence of systemic and topical antioxidant vitamin E effective for preventing oxidative stress effect in the lens. Toxic of cigarette smoke damage the structure of tear films and corneas, reduced absorption of topical drugs into intraocular tissue, so in this study systemic administration was found to be more effective for protecting rat lens compared to topical.

Keywords : free radicals, antioxidants, vitamin E, α Tocopherol, malondialdehyde

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN PENGESAHAN

DAFTAR ISI	i
DAFTAR GAMBAR	iii
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR SINGKATAN	v
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	6
C. Tujuan Penelitian	6
D. Manfaat Penelitian	7
BAB II. TINJAUAN KEPUSTAKAAN	9
A. Embriologi, Anatomi dan Fisiologi Lensa	9
B. Biologi Tikus Percobaan	12
C. Stress Oksidatif Pada Mata	13
BAB III. KERANGKA KONSEP, DEFINISI OPERASIONAL DAN HIPOTESA	28
A. Kerangka Konsep	28
B. Definisi Operasional	29
C. Hipotesa	30
BAB IV. METODE PENELITIAN	31
A. Desain Penelitian	31
B. Tempat dan Waktu penelitian	31
C. Variabel Penelitian	31
D. Populasi dan Sampel	31
E. Kriteria Inklusi dan Eksklusi Penelitian	33
F. Bahan dan Instrumen Penelitian	33

G. Alur Penelitian	35
H. Cara Kerja dan Teknik Pengumpulan Data.....	36
BAB V. HASIL PENELITIAN.....	40
BAB VI. PEMBAHASAN	43
BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN	50

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1 : Struktur Molekul Vitamin E (α -TOC).....	23
Gambar 2 : Mekanisme Antioksidan Vitamin E (α -TOC).....	23
Gambar 3 : Pembentukan dan Metabolisme MDA	26
Gambar 4 : Kerangka Konsep Proses Stress Oksidatif pada Manusia dan Hewan Coba	28
Gambar 5 : Kandang Pemeliharaan Tikus.....	34
Gambar 6 : Kandang Pengasapan Tikus.....	34
Gambar 7 : Alur Penelitian	35



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1 : Penentuan dosis equivalen hewan coba berdasarkan luas permukaan tubuh	13
Tabel 2 : Dosis Vitamin E (<i>α Tocopherol</i>) yang direkomendasikan ...	22
Tabel 3 : Dosis Vitamin E (<i>α Tocopherol</i>) yang masih dapat ditoleransi	27
Tabel 4 Kadar MDA Lensa Tikus Coba	41
Tabel 5 Perbandingan Kadar MDA Lensa Tikus Coba	42
Tabel 6 Uji Post Hoc Kadar MDA Lensa Tikus Coba yang tidak diberi paparan, yang diberi paparan asap rokok tanpa antioksidan dan yang diberi paparan asap rokok dengan antioksidan	42



DAFTAR SINGKATAN

1. α -TOC : *α Tocopherol*
2. AED : *Animal Equivalent Dose*
3. ARL : *Asap Rokok Lingkungan*
4. ATP : *Adenosin Trifosfat*
5. Cat : *Catalase*
6. CO : *Carbon Monoxyda*
7. DNA : *Deoxyribonucleic Acid*
8. ETS : *Environment Tobacco Smoke*
9. FDA : *Food and Drug Administration*
10. GPx : *Glutathione Peroxidase*
11. H₂O₂ : *Hydrogen Peroxide*
12. HCN : *Hydrogen Cyanida*
13. HED : *Human Equivalent Dose*
14. IU : *International Unit*
15. LD₅₀ : *Lethal Dose (dosis toksik yang menyebabkan kematian 50% dari hewan coba)*
16. MDA : *Malondialdehyde*
17. MS : *Mainstream Smoke*
18. NADPH : *Nikotinamida Adenosin Dinokleotida Posphat Hidrogen*
19. OH : *Hydroxyl Radicals*
20. PUFA : *Poly Unsaturated Fatty Acid*
21. Riskesdas : *Riset Kesehatan Dasar*
22. RNA : *Ribonucleic Acid*
23. RNS : *Reactive Nitrogen Species*
24. ROS : *Reactive Oxygen Species*
25. SOD : *Superoksida dismutase*
26. SS : *Side Stream Smoke*
27. TBA : *Thio Barbituric Acid*
28. TBAR : *Thio Barbituric Acid Reaction*
29. WHO : *World Health Organisation*



BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Teori tentang radikal bebas telah diperkenalkan sejak tahun 1956 oleh Denham Harman, namun baru berkembang khususnya dalam bidang kedokteran dan kesehatan dalam dua dekade terakhir. Clarkson dan Thompson (2000) mendefinisikan radikal bebas sebagai atom atau molekul yang tidak mempunyai elektron yang berpasangan pada lapisan luarnya.⁽¹⁾ Radikal bebas terbentuk sebagai hasil sampingan berbagai proses seluler yang melibatkan oksigen, seperti *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Reactive Nitrogen Species* (RNS) yang dihasilkan selama metabolisme normal dan pengaruh faktor eksogen, seperti radiasi, polusi udara, asap rokok, obat-obatan dan lainnya.⁽²⁾

Radikal bebas memainkan peran ganda dalam kehidupan. Pada tingkat rendah atau sedang, senyawa ini memberikan efek menguntungkan pada respons seluler dan fungsi kekebalan tubuh, namun ketika kelebihan radikal bebas tidak dapat dihancurkan, secara bertahap akumulasi zat ini dalam tubuh menghasilkan fenomena yang disebut stres oksidatif. Sifat dari radikal bebas adalah sangat reaktif dan memiliki waktu paruh yang sangat cepat dengan mengambil elektron molekul disekitarnya, terutama protein dan lemak tidak jenuh. Radikal bebas memiliki molekul-molekul yang tidak stabil yang dapat menyerang dan merusak sel-sel yang sehat. Proses ini memainkan peran utama dalam perkembangan penyakit kronis dan degeneratif seperti kanker, gangguan autoimun, penuaan, katarak, rematoid arthritis, penyakit kardiovaskular dan neurodegeneratif.^(2, 3)

Radikal bebas menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid, dengan merusak senyawa lemak yang ada pada membran sel. Hal ini terjadi karena membran sel kaya akan sumber *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) yang mudah dirusak oleh bahan-bahan pengoksidasi. Untuk mencegah terjadinya kerusakan lapisan PUFA pada

membran sel, diperlukan suatu senyawa yang dapat mencegah peroksidasi lipid tersebut. Senyawa itu disebut antioksidan, yang bekerja dengan memberikan elektron kepada radikal bebas sehingga radikal bebas tidak mempunyai kemampuan lagi untuk mencuri elektron dari sel lain. Secara alami tubuh manusia sebenarnya telah memiliki mekanisme pertahanan terhadap radikal bebas, yaitu antioksidan endogen intrasel yang terdiri atas enzim-enzim yang disintesis oleh tubuh seperti *Superoxide Dismutase* (SOD), *Catalase* (Cat) dan *Glutathione Peroxidase* (GPx).⁽²⁻⁴⁾

Dalam bidang oftalmologi, beberapa studi melaporkan stres oksidatif terlibat dalam proses inflamasi di konjungtiva, kornea, uvea, proses kataraktogenesis di lensa, proses degenerasi di retina, dan kondisi patologis saraf optik seperti neuritis optik dan glaukoma. Kelainan tersebut juga terkait dengan penambahan usia, yang dianggap merupakan hasil dari akumulasi kerusakan molekuler selama hidup, khususnya dari senyawa radikal ROS.^(5, 6)

Asap rokok, radiasi sinar matahari maupun penggunaan telepon seluler merupakan beberapa contoh radikal bebas yang kita hadapi sehari-hari dan dapat menimbulkan berbagai kelainan patologis pada mata. Sistem imun yang melemah dapat ditemukan pada perokok baik aktif maupun pasif, hal ini disebabkan pembakaran asap rokok yang menghasilkan radikal bebas berkali-kali lipat dibandingkan radikal bebas pada metabolisme tubuh pada keadaan normal.^(7, 8)

Peningkatan jumlah perokok yang berkelanjutan telah menjadi masalah utama kesehatan masyarakat di dunia dari tahun ke tahun. Data WHO tahun 2013 menyebutkan prevalensi penduduk usia dewasa yang merokok setiap hari di Indonesia sebesar 29% yang menempati urutan pertama se-Asia Tenggara. Data *Asia News Network* pada tahun 2017, Indonesia masih menempati urutan pertama se-Asia dengan prevalensi perokok laki-laki sebesar 76%, yang memakan anggaran negara yang besar untuk membiayai penyakit-penyakit terkait merokok tersebut.⁽⁹⁻¹¹⁾

Riset Kesehatan Dasar (Riskesmas) tahun 2018 menyatakan prevalensi penduduk umur >10 tahun yang merokok adalah 28,8%, sedikit mengalami penurunan dari sebelumnya yaitu 29,3% (Riskesmas 1013). Prevalensi merokok usia anak-anak (10-18 tahun) mengalami peningkatan, yaitu sebanyak 9,1%, dibandingkan

Riscesdas 2013, yaitu sebanyak 7,2%. Prevalensi perokok pada laki-laki lebih banyak di dibandingkan perokok perempuan (62,9% banding 4,8,1%) dan rerata batang rokok yang dihisap perhari penduduk umur ≥ 10 tahun di Indonesia adalah 12 batang (setara satu bungkus).^(12, 13)

Merokok merupakan salah satu faktor resiko terjadinya katarak. McCarty (2000) dalam penelitiannya pada masyarakat Australia menunjukkan bahwa resiko terjadinya katarak nuklear dengan merokok adalah sebesar 17%.⁽¹⁴⁾ Menurut Sulochana (2002), stres oksidatif yang dibawa oleh ROS yang ada di dalam rokok telah diduga terlibat dalam patogenesis katarak.⁽¹⁵⁾ Tana (2009), dalam penelitiannya menyatakan salah satu determinan yang paling berperan terhadap kejadian katarak di Indonesia pada usia 30 tahun ke atas adalah merokok.⁽¹²⁾

Rokok mengandung bahan-bahan yang bersifat toksik dan karsinogenik, disamping beberapa bahan lain yang bersifat radioaktif dan adiktif. Asap rokok mengandung berbagai macam senyawa ROS, dalam bentuk substansi gas toksik dan substansi partikulat yang mengakibatkan kerusakan jaringan secara langsung atau senyawa ROS mengikuti aliran sistemik setelah inhalasi asap, mengganggu homeostasis sel dan memicu terjadinya stres oksidatif pada perokok itu sendiri serta orang-orang yang terpapar asap rokok.⁽⁷⁾

Lensa mata normal sebenarnya telah dilengkapi perlindungan sistem antioksidan alami, namun seiring bertambahnya usia dan adanya paparan yang terus-menerus oleh faktor eksogen seperti sinar matahari berlebihan, paparan asap rokok dan polutan lainnya dapat menyebabkan terganggunya mekanisme proteksi antioksidan alami lensa mata. Reaksi radikal bebas dengan asam lemak tidak jenuh ganda (PUFA) yang terdapat pada membran sel lensa akan menyebabkan degradasi protein lensa, merusak struktur membran lensa, dan peningkatan opasitas lensa melalui proses peroksidasi lipid yang menghasilkan produk senyawa *Malondialdehyde* (MDA). Reaksi oksidatif pada membran lensa juga menyebabkan terganggunya mekanisme transport aktif nutrisi dan elektrolit dari aqueous humor ke lensa, terganggunya komposisi komponen intraseluler lensa, dan terganggunya

keseimbangan elektrolit kalium, natrium dan kalsium lensa yang berperan pada patogenesis terjadinya katarak.^(5, 16-18)

Salah satu upaya melindungi dan memperkecil resiko kerusakan pada sel tubuh dari serangan radikal bebas adalah dengan mengkonsumsi makanan yang merupakan sumber antioksidan. Zat antioksidan merupakan substansi yang dapat menetralkan atau menghancurkan radikal bebas, sehingga diharapkan dapat memperlambat ataupun mencegahnya terjadinya kerusakan sel akibat proses stres oksidatif. Vitamin E atau α -Tocopherol (α -TOC) merupakan antioksidan mayor yang berperan langsung melindungi peroksidasi lipid di membran sel. Keunggulan vitamin E dibandingkan antioksidan lain yaitu karena vitamin E merupakan antioksidan larut dalam lemak yang mampu melindungi PUFA terhadap radikal bebas dengan menyumbangkan elektronnya, selain itu vitamin E mempunyai banyak ikatan rangkap yang mudah dioksidasi sehingga dapat melindungi lipid dari peroksidasi dan menghentikan penyebaran radikal bebas pada membran sel.^(18, 19)

Penelitian untuk mempelajari efek terapi vitamin E yang telah banyak dilakukan menunjukkan bahwa terapi vitamin E oral atau topikal bermanfaat mencegah atau menghambat kelainan patologi akibat stres oksidatif di okular. Dalam studi terkontrol plasebo, vitamin E oral mampu meningkatkan kadar *glutathione* dalam aquos humor dan lensa manusia, kelinci dan tikus.⁽¹⁸⁾

Suplemen vitamin E 400 IU umumnya direkomendasikan untuk semua individu dengan beban oksidatif normal. Penambahan 400 IU (total 800 IU) per hari disarankan untuk individu berisiko tinggi untuk serangan jantung, kanker, dan kelainan mata oksidatif. Studi lain menyatakan dibutuhkan pemberian vitamin E dosis tinggi baik secara oral dan parenteral, hingga 1000–1200 IU (100 kali lipat dari dosis yang direkomendasikan) untuk memenuhi kebutuhan antioksidan di okular yang dapat memberi efek perlindungan dimata terhadap pasien resiko tinggi terpapar radikal bebas.^(2, 20, 21)

Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Rocksén (2003) membuktikan bahwa pemberian α -TOC injeksi 50 mg/kgBB pada mencit mampu menurunkan jumlah neutrofil akibat inflamasi pada saluran pernafasan dan cedera paru secara

signifikan.⁽²²⁾ Seth dan Kharb (1999) yang meneliti tentang efek protektif α -TOC dalam mencegah kataraktogenesis pada manusia menyimpulkan terdapat penurunan level MDA lensa saat terjadi serum vitamin E dengan pemberian suplementasi vitamin E 100 mg/hari selama 1 bulan pada penderita katarak.⁽²³⁾

Penggunaan vitamin E topikal dalam bentuk emulsi liposomal juga telah terbukti menghambat perkembangan katarak di beberapa studi katarak *in vivo*, bahkan aplikasi topikal vitamin E dianggap lebih ideal digunakan pada pasien katarak karena dengan aplikasi vitamin E topikal diharapkan konsentrasi vitamin E yang sampai ke lensa lebih tinggi dibandingkan untuk pemberian vitamin E sistemik, dengan syarat larutan ophthalmik tersebut memiliki viskositas rendah dan tidak stimulatif.⁽²⁴⁾

Kojima *et al.* (1996) melakukan studi untuk meneliti efektifitas vitamin E 5% topikal pada lensa tikus yang diinduksi katarak dengan pemberian steroid menyatakan pemberian vitamin E 5% topikal dapat menghambat perkembangan katarak yang signifikan pada tikus.⁽²⁵⁾ Nagata *et al.* (1999) melakukan pemberian vitamin E *acetate* 1% topikal, 5 kali sehari pada mata tikus yang diinduksi katarak dengan pemberian naftalen menemukan bahwa aplikasi vitamin E topikal bermanfaat memperlambat perkembangan katarak.⁽²⁶⁾ J. Xin *et al.* (2015) dalam studinya tentang efektifitas α -TOC topikal dalam mencegah kerusakan akibat stres oksidatif ocular mengatakan bahwa pemberian α -TOC topikal mampu melindungi ocular terhadap stres oksidatif, namun dibutuhkan pengembangan formulasi yang lebih stabil yang mempertahankan aktivitas α -TOC.⁽²¹⁾

Studi penggunaan antioksidan baik sistemik atau topikal untuk menghambat kataraktogenesis telah banyak dilakukan, namun studi yang membandingkan perbedaan efektifitas penerapan antioksidan secara topikal atau sistemik masih terbatas dan masih perlu dipelajari lebih lanjut. Berdasarkan latar belakang ini peneliti ingin mengetahui lebih lanjut pengaruh pemberian antioksidan vitamin E (α -TOC) topikal dan sistemik terhadap kerusakan lensa tikus putih yang diberi paparan asap rokok dengan parameter *Malondialdehyde* .

B. Rumusan Masalah

Asap rokok mengandung senyawa toksik yang dapat memicu reaksi inflamasi dan stres oksidatif akut ataupun kronis pada seluruh organ, termasuk pada mata. Oleh karena itu, tubuh memerlukan suatu substansi penting yakni antioksidan yang dapat membantu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas, salah satunya mencegah proses kataraktogenesis yang terjadi pada mata. Penelitian untuk mempelajari efek terapi vitamin E sistemik maupun topikal pada katarak telah banyak dilakukan, menunjukkan bahwa terapi vitamin E bermanfaat mencegah atau menghambat perkembangan katarak secara signifikan. Berdasarkan pada latar belakang masalah yang telah dipaparkan, maka penelitian ingin mengetahui bagaimana pengaruh pemberian vitamin E topikal dan sistemik terhadap kadar MDA lensa tikus percobaan yang diberi paparan asap rokok?

C. Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum :

Mengetahui pengaruh pemberian vitamin E topikal dan sistemik terhadap kadar MDA lensa tikus percobaan yang diberi paparan asap rokok.

2. Tujuan Khusus :

- a. 1) Mengetahui kadar MDA lensa tikus percobaan yang tidak diberi paparan asap rokok
- 2) Mengetahui kadar MDA lensa tikus percobaan yang diberi paparan asap rokok
- 3) Mengetahui kadar MDA lensa tikus percobaan yang diberi paparan asap rokok dan antioksidan vitamin E topikal
- 4) Mengetahui kadar MDA lensa tikus percobaan yang diberi paparan asap rokok dan antioksidan vitamin E sistemik



- b. Mengetahui perbedaan kadar MDA lensa tikus yang tidak diberi paparan asap rokok, yang diberi paparan asap rokok, yang diberi paparan asap rokok dan antioksidan vitamin E topikal, serta yang diberi paparan asap rokok dan antioksidan vitamin E sistemik
- c. 1) Mengetahui perbedaan kadar MDA lensa tikus tidak diberi paparan asap rokok dengan tikus yang diberi paparan asap rokok tanpa antioksidan dan yang diberi paparan asap rokok serta antioksidan vitamin E topikal dan sistemik.
- 2) Mengetahui perbedaan kadar MDA lensa tikus yang diberi paparan asap rokok tanpa antioksidan dengan tikus yang diberi paparan asap rokok serta antioksidan vitamin E topikal dan sistemik.
- 3) Mengetahui perbedaan kadar MDA lensa tikus yang diberi paparan asap rokok serta antioksidan vitamin E topikal dengan tikus yang diberi paparan asap rokok serta antioksidan vitamin E sistemik.

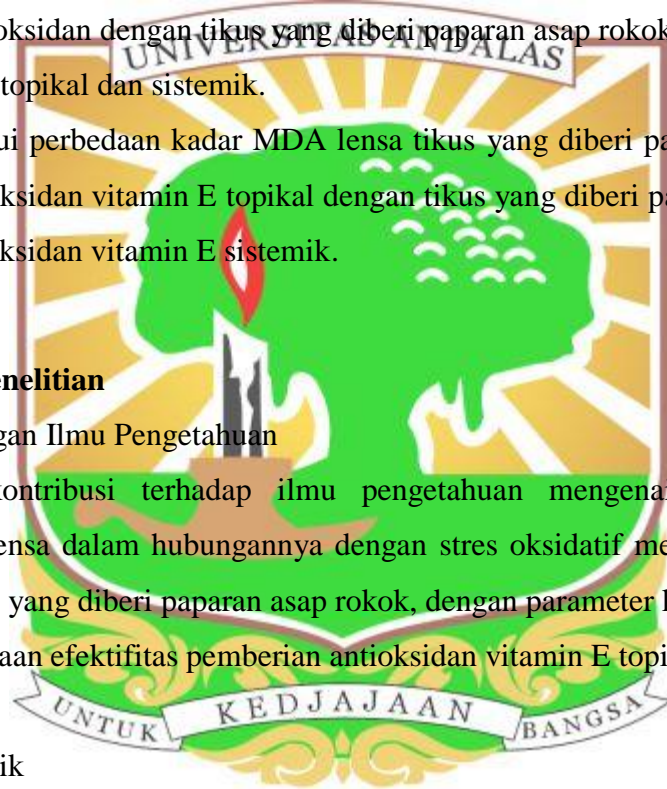
D. Manfaat Penelitian

1. Pengembangan Ilmu Pengetahuan

Memberi kontribusi terhadap ilmu pengetahuan mengenai etiopatogenesis kerusakan lensa dalam hubungannya dengan stres oksidatif melalui hewan coba (tikus putih) yang diberi paparan asap rokok, dengan parameter kadar MDA lensa, serta perbedaan efektifitas pemberian antioksidan vitamin E topikal dan sistemik.

2. Bidang Klinik

Hasil penelitian diharapkan dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan untuk penelitian lebih lanjut mengenai manajemen penyakit degeneratif yang dipicu stres oksidatif, khususnya pada mata, dan pemilihan pemberian terapi antioksidan yang tepat, efektif dan rasional.



3. Bidang Masyarakat

Memberi edukasi kepada masyarakat mengenai bahaya merokok dan efek buruk polutan yang ditimbulkan asap rokok, bukan hanya pada orang yang merokok, namun juga terhadap orang disekitarnya yang menghirup asap rokok (sebagai perokok pasif), serta pentingnya penggunaan antioksidan dalam diet sehari-hari.



BAB II

TINJAUAN KEPUSTAKAAN

A. Embriologi, Anatomi dan Fisiologi Lensa

1. Embriologi lensa

Pembentukan lensa kristalin dimulai pada proses embriogenesis, dimulai di hari ke 25 gestasi, membentuk vesikel optik (*optic vesicle*) yang terbentuk di encefalon. Vesikel optik akan membesar dan melebar ke lateral dan menjadi semakin dekat dengan ektoderm permukaan yang merupakan satu lapis sel kubus di kedua sisi kepala. Daerah yang menebal pada sel ektoderm yang berada di atas permukaan vesikel optik dan akan menjadi kolumnar pada hari ke 27 gestasi, disebut lempeng lensa (*lens plate*). *Lens pit* terbentuk pada hari ke 29 gestasi berupa indentasi (*folding*) dari lempeng lensa, dimana *lens pit* bertambah dalam dan berinvaginasi membentuk gelembung lensa yang mengandung selapis sel epitel kuboid yang ditutupi oleh lamina basal yang kemudian menjadi kapsul lensa (*lens capsule*) atau disebut juga *lens vesikel*. *Lens vesikel* terbentuk pada hari ke 30 gestasi dengan ukuran diameter $\pm 0,2$ mm.^(27, 28)

Pada hari ke 40 gestasi, lumen *lens vesikel* mulai terisi yang disebut sel serat lensa primer. Serat lensa primer membentuk nukleus embriogenik yang akan menempati sentral lensa saat dewasa. Sementara itu, sel dibagian anterior *lens vesikel* akan tetap berupa satu lapis sel kuboid yang disebut epitel lensa. Serat lensa yang baru terus menerus terbentuk lapis demi lapis hingga usia gestasi 32 minggu, membentuk nukleus fetus lensa. Serat-serat lensa ekuator ini tumbuh ke anterior dan posterior mengelilingi nukleus embrional, dan pertemuannya membentuk sutura Y anterior dan posterior. Pada proses perkembangan nukleus fetus ke anterior dan posterior tersebut, timbul sutura di tempat dimana serat-serat lensa bertemu. Sutura berbentuk huruf Y dapat ditemukan di anterior, dan sutura berbentuk huruf Y terbalik di posterior.^(27, 28)

Berat lensa manusia baru lahir 90 mg dan bertambah massanya ± 2 mg/tahun. Setelah 20 tahun, serat bagian sentral (lensa yang paling tua) berangsur-angsur menjadi lebih rigid. Setelah usia 40 tahun, kekakuan nukleus lensa menurunkan daya akomodasi, dan usia 60 tahun nukleus mengalami sklerosis dan perubahan warna yang sering membuat suture lensa sulit dikenali. Lensa tumbuh terus menerus. Ketebalan kortek meningkat sesuai usia, begitu juga kelengkungan dan kekuatan refraksinya. Tapi indeks refraksi menurun oleh karena bertambahnya partikel protein insoluble. Oleh karena itu dengan bertambahnya usia, lensa dapat menjadi hiperopik atau miopik tergantung perubahan protein.⁽²⁷⁾

2. Anatomi dan Fisiologi Lensa

Lensa kristalin adalah transparan dan punya struktur bikonveks, yang berfungsi untuk menjaga kejernihannya, merefraksikan cahaya dan berakomodasi. Lensa tidak memiliki suplai darah ataupun persarafan setelah perkembangan fetus. Untuk kebutuhan metabolismenya, lensa tergantung pada aqueous humor, terletak antara posterior iris dan anterior vitreous. Lensa tergantung pada zonula zinii yang mempunyai serat yang kuat dan melekat ke badan siliaris. Lensa terdiri dari kapsul, epitel, korteks dan nukleus.^(29, 30)

Lensa dapat merefraksi cahaya oleh karena ada indeks refraksi, normal 1,4 di sentral dan 1,36 di perifer. Pada keadaan tidak berakomodasi lensa berkontribusi sekitar 15-20 Dioptri dari total 60 Dioptri kekuatan refraksi mata, sedangkan sisanya 40 Dioptri lagi dari udara dan kornea. Epitel lensa merupakan satu lapis sel epitel di belakang kapsul anterior yang secara aktif bermetabolisme dan melakukan aktivitas sel normal meliputi biosintesis DNA, RNA, protein dan lemak serta membentuk ATP. Korteks dan nukleus merupakan serat paling luar dan dibentuk paling baru. *Y suture* berada dalam nukleus yang merupakan *multiple optical zone* yang dapat dilihat dengan slitlamp. Batas zona ini terbentuk karena lapisan sel epitel dengan densitas optik yang berbeda-beda, terbentuk seumur hidup. Tidak terdapat perbedaan morfologi antara korteks dan nukleus, karena transisi diantara keduanya bersifat gradual.^(27, 30, 31)

Nutrisi lensa sepenuhnya tergantung pada aqueous dan vitreus. Cairan aqueous berperan dalam penyediaan sumber nutrisi dan sekaligus sebagai tempat pembuangan metabolit lensa. Lensa normal mengandung air 66% dan protein 33%, serta sedikit mineral seperti jaringan tubuh lain. Didapatkan sekitar 5% air pada lensa terdapat pada ruang ekstraseluler. Kadar natrium di dalam lensa selalu dipertahankan pada 20 mM sedangkan kalium sekitar 120 mM. Sebaliknya di aqueous dan vitreus dipertahankan kadar natrium 150 mM dan kalium 5 mM. Keseimbangan kadar natrium dan kalium tersebut dijaga oleh suatu aktivitas pompa natrium dengan peran serta enzim Na^+ , K^+ ATPase. Beberapa penelitian melaporkan bahwa permeabilitas membran meningkat saat terbentuknya katarak. ^(28, 29, 32)

Protein lensa meliputi protein sitoskeletal, membran dan kristalin. Jumlah protein gamma kristalin yang memiliki sulfhidril tinggi, akan berkurang dengan bertambahnya usia. Protein kristalin berperan terhadap kejernihan lensa. Kristalin sebagai komponen utama lensa merupakan protein yang larut dalam air, dan berhubungan erat dengan enzim. Enzim-enzim dapat berakumulasi dalam sel dalam kadar yang tinggi tanpa menggumpal dan relative tahan terhadap faktor-faktor termodinamik. Selain itu juga dijumpai asam askorbat dan glutathion baik bentuk oksidasi maupun reduksi. Sebagian besar protein merupakan penyusun serabut lensa yang dibedakan atas protein yang larut dalam air (85%) dan protein yang tidak larut dalam air (15%). Lensa bersifat avaskuler dan dikelilingi oleh cairan bola mata yang kaya glukosa, tetapi miskin oksigen. Sehubungan dengan rendahnya oksigen, 70% pembentukan ATP sebagai sumber energi di lensa sebagian besar melalui glikolisis anaerob, dan hanya 3% melalui siklus krebs. Metabolisme glukosa menghasilkan ATP yang bermanfaat dalam menjaga kejernihan lensa melalui aktivitas pompa natrium maupun asam amino. Bila ada gangguan metabolisme pada lensa akibat proses kimia, trauma mekanik atau elektrik maupun radiasi akan terjadi kekeruhan lensa. ^(27, 29)

B. Biologi Tikus Percobaan

Pemilihan hewan coba yang tepat dalam membuat model penyakit atau kondisi tertentu yang sesuai tujuan penelitian sangat mempengaruhi keberhasilan dalam penelitian tersebut. Tikus merupakan salah satu spesies hewan yang banyak digunakan dalam sebuah penelitian. Sejak akhir abad ke-18 atau awal abad ke-19, tikus albino telah menjadi hewan percobaan yang paling sering digunakan dalam berbagai penelitian biomedis, karena telah diakui sebagai model mamalia yang unggul.⁽³³⁾

Tikus (*Rattus norvegicus*) jenis albino atau yang dikenal sebagai “tikus putih” adalah hewan yang paling sering digunakan sebagai model dalam penelitian biomedis, oleh karena dapat mewakili sistem biologis mamalia. Salah satu galur yang paling banyak digunakan adalah tikus *Wistar*. Tikus ini memiliki kepala yang lebar, kuping yang panjang, serta ekor yang panjangnya kurang dari panjang tubuhnya. Tikus *Wistar* memiliki sifat lebih agresif dan tingkat perkembangbiakan yang baik.⁽³³⁾

Data biologis tikus sebagai hewan coba penting diketahui untuk mengetahui data normal dan sebagai pembanding perkembangan tikus yang digunakan sebagai hewan coba baik sebelum perlakuan maupun setelah diberi perlakuan. Korelasi yang tepat antara usia tikus laboratorium dan manusia masih menjadi bahan perdebatan. Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa tikus tumbuh dengan cepat selama masa kanak-kanak dan menjadi dewasa secara seksual pada sekitar minggu keenam, dan mencapai kematangan sosial pada usia 5-6 bulan. Di masa dewasa, satu bulan tikus kira-kira sebanding dengan tiga tahun usia manusia.⁽³⁴⁾

Memahami konsep konversi dosis antar spesies untuk menentukan dosis pemberian obat yang aman dan efektif, perlu diketahui para peneliti ketika memulai eksperimen pada hewan atau manusia. Memilih dosis awal obat-obatan untuk penelitian, percobaan, atau uji klinis pada hewan dan manusia membutuhkan pertimbangan luas permukaan tubuh, farmakokinetik, dan waktu fisiologis untuk meningkatkan keamanan uji klinis. Terdapat skala alometrik untuk menentukan pertukaran dosis obat didasarkan pada normalisasi dosis ke area permukaan tubuh.

Metode ini sering digunakan dalam penelitian untuk tujuan eksperimental untuk memprediksi dosis perkiraan berdasarkan data yang ada di spesies lain. (Tabel 1)^(35, 36)

Tabel 1. Penentuan dosis equivalen hewan coba berdasarkan luas permukaan tubuh. Dikutip dari kepustakaan⁽³⁶⁾

Species	Referensi berat badan (kg)	Range berat badan (kg)	Luas permukaan tubuh (m ²)	Konversi dosis dalam mg/kg ke mg/m ² dibagi :	Konversi HED dalam mg/kg ke AED dalam mg/kg,	
					Mengkalikan HED dengan	Membagi HED dengan
Manusia	60	---	1.62	37	---	---
Anak	20	---	0.80	25	---	---
Mencit	0.020	0.011-0.034	0.007	3	12.3	0.081
Hamster	0.080	0.047-0.157	0.016	5	7.4	0.135
Tikus	0.150	0.080-0.270	0.025	6	6.2	0.162
Musang	0.300	0.160-0.540	0.043	7	5.3	0.189
Marmot	0.400	0.208-0.700	0.05	8	4.6	0.216
Kelinci	1.8	0.9-3.0	0.15	12	3.1	0.324
Anjing	10	5-17	0.50	20	1.8	0.541
Primata						
Monyet	3	1.4-4.9	0.25	12	3.1	0.324
Kera	0.350	0.140-0.720	0.06	6	6.2	0.162
Monyet tupai	0.600	0.290-0.970	0.09	7	5.3	0.189
Baboon	12	7-23	0.60	20	1.8	0.541
Micro-pig	20	10-33	0.74	27	1.4	0.730
Mini-pig	40	25-64	1.14	35	1.1	0.946

Penyelidikan epidemiologi ini dan studi genetik yang dilakukan pada manusia telah memberikan petunjuk-petunjuk yang penting mengenai potensi penyebab katarak, namun pembuktian mekanisme yang mendasari kataraktogenesis dan menguji potensi terapi pencegahan hanya dimungkinkan melalui penggunaan model hewan percobaan, untuk mempelajari kondisi lensa secara utuh, baik *in vivo* dan *ex vivo*.⁽³³⁾

C. Stres Oksidatif Pada Mata

Stres oksidatif adalah suatu keadaan ketidakseimbangan antara radikal bebas (oksidan) dengan antioksidan yang disebabkan oleh pembentukan radikal bebas yang berlebihan melebihi kemampuan sistem pertahanan antioksidan untuk mengatasinya.

Lensa mata sangat sensitif terhadap terjadinya stres oksidatif, walaupun lensa mata normal telah dilengkapi perlindungan dan sistem antioksidan untuk melawan stres oksidatif. Seiring bertambahnya usia dan adanya paparan yang terus-menerus dari lingkungan luar, tanpa disadari tubuh membentuk radikal bebas secara terus menerus baik melalui proses metabolisme sel normal atau respon terhadap pengaruh dari luar yang akan menyebabkan gangguan mekanisme proteksi antioksidan lensa mata sehingga terjadi akumulasi radikal bebas yang berlebihan.^(8, 27, 32)

1. Radikal Bebas (Oksidan)

Radikal bebas (oksidan) telah diketahui berkaitan dengan berbagai kelainan di mata dan penyakit sistemik serta proses penuaan. Oksidan akan berinteraksi dengan antioksidan sehingga mengurangi dan mencegah kerusakan dalam tubuh. Ketidakseimbangan antara oksidan dan anti oksidan akan menyebabkan stres oksidatif yang menimbulkan kematian sel dan kerusakan jaringan.^(3, 8)

Radikal bebas adalah suatu senyawa atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbit luarnya. Adanya elektron tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif mencari pasangan, dengan cara menyerang dan mengikat elektron molekul yang berada disekitarnya. Molekul yang terambil elektronnya akan mewarisi sifat reaktifnya sehingga timbul reaksi berantai yang tidak terputus. Reaksi berantai akan berhenti apabila reaktivitasnya diredam oleh senyawa yang bersifat antioksidan. Senyawa yang memiliki molekul besar seperti lipid, protein dan DNA rentan terhadap serangan radikal bebas, namun yang paling rentan adalah asam lemak tak jenuh.^(2, 3)

Radikal bebas terbentuk sebagai hasil sampingan berbagai proses seluler dan metabolisme normal yang melibatkan oksigen, seperti *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Reactive Nitrogen Species* (RNS). *Reactive Oxygen Species* meliputi berbagai senyawa kimia seperti *superoxide anions*, *hydroxyl radicals* (OH) dan *hydrogen peroxide* (H₂O₂). Sebagian ROS endogen berasal dari produk metabolisme anaerob di mitokondria, sedangkan ROS eksogen antarlain sinar ultraviolet, radiasi ion, kemoterapi, polutan lingkungan dan faktor lainnya.^(2, 3, 5)

Reactive Oxygen Species dan stres oksidatif terlibat dalam banyak hal penyakit okular termasuk katarak. Hipotesis kontemporer menganggap akumulasi produksi *ROS* dan reduksi antioksidan endogen berkontribusi penting dalam proses yang berkaitan dengan usia di tubuh termasuk katarak dan degenerasi retina. Lensa kristalin yang terus menerus mengalami stres oksidatif dan radiasi dari sumber lain dapat merusak protein kristal, lipid, polisakarida dan asam nukleat. Meskipun lensa sebenarnya memiliki komponen perlindungan dari stres oksidatif, namun dengan penuaan akumulasi komponen lensa teroksidasi dan menurunnya efisiensi mekanisme protektif alami tersebut berkontribusi terbentuknya katarak.^(5, 37)

2. Asap Rokok Sebagai Bahan Pencemar Udara Dalam Ruangan

Rokok mengandung lebih dari 4000 bahan zat organik berupa gas maupun partikel yang telah diidentifikasi dari daun tembakau maupun asap rokok. Bahan tersebut umumnya bersifat toksik dan karsinogenik, disamping beberapa bahan lain yang bersifat radioaktif dan adiktif. Asap yang dihasilkan mengandung berbagai macam senyawa *ROS* yang memicu terjadinya stres oksidatif dan mengakibatkan kerusakan jaringan mata. Pembakaran rokok menghasilkan asap rokok, terdiri dari dua komponen yaitu 85% komponen cepat menguap yang berbentuk gas dan 15% komponen partikel-partikel terdispersi di dalamnya. Substansi gas terdiri dari berbagai macam gas berbahaya yang dihasilkan oleh asap rokok, antarlain karbon monoksida (CO), hidrogen sianida (HCN), oksida nitrogen, nitrosamin, nitrosopirolidin, hidrasin, vinil klorida, uretan, formaldehid, akrolein, asetaldehida, nitrogen oksida, amonia piridin, dan lainnya. Substansi partikulat terdiri dari berbagai zat-zat kimia toksik yang terserap dari penyaringan asap rokok menggunakan *filter cartridge* dengan ukuran pori-pori 0,1 μm , terdiri dari bensopirin, dibensakridin, dibensokarbasol, piren, fluoranten, hidrokarbon aromatik, polinuklear, naftalen, nitrosamin yang tidak mudah menguap, nikel, arsen, nikotin, alkaloid tembakau, fenol dan kresol. Jumlah *ROS*, terutama O_2^- , Hidroksil Radikal (OH) dan Hidrogen Peroksida (H_2O_2) meningkat setelah paparan asap rokok dalam sel.⁽⁷⁾

Besar pajanan asap rokok bersifat kompleks dan dipengaruhi oleh jumlah rokok yang dihisap dan pola penghisapan rokok tersebut. Faktor lain yang dapat mempengaruhi pajanan asap rokok adalah usia mulai merokok, lama merokok dan dalamnya hisapan. Jumlah rokok yang dihisap dapat dinyatakan dalam *packyears* setara dengan berapa bungkus rokok yang dihisap dalam satu hari (1 bungkus = 20 batang) dikalikan lamanya merokok dalam tahun. Pola penghisapan rokok sangat bervariasi tergantung pada kebiasaan seseorang. Udara yang dihisap melalui rokok berkisar 25-50 ml tiap hisapan. Udara dapat dihisap melalui mulut atau hidung kemudian dikeluarkan kembali dengan cara serupa. Asap rokok yang dihisap ke dalam paru oleh perokok disebut asap rokok utama (*mainstream smoke/MS*) sedangkan asap rokok yang berasal dari ujung rokok yang terbakar disebut asap rokok samping (*sidestream smoke/SS*). Polusi udara yang ditimbulkan disebut asap rokok lingkungan (*ARL*) atau *environment tobacco smoke (ETS)*.⁽³⁸⁾

Perokok dapat dibedakan menjadi dua macam, yaitu perokok aktif dan pasif. Perokok aktif adalah seseorang yang melakukan aktifitas merokok (menghisap asap rokok dari rokok yang dibakar), sedangkan perokok pasif adalah seseorang yang tidak melakukan aktifitas merokok, tetapi ikut menghisap asap rokok yang ada di lingkungan. Beberapa tahun belakangan ini bahaya asap rokok tidak hanya difokuskan pada orang yang merokok (perokok aktif) tetapi juga terhadap orang-orang yang tidak merokok tetapi menghisap asap rokok (perokok pasif). Perokok pasif mempunyai peluang yang sama bahkan lebih tinggi mendapatkan penyakit dibandingkan perokok aktif. Hal ini disebabkan karena perokok pasif akan menghisap asap samping yang keluar dari ujung batang rokok yang terbakar. Asap arus samping lebih banyak dari asap arus utama dan mengandung lebih banyak bahan berbahaya karena tanpa melalui penyaringan atau filter, selain itu diketahui juga bahwa kandungan bahan kimia pada asap rokok samping ternyata lebih tinggi dibandingkan dengan asap rokok utama, karena tembakau terbakar pada temperatur yang lebih rendah ketika sedang dihisap membuat pembakaran menjadi kurang lengkap dan mengeluarkan lebih banyak bahan kimia.^(7, 39, 40)

Ada dua jenis produk rokok yang beredar di Indonesia yaitu rokok putih dan rokok kretek. Rokok kretek adalah rokok yang memiliki ciri khas Indonesia, yaitu berbahan campuran cengkeh sekitar seperempat bagian dan sisanya bumbu khusus yang menjadi ciri khas masing-masing merek rokok, sementara rokok putih, adalah rokok dengan atau tanpa filter menggunakan tembakau virginia iris atau tembakau lainnya tanpa menggunakan cengkeh, digulung dengan kertas sigaret. Komponen asap rokok dapat memicu terbentuknya radikal bebas karena mengandung berbagai macam zat kimia, antara lain nikotin yang bersifat adiktif, tar yang bersifat karsinogenik, dan komponen lainnya.^(10, 41)

Susanna *et al.* (2003) melakukan penelitian untuk menentukan kadar nikotin dalam asap rokok mengatakan sebagian besar rokok yang dikonsumsi di Indonesia adalah rokok kretek yang mengandung kadar tar dan nikotin lebih tinggi dibandingkan dengan rokok putih (rokok tanpa cengkeh). Secara umum, rokok kretek yang beredar di Indonesia mengandung 1,9-2,76 mg nikotin dan 34-65 mg tar per batang, sedangkan rokok putih mengandung 0,05-1,4 mg nikotin dan 0,5-24 mg tar per batang. Rokok kretek berpotensi menghasilkan asap yang lebih banyak dibandingkan dengan rokok putih.⁽³⁸⁾

Nikotin sangat toksik pada semua rute paparan, baik oral, dermal, dan inhalasi. LD₅₀ (dosis letal yang dapat menyebabkan kematian pada 50% hewan coba) nikotin adalah 50 mg/kg untuk tikus percobaan dan 3 mg/kg untuk mencit. *Lethal dose* pada manusia dewasa adalah 40-60 mg/kgBB. Belum ada data dosis inhalasi, namun ada suatu studi mengatakan diperkirakan dosis letal inhalasi didasarkan pada paparan nikotin dalam rumah kaca dengan waktu 30 atau 60 menit.⁽⁴²⁾

Van der Vaart (2005), dalam studinya menyatakan bahwa pemaparan asap rokok secara akut merupakan metode yang relatif mudah dan sensitif untuk menyelidiki efek spesifik dari asap rokok pada stres oksidatif. Nikotin yang terdapat dalam asap rokok masuk ke paru-paru, kemudian ke dalam aliran darah dan selanjutnya dibawa ke otak dan jaringan lain. Waktu yang dibutuhkan nikotin untuk mencapai otak sekitar sepuluh menit setelah seseorang merokok. Kadar nikotin akan mulai menurun bila tidak ada asupan dari luar lagi selama kurang lebih tiga puluh

hari. Paparan asap rokok secara akut dapat menyebabkan kerusakan jaringan yang diikuti dengan peningkatan produk peroksidasi lipid. Efek akut menghirup asap rokok pada jaringan paru-paru, dan darah pada hewan coba menunjukkan peningkatan langsung marker stres oksidatif setelah paparan akut asap rokok. Dalam jaringan paru-paru tikus, level antioksidan endogen GSH menurun segera 1 jam setelah terpapar asap, dan kembali normal dalam 2-6 jam setelah paparan.^(43, 44)

Ozkol *et al.* (2011), yang melakukan penelitian mengenai efek sub akut paparan asap rokok terhadap serum darah, paru-paru, hati dan otak tikus coba yang diberi paparan asap rokok selama 60 menit, 2 kali sehari selama 23 hari menyatakan terdapat peningkatan signifikan level MDA terutama di paru-paru dan otak tikus.⁽⁴⁵⁾ Adyitia *et al.* (2016) melakukan penelitian kadar MDA plasma tikus wistar jantan pasca paparan asap rokok, menyatakan bahwa pemaparan asap rokok kretek non filter sebanyak 3 batang per hari dan proteksi vitamin E pada tikus coba selama 14 hari mendapatkan hasil penurunan kadar MDA plasma darah secara signifikan.⁽⁴⁶⁾

Agrawal (2018) yang meneliti efek asap rokok pada *ocular surface* dan *tear film* pada perokok aktif menyatakan bahwa gejala paling umum yang dialami oleh perokok adalah mata merah (34%), diikuti oleh kelelahan mata (26%), sensasi terbakar (24%), gatal (24%) dan sensasi benda asing (14%), namun sebagian besar perokok menyatakan tidak mengalami gejala apapun (asimtomatik). Studi ini juga menyimpulkan bahwa merokok berpengaruh signifikan terhadap perkembangan *dry eye* dan gangguan *ocular surface*, ditandai oleh metaplasia sel skuamosa dan berkurangnya sel goblet konyungtiva yang memiliki korelasi positif dengan jumlah rokok yang dikonsumsi.⁽⁴⁷⁾

Kusumawardani (2013), mengamati perubahan histopatologis kornea setelah pemberian asap rokok 9 batang perhari, 4 batang rokok pagi, dan 5 batang rokok sore hari selama 60 hari menemukan terjadinya hiperplasia sel epitel kornea, peningkatan aktifitas mitosis, dan irregularitas membran Bowman. Hiperplasia merupakan salah satu respon adaptasi sel terhadap stimulasi senyawa toksik yaitu asap rokok. Lesi tersebut dapat disebabkan oleh faktor fisik yang terjadi akibat adanya kontak langsung antara asap rokok dengan permukaan mukosa kornea, dan faktor sistemik,

dapat terjadi melalui inhalasi senyawa toksik yang terdapat dalam asap rokok yang kemudian terbawa oleh aliran darah sehingga mencapai organ mata.⁽⁴⁸⁾

Rokok berkontribusi pada kerusakan lensa dan pembentukan katarak dengan dua cara. Pertama, radikal bebas hadir dalam asap yang menyerang mata secara langsung, berpotensi merusak protein lensa dan membran sel serat dalam lensa. Kedua, merokok mengurangi kadar antioksidan alami tubuh dan enzim katalisator lain penting untuk melindungi mata akibat pengaruh kerusakan akibat radikal bebas.⁽⁴⁹⁾ Aly (2011), mengamati perubahan protein lensa kelinci pada minggu kedua, keempat dan keenam setelah memberi paparan asap rokok 5 batang perhari, menyatakan terjadi perubahan struktur protein lensa kelinci dan indeks bias secara kuantitatif setelah terpapar asap rokok lebih dari 2 minggu.⁽⁴⁹⁾ Avunduk *et al.* (1998) menyatakan paparan asap rokok pada tikus putih *Wistar* selama 90 hari, terbukti dapat menimbulkan hiperplasia, hipertropi dan penebalan lapisan epitelia pada sel-sel epitelia anterior lensa.⁽⁵⁰⁾

3. Antioksidan

Antioksidan adalah molekul yang mengikat radikal bebas dan mencegah kerusakan jaringan yang ditimbulkannya. Sistem pertahanan antioksidan yang terdapat dalam tubuh akan melawan pengaruh oksidan. Sebagian antioksidan adalah senyawa pemberi elektron (*electron donor*), dan ada juga yang berperan menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif.⁽⁵¹⁾

Secara garis besar mekanisme kerja antioksidan dapat dibedakan berdasar jenisnya, cara kerja, sumber produksi, dan cara pemberian. Berdasarkan jenisnya, antioksidan dapat dibagi menjadi dua yaitu antioksidan enzimatis dan antioksidan non enzimatis. Antioksidan enzimatis merupakan sistem pertahanan utama (primer) terhadap kondisi stres oksidatif yang sudah diproduksi dalam tubuh manusia (SOD, Cat, GPx), bekerja dengan cara menangkap radikal bebas dan mencegah terbentuknya senyawa radikal baru. Enzim-enzim tersebut merupakan metaloenzim yang aktivitasnya sangat tergantung pada adanya ion logam.^(2, 51)

Antioksidan non enzimatis terdiri dari senyawa dengan berat molekul rendah dan disebut juga antioksidan pemecah rantai, dapat berupa senyawa nutrisi maupun non nutrisi. Kedua kelompok antioksidan non enzimatis ini disebut juga antioksidan sekunder karena dapat diperoleh dari asupan makanan, antarlain vitamin C (*ascorbate*), vitamin E (*α Tocopherol*), dan β karoten.^(4, 51)

Beberapa vitamin memiliki aktivitas antioksidan dengan melindungi sel dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas dan mencegah pembentukan radikal bebas. Studi sebelumnya menyatakan antioksidan vitamin paling berperan signifikan adalah vitamin E, A dan C.⁽⁵²⁾ Vitamin E dan vitamin A dianggap sebagai antioksidan utama yang bekerja sinergis dengan vitamin C untuk melindungi lipid terhadap kerusakan oksidatif.⁽⁵³⁾

Vitamin A sintetis diperoleh dari 2 sumber makanan, bila berasal dari produk hewani dikenal dengan istilah Retinol, dan apabila diperoleh dari produk nabati, dikenal dengan istilah β karoten. Vitamin A bertindak sebagai donor elektron yang baik tetapi merupakan akseptor elektron yang buruk dalam berinteraksi dengan radikal hidrogen peroksil, sehingga kurang efektif melindungi membran sel terhadap peroksidasi.⁽⁵⁴⁾ Vitamin A penting pada proses embriogenesis, pertumbuhan dan diferensiasi sel, fungsi penglihatan, dan reproduksi. Studi terhadap fungsi antioksidan Vitamin A menunjukkan vitamin A bermanfaat untuk proliferasi dan diferensiasi sel epitel kornea dan sel goblet konyungtiva, sehingga banyak dimanfaatkan sebagai terapi *dry eye*, *keratokonjunctivitis sicca*, mengurangi stres oksidatif dan mencegah apoptosis pada sel endotel kornea. Efek vitamin A di *ocular surface* lebih besar dari kombinasi vitamin C dan Vitamin E.⁽⁵⁵⁾

Vitamin C (asam askorbat) adalah antioksidan kuat yang larut dalam air pada manusia. Efek antioksidan vitamin C sebagai donor elektron telah dibuktikan dalam banyak percobaan in vitro. Pada konsentrasi fisiologis, vitamin C adalah penangkap radikal bebas yang kuat di plasma, melindungi sel terhadap kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh ROS. Sifat antioksidan asam askorbat dikaitkan dengan kemampuannya untuk mengurangi ROS yang berpotensi merusak, dan membentuk radikal bebas yang relatif stabil. Vitamin C juga memiliki peran tidak langsung untuk

meregenerasi antioksidan yang terikat membran lipid, dengan bersinergi kepada α *Tocopherol*.⁽⁵⁶⁾ Vitamin C dipercaya sebagai antioksidan yang berperan penting dikornea. Perbedaan dalam kadar askorbat dalam kornea hewan diduga mendukung peran penting antioksidan ini dalam melindungi mata dari stres oksidatif. Namun, studi lain tentang suplemen oral askorbat yang meningkatkan konsentrasi lensa askorbat sebesar 53% terbukti tidak melindungi mata terhadap katarak yang diinduksi UVB pada marmut.⁽⁵⁵⁾

Vitamin E merupakan antioksidan non enzimatis yang memiliki dua turunan, yaitu *Tocopherols* dan *Tocotrienols* yang terdiri dari dua cincin dengan rantai hidrokarbon. Ketika diproduksi secara sintesis akan tersusun menjadi empat turunan stereoisomer, α , β , γ , dan δ , di mana α *Tocopherol* paling banyak dalam bentuk aktif secara biologis, dan dapat memenuhi persyaratan vitamin yang cocok untuk manusia.

Vitamin E merupakan salah satu antioksidan alami, sangat dapat ditoleransi dan murah harganya. Dosis vitamin E harian yang direkomendasikan merujuk pada *Food and Drug Administration (FDA)* adalah 15 mg (22,4 IU) untuk wanita dan laki-laki dewasa (Tabel 2.2). Suplemen vitamin E 400 IU umumnya direkomendasikan untuk semua individu dengan beban oksidatif 'normal'. Penambahan 400 IU (total 800 IU) per hari disarankan untuk individu berisiko tinggi untuk serangan jantung, kanker, dan kelainan mata oksidatif. Packer merekomendasikan hingga 1.000–1.200 asupan IU vitamin E bila telah terdapat kelainan patologi, termasuk katarak. (Tabel 2)
(19, 24, 57, 58)

Fungsi protektif dari vitamin E (α TOC) pada proses katarakogenesis pada manusia dilaporkan dalam studi epidemiologi. Beberapa penelitian observasional yang telah dilakukan menyatakan hubungan signifikan antara suplemen vitamin E dan penurunan risiko pembentukan katarak. Penelitian kohort prospektif lain juga menemukan kejernihan lensa lebih tinggi pada partisipan yang mengonsumsi suplemen vitamin E.⁽¹⁹⁾

Tabel 2. Dosis Vitamin E (*α Tocopherol*) yang direkomendasikan.⁽⁵⁹⁾

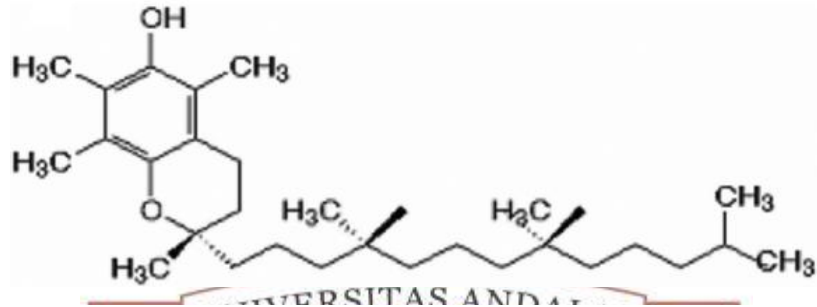
Usia	Pria	Wanita	Hamil	Menyusui
0–6 bulan	4 mg (6 IU)	4 mg (6 IU)		
7–12 bulan	5 mg (7.5 IU)	5 mg (7.5 IU)		
1–3 tahun	6 mg (9 IU)	6 mg (9 IU)		
4–8 tahun	7 mg (10.4 IU)	7 mg (10.4 IU)		
9–13 tahun	11 mg (16.4 IU)	11 mg (16.4 IU)		
14+ tahun	15 mg (22.4 IU)	15 mg (22.4 IU)	15 mg (22.4 IU)	19 mg (28.4 IU)

Tabel 3. Dosis Vitamin E (*α Tocopherol*) yang masih dapat ditoleransi.⁽⁵⁹⁾

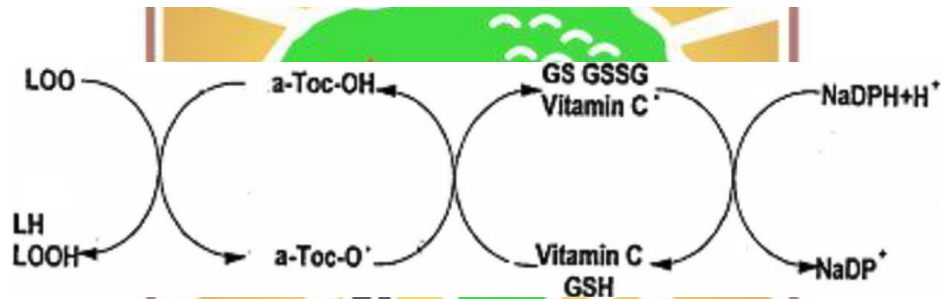
Usia	Pria	Wanita	Hamil	Menyusui
1–3 tahun	200 mg (300 IU)	200 mg (300 IU)		
4–8 tahun	300 mg (450 IU)	300 mg (450 IU)		
9–13 tahun	600 mg (900 IU)	600 mg (900 IU)		
14–18 tahun	800 mg (1,200 IU)	800 mg (1,200 IU)	800 mg (1,200 IU)	800 mg (1,200 IU)
19+ tahun	1,000 mg (1,500 IU)	1,000 mg (1,500 IU)	1,000 mg (1,500 IU)	1,000 mg (1,500 IU)

Vitamin E dalam bentuk α -TOC dianggap merupakan antioksidan yang efisien dan paling kuat untuk mencegah peroksidasi lipid lapisan PUFA, karena merupakan vitamin yang larut dalam lemak. Vitamin E dalam tubuh berbentuk molekul *liposoluble*, sehingga tidak hanya diserap dalam lumen usus namun juga tersebar di antara lipid dan protein dalam sel membran. Molekul vitamin E berperan memutuskan reaksi berantai radikal bebas dengan menangkap radikal bebas. Keunggulan lainnya yaitu α -TOC mempunyai banyak ikatan rangkap yang mudah dioksidasi sehingga akan melindungi lemak dari oksidasi. α -TOC juga dapat mencegah penyebaran radikal bebas pada membran lemak dengan menyumbangkan

hidrogen fenolatnya pada radikal bebas peroksidil dari asam lemak ganda yang telah mengalami peroksidasi. (Gambar 1 dan 2).^(8, 21, 23, 57)



Gambar 1. Struktur molekul vitamin E (α TOC), terdiri dari dua cincin benzena dan sebuah rantai hidrokarbon.⁽⁵⁷⁾



Gambar 2. Mekanisme antioksidan Vitamin E (α -TOC). (LH: Lipid molecule, LOOH: Lipid peroxide, LOO•: Lipid Peroxide radical, a-Toc-OH: α -Tocopherol, a-Toc-O•: α -Tocopherol radical, GSH: Glutathione, Vitamin C•: Vitamin C radical, GS•: Glutathione radical, GSSG: Oxidized glutathione, NADPH: Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP•: Oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate).⁽⁵⁷⁾

Farmakodinamika Vitamin E di okular pernah dilaporkan dalam sebuah penelitian yang dilakukan di mata manusia, yang menyatakan bahwa tingkat vitamin E retina lebih tinggi daripada koroid atau vitreous dan berkorelasi dengan tingkat serum vitamin E. Diketahui bahwa vitamin E hanya bisa mencapai tingkat terapeutik optimal dalam aquos humor dan lensa melalui aplikasi topikal, dan dalam retina ketika bila digunakan secara oral atau rute parenteral.⁽⁵⁷⁾ Cai *et al.* (1994) dalam studinya melaporkan bahwa defisiensi vitamin E pada tikus menyebabkan terjadinya degenerasi lensa dengan peningkatan level lipid peroksidase dan penurunan aktivitas SOD di lensa. Nagata *et al.* (1996) menunjukkan bahwa α -TOC pada lensa tikus

berusia 1 bulan tertinggi didaerah nuclear, diikuti korteks anterior, dan korteks posterior, di area equator lensa. Sementara pada tikus usia 4 sampai 12 bulan α -TOC pada lensa tikus ditemukan terbanyak dinukleus, korteks posterior, korteks anterior di area equator.^{dikutip dari kepustakaan(24)} Studi ini mengindikasikan bahwa distribusi vitamin E dilensa tikus bervariasi sesuai usia, sama dengan yang ditemukan pada manusia.

Braswell et al pada tahun 1997, melakukan studi untuk meneliti komposisi obat tetes mata antioksidan topikal, yang selanjutnya dapat juga digunakan untuk meringankan iritasi dan kekeringan pada mata. Komposisi obat yang diteliti mengandung komposisi *Gluthatione tereduksi*, Vitamin A dan Vitamin E, serta *Zinc Sulfate*, *asam borat* dan kalium sebagai *buffering agent*. Studi ini menyatakan bahwa masing-masing bahan antioksidan bekerja sama satu sama lain untuk melindungi lensa. Komposisi antioksidan, *lubricant* beserta zat *preservative* memungkinkan regenerasi siklus antioksidan dan menghindari eliminasi antioksidan yang cepat dari mata. Agar komposisi obat tetes mata dapat diterima oleh mata tanpa menyebabkan iritasi, disarankan mengandung pelumas dan pengawet isotonic, dengan pH yang sama atau serupa dengan cairan mata mamalia. Penelitian ini merekomendasikan dosis penggunaan *glutathione tereduksi* dengan konsentrasi 0,1 – 10% dari komposisi total, vitamin A dalam konsentrasi 0,01 sampai 5%, vitamin E dalam konsentrasi 0,01 sampai 10%, serta komposisi lain seperti *lubricant*, bahan pengawet, yang dapat diaplikasikan 1 hingga 8 tetes mata per hari.⁽⁶⁰⁾

Penelitian sebelumnya belum menemukan efek samping dari mengonsumsi vitamin E dalam makanan. Namun dikatakan suplemen vitamin E dosis tinggi dapat menyebabkan perdarahan dan mengganggu koagulasi darah pada hewan, dan data *in vitro* menunjukkan bahwa dosis tinggi dapat menghambat agregasi trombosit.^(19, 59)

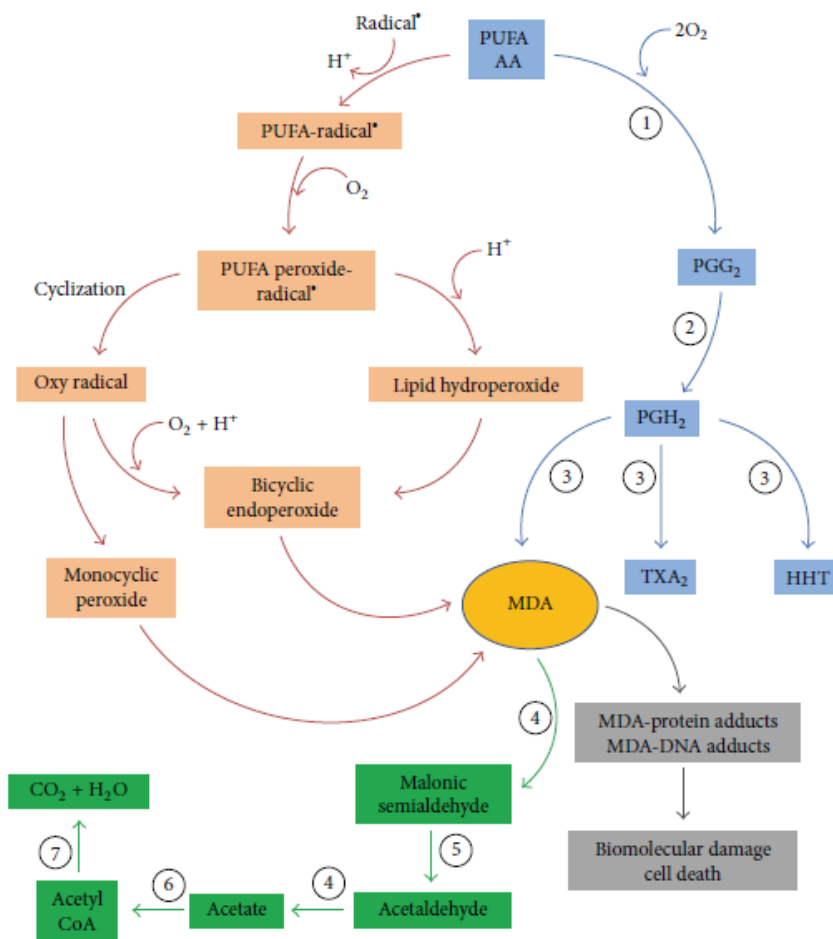
4. *Malondialdehyde* sebagai Biomarker Stres Oksidatif

Biomarker didefinisikan sebagai suatu karakteristik yang secara obyektif dapat diukur dan dievaluasi sebagai indikator normal terhadap proses biologi, patologi dan respon farmakologi terhadap intervensi terapeutik. *Malondialdehyde* merupakan salah satu produk akhir dari proses peroksidasi lipid pada membran sel

yang diinduksi oleh serangan radikal bebas oksigen, terdiri dari senyawa *aldehyde* endogen toksik dengan tiga rantai karbon, dengan rumus kimia $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$, memiliki berat molekul rendah, waktu paruh yang lebih lama dan bersifat lebih stabil dibanding dengan jenis radikal bebas lainnya sehingga memberikan hasil yang lebih akurat dan menjadi biomarker yang paling banyak digunakan sebagai indikator peroksidasi lipid.⁽⁶¹⁾

Membran sel memiliki 3 komponen penting yakni fosfolipid, glikolipid dan kolesterol. Fosfolipid dan glikolipid mengandung *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA), yang memiliki atom hidrogen reaktif yang sangat rentan terhadap serangan senyawa ROS sehingga dapat menimbulkan reaksi peroksidasi lipid berantai. Reaksi peroksidasi lipid ini terjadi karena ROS mengambil elektron dari lipid membran sel, yang akan menyebabkan degradasi lipid. Akibat akhir dari reaksi tersebut adalah terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa yang bersifat toksik terhadap sel antara lain berbagai macam senyawa *aldehyde* seperti *Malondialdehyde*, *9-hidroksi nonenal*, serta hidrokarbon seperti *etana* dan *pentana*. Senyawa ini menyebabkan gangguan permeabilitas membran sel sehingga senyawa-senyawa radikal akan semakin mudah masuk kedalam sel dan kemudian bereaksi dengan inti sel serta DNA mengakibatkan kerusakan sel. (Gambar 3)⁽¹⁶⁾





Gambar 3. Pembentukan dan metabolisme MDA.

MDA dihasilkan secara *in vivo* dengan dekomposisi asam arakidonat (AA) dan PUFA sebagai produk biosintesis *thromboxane A2 (TXA2)* dan *12-l-hydroxy-5,8,10-heptadecatrienoic acid (HHT)* (jalur biru) secara enzimatis, atau melalui proses nonenzimatis dari yang dihasilkan *endoperoxides bicyclic* selama proses peroksidasi lipid (jalur merah). Kemudian MDA dimetabolisme, dapat melalui jalur enzimatis (jalur hijau) yang melibatkan enzim *cyclooxygenases*, *prostacyclin hydroperoxidase*, sintesa tromboksan, *aldehid dehidrogenase*, *dekarboksilase*, *asetil CoA synthase*, dan siklus asam *tricarboxylic*.⁽¹⁶⁾

MDA dapat ditemukan pada banyak substansi biologis misalnya pada serum, berbagai jaringan lain, serta pada urin. Perhitungan kadar MDA pada berbagai substansi biologis tubuh digunakan sebagai alat ukur penting, sensitif dan paling sering dipakai sebagai petunjuk adanya proses peroksidasi lipid *in vitro* dan *in vivo* pada berbagai macam patogenesis penyakit. Kadar MDA yang rendah menggambarkan

proses peroksidasi lipid yang terjadi ringan dan kadar radikal bebas dalam tubuh masih rendah, begitu juga sebaliknya.⁽⁶¹⁾

Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan dasar reaksi MDA dengan asam tiobarbiturat (TBA) yang membentuk senyawa bewarna MDA-TBA₂ dan mengabsorpsi sinar dengan panjang gelombang 532-534 nm. Senyawa bewarna tersebut dapat diukur konsentrasinya berdasarkan absorbansi warna yang terbentuk, dengan membandingkan pada absorbansi warna larutan standar yang telah diketahui konsentrasinya menggunakan spektrofotometer. Alat untuk mengukur kadar MDA dalam berbagai jaringan tubuh sering digunakan metode TBAR (*Thio Barbituric Acid Reaction*). Pengukuran MDA dengan metode TBAR merupakan metode pengukuran yang paling sensitif sehingga menyebabkan metode ini menjadi metode pilihan untuk menentukan terdapatnya proses peroksidasi lipid yang merupakan indikator utama stres oksidatif. Prinsip metode TBAR adalah MDA akan bereaksi dengan TBA membentuk produk berwarna merah muda yang selanjutnya diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 586 nm. Hasil pengukuran ini menunjukkan kadar MDA pada spesimen yang diperiksa.⁽⁶²⁾

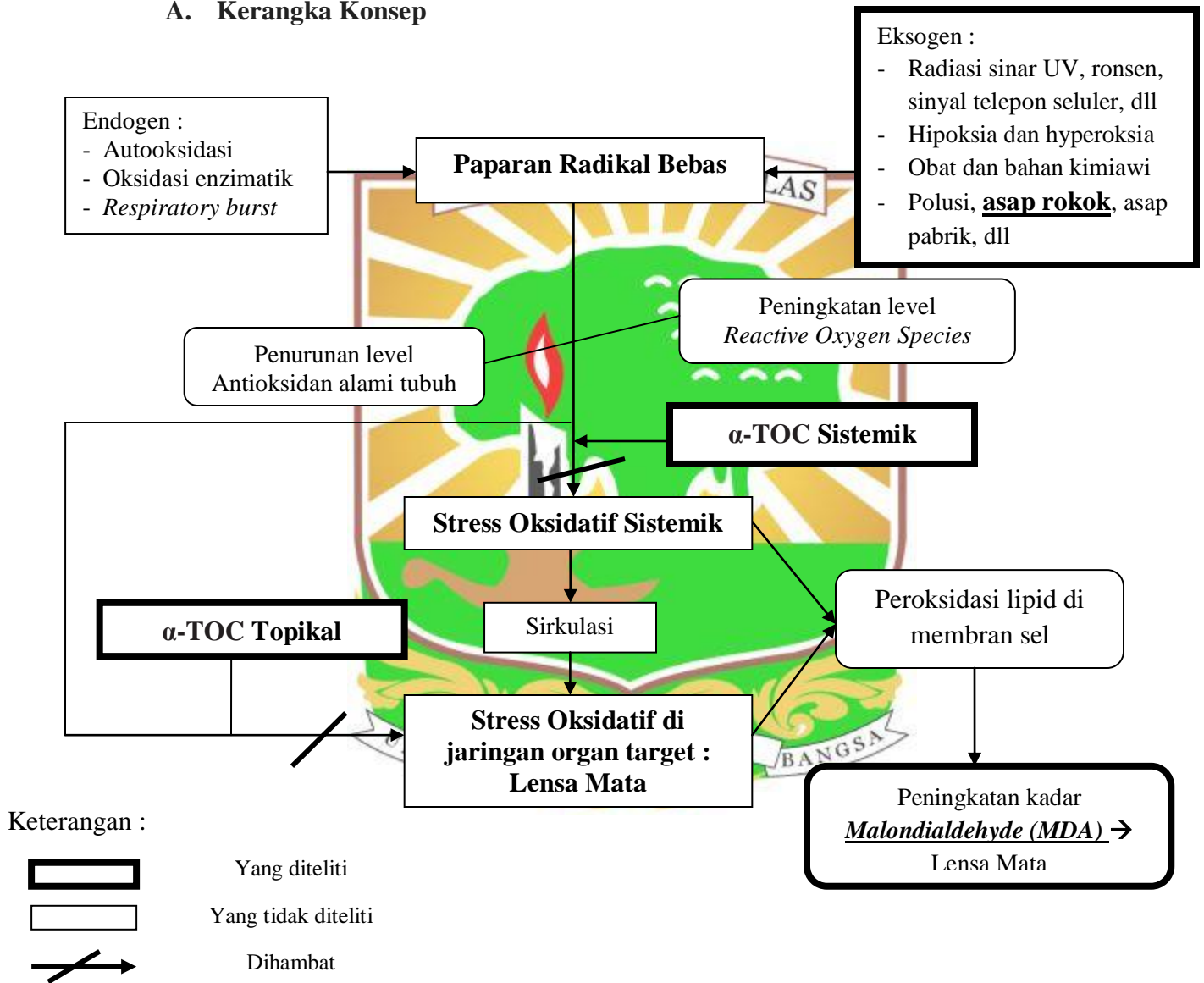


BAB III

KERANGKA KONSEP, DEFINISI OPERASIONAL, DAN

HIPOTESA

A. Kerangka Konsep



Gambar 4. Kerangka Konsep Proses Stres Oksidatif

B. Definisi Operasional

Definisi operasional variable penelitian ini adalah :

1. Vitamin E (α Tocopherol) Topikal :
 - a. Definisi : pemberian vitamin E tetes mata, yaitu *vitamin E (d- α -tocopherol)* dengan merk **Navitae**[®] (Kalbe Vision). **Navitae**[®] merupakan *lubricating ophthalmic* dengan khasiat antioksidan yang digunakan untuk mengurangi sindrom *dry eyes* serta proteksi antioksidan okular. **Navitae**[®] mengandung *hyaluronic acid* dan *carboxymethyl β -glucan* sebagai lubrikan lipofilik, Vitamin A yang berperan melindungi sel kornea dan konyungtiva, dan vitamin E (*d- α -tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate*) sebagai antioksidan, mengandung vitamin E 5% (setara dengan 5mg/ml) dalam 15 ml, diberikan pada hari pertama paparan hingga hari ke 21, diberikan dengan frekuensi 4x/hari.
 - b. Hasil Ukur : tanpa pemberian / dengan pemberian α -TOC topikal
 - c. Skala Ukur : kategorik
2. Vitamin E (α Tocopherol) Sistemik :
 - a. Definisi : pemberian vitamin E oral, yaitu *vitamin E acetate (d- α -tocopherol acetate)* dengan merk **Natur E**[®] (Darya Varia Lab). 1 kapsul lunak mengandung Natural Vitamin E (*d- α -tocopherol*) 100 IU (1 mg *α -tocopherol* setara dengan 1,5 IU). Pada penelitian ini, dosis α TOC yang digunakan untuk tikus berat badan 250 – 300 gr adalah 50 IU (33,5 mg), yang diberikan melalui sonde pada hari pertama paparan hingga hari ke 21 dengan frekuensi 1x/hari.
 - b. Hasil Ukur : tanpa pemberian / dengan pemberian α -TOC oral selama 21 hari
 - c. Skala Ukur : kategorik
3. *Malondialdehyde* (MDA)
 - a. Definisi : produk akhir peroksidasi lipid dalam lensa tikus
 - b. Cara ukur : *Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBRAS) Test*
 - c. Alat ukur : Spektrofotometer

- d. Hasil Ukur : kadar MDA lensa tikus
- e. Skala ukur : numerik

C. Hipotesis

1. Kadar MDA lensa tikus percobaan yang tidak diberi paparan asap rokok (kontrol) lebih rendah daripada yang diberi paparan asap rokok
2. Kadar MDA lensa tikus yang diberi paparan asap rokok dan antioksidan α -TOC lebih rendah daripada yang diberi paparan asap rokok tanpa antioksidan α -TOC
3. Kadar MDA lensa tikus yang diberi paparan asap rokok dan antioksidan α -TOC topikal lebih rendah daripada yang diberi paparan asap rokok dan antioksidan α -TOC sistemik



BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan suatu studi eksperimental, *posttest-only with control group design*, menggunakan objek penelitian tikus putih galur *Wistar* yang diperoleh dari laboratorium hewan Fakultas Farmasi Universitas Andalas.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fakultas Farmasi, Laboratorium Biomedik dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang, pada bulan Maret - April 2019

C. Variabel Penelitian

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian antioksidan yaitu vitamin E (α TOC) topikal dan vitamin E (α TOC) sistemik. Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar *Malondialdehyde* (MDA) lensa mata tikus.

D. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian adalah semua tikus putih galur *Wistar* dan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian dari populasi yang memenuhi kriteria inklusi dan tidak memenuhi kriteria eksklusi.



Perkiraan jumlah sampel dilakukan dengan metode penentuan jumlah hewan coba menurut standar WHO menggunakan rumus **Federer** :

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

t = kelompok perlakuan

n = jumlah sampel

Berdasarkan rumus diatas, dengan t = 4, maka didapatkan jumlah sampel pada penelitian ini sebanyak :

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

$$3 (n-1) \geq 15$$

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

$$\mathbf{n \geq 6}$$

Pada penelitian ini, jumlah sampel untuk tiap kelompok ditentukan sebanyak 6 ekor tikus, dan yang diambil untuk pemeriksaan MDA adalah lensa 1 mata. Jumlah kelompok sampel ada 4, sehingga penelitian ini total membutuhkan 24 ekor tikus dari populasi yang ada. Untuk mengantisipasi hilangnya unit eksperimen akibat *drop out*, maka dilakukan koreksi proporsi unit *drop out*. Apabila nilai perkiraan drop out dalam penelitian ini adalah 10%, maka N akhir tiap kelompok :

$$N = n / (1 - DO)$$

$$N = 6 / (1 - 10\%)$$

$$\mathbf{N = 6,66 \sim 7 \text{ ekor} \rightarrow \text{untuk 4 kelompok dibutuhkan 28 ekor tikus}}$$

Jumlah sampel total adalah 28 yang dibagi dalam 4 kelompok perlakuan, yaitu kelompok K (kontrol); kelompok P1 (mendapatkan paparan asap rokok); kelompok P2 (mendapat paparan asap rokok dan vitamin E topikal); dan kelompok P3

(mendapat paparan asap rokok dan vitamin E sistemik), masing-masing kelompok membutuhkan sampel sebanyak 7 ekor tikus.

E. Kriteria Inklusi dan Eksklusi Penelitian

1. Kriteria Inklusi

- a. Tikus putih galur *Wistar*, tidak ada perbedaan jenis kelamin
- b. Tampak sehat (aktif bergerak)
- c. Berusia 4-5 bulan
- d. Berat badan rata-rata 250-300 gram

2. Kriteria Eksklusi

- a. Kelainan anatomi pada salah satu atau kedua mata tikus

3. Kriteria Drop Out

- a. Tikus sakit dalam proses adaptasi
- b. Tikus mengalami infeksi mata
- c. Tikus mati

F. Bahan, Instrumen Penelitian dan Perhitungan Dosis Vitamin E

1. Bahan Penelitian

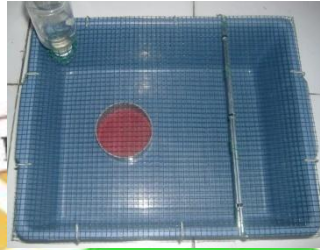
- a. Rokok *no filter* (merk *Dji Samsoe*) dengan kandungan Tar 39 mg, Nikotin 2,3 mg. Digunakan sebanyak 12 batang rokok (1 bungkus rokok) perhari.
- b. Vitamin E (α TOC) topikal : **Navitae[®] eye drops**, 1 tetes, 4x/hari
- c. Vitamin E (α TOC) sistemik dalam kemasan *softgel* : **Natur E[®]** dengan dosis 33,5 mg (50 IU)
- d. Ether
- e. Lensa mata tikus
- f. *Thiobarbituric Acid (TBA) Reagen*
- g. Aquades dan NaCl 0,9%



2. Instrumen Penelitian

a. Timbangan digital

b. Kandang pemeliharaan tikus, terbuat dari bak plastik dialas sekam atau kulit padi, ditutup kawat jaring, ukuran 40x35x10 cm. Satu kandang untuk 1 kelompok perlakuan (7 ekor tikus). (Gambar 5)



Gambar 5. Kandang pemeliharaan tikus

c. *Smoking Chamber* (kandang pengasapan), terbuat dari kawat berjaring dilapisi plastik kaca, berukuran 50x50x45cm, rokok dibakar dan asapnya dialirkan lewat bawah kandang. Satu kandang untuk 1 kelompok perlakuan.(Gambar 6)



Gambar 6. Kandang pengasapan tikus

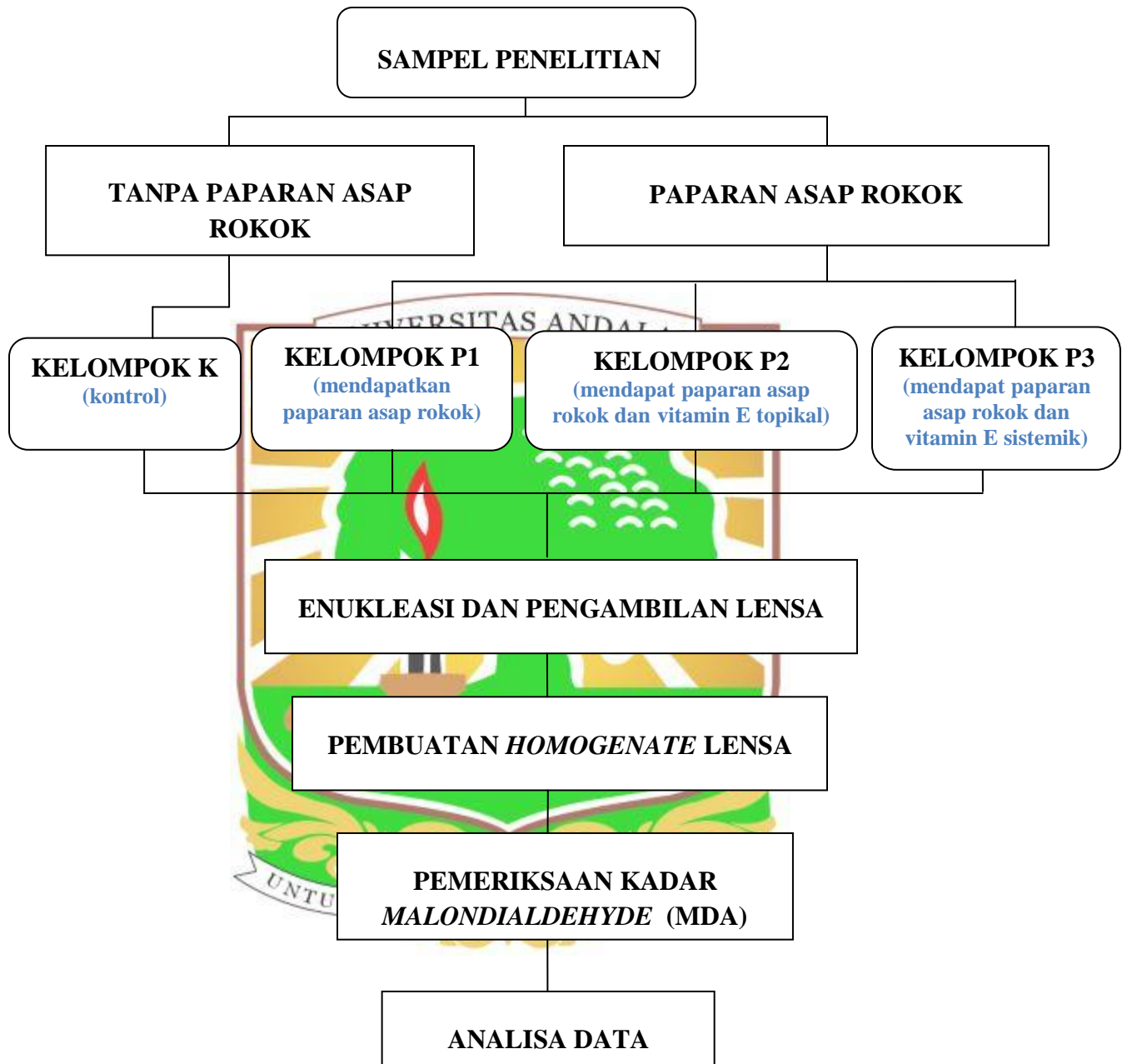
d. Sonde

e. *Loupe* dan meja operasi, alat-alat operasi : pinset, gunting, *hook*

f. *Cooler bag* dan *ice gel pack*

g. *Microtube*, *Homogenizer*, *Sentrifuge*, Spektrofotometer

G. Alur Penelitian



Gambar 6. Alur Penelitian

H. Cara Kerja dan Teknik Pengumpulan data

1. Prosedur Persiapan Tikus

- a. Tikus yang memenuhi kriteria inklusi sebanyak 28 ekor diadaptasikan dengan keadaan laboratorium selama 1 minggu. Proses adaptasi bertujuan untuk menghindari resiko timbulnya stres selama proses perlakuan, menyeragamkan pola makan ataupun pola hidup dengan lingkungan baru.
- b. Tikus dipelihara didalam kandang berukuran 40x35x10 cm dengan alas sekam atau kulit padi, diberi pakan pelet dan air minum *ad libitum*.
- c. Kesehatan tikus dipantau setiap hari sampai tikus diterminasi
- d. Selama penelitian cahaya diruangan pemeliharaan diatur agar tikus penerangan cukup, dan tidak terpapar langsung dengan sinar matahari
- e. Apabila tikus sakit, maka akan di *drop out* dan dieutanasia
- f. Setelah 1 minggu, tikus dibagi menjadi 4 kelompok secara acak.
 - 1) Kelompok K merupakan kelompok kontrol (tanpa paparan asap rokok dan tanpa terapi antioksidan vitamin E)
 - 2) Kelompok P1 mendapat paparan asap rokok
 - 3) Kelompok P2 mendapat paparan asap rokok dan antioksidan vitamin E topikal
 - 4) Kelompok P3 mendapat paparan asap rokok dan antioksidan vitamin E sistemik
- g. Pemeliharaan hewan, pemberian obat, dan tindakan bedah dilakukan di Laboratorium Fakultas Farmasi, dan pemeriksaan kadar MDA dilakukan di Laboratorium Biomedik dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Andalas

2. Perhitungan Dosis Vitamin E

Pada penelitian ini digunakan obat antioksidan vitamin E (α TOC), yang diaplikasikan melalui jalur topikal dan sistemik. Jenis obat antioksidan oral yang digunakan adalah Natur E[®] 100 IU. Dosis vitamin E yang digunakan yaitu dosis yang direkomendasikan untuk individu dengan resiko beban oksidatif normal yaitu 400 IU

(268mg). Berat badan yang digunakan sebagai pembagi merupakan rerata berat badan manusia yang digunakan untuk mendapatkan konversi *Human Equivalent Dose* (HED), yaitu 60 Kg. Sehingga jumlah HED Natur E[®] adalah :

$$\begin{aligned} \text{HED (mg/kg)} &= \text{dosis obat} / \text{berat badan HED (mg/kg)} \\ &= 268 \text{ mg} / 60 \text{ kg HED (mg/kg)} \\ &= 4,46 \text{ mg/kg} \sim \text{dibulatkan menjadi } 4,5 \text{ mg/kgBB} \end{aligned}$$

HED yang didapat dikonversikan ke *Animal Equivalent Dose* (AED) menggunakan rumus konversi *FDA draft guidelines*.⁽³⁵⁾ Dosis untuk tikus coba adalah:

$$\begin{aligned} \text{AED (mg/kg)} &= \text{HED} \times K_m \text{ ratio} \\ &= 4,5 \times 6,2 = 27,9 \text{ mg/kg} \\ \rightarrow \text{ untuk tikus BB 250 -300 gr : } &7 - 8,4 \text{ mg (10,5 - 12,5 IU)} \end{aligned}$$

Maximun Safety Dose = AED x 10

$$\rightarrow \text{ untuk tikus BB 250 -300 gr : } 70 - 84 \text{ mg (105 - 125 IU)}$$

Sediaan Natur E yang tersedia = 100 IU dalam kemasan *soft capsule*.

Dosis yang dipakai dalam penelitian ini, untuk tikus dengan berat badan 250-300 gr yang masih dapat ditoleransi : **33,5 mg (50 IU)**

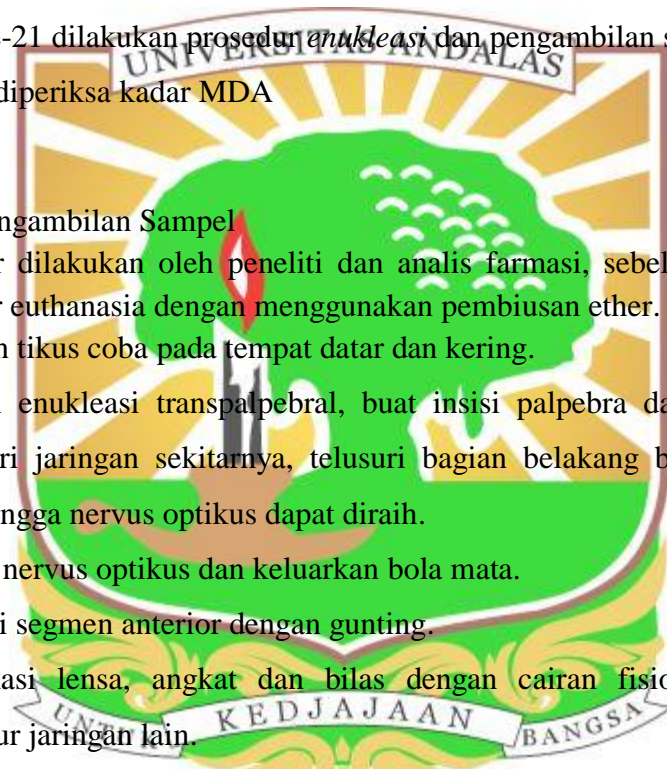
3. Perlakuan Penelitian

- a. Kelompok K ditempatkan diruangan terpisah tanpa ada paparan asap rokok
- b. Saat akan diberi paparan, kelompok P1,P2, dan P3 dimasukkan kedalam *smoking chamber* di dalam ruang paparan dan menghirup asap rokok yang berasal dari emisi hasil pembakaran batang rokok (*sidestream smoke*) yang diletakkan di bawah *smoking chamber*, bila rokok mati akan dibakar kembali untuk mengeluarkan asapnya, prosedur ini dilakukan selama 1 jam.

- c. Prosedur pemberian paparan merujuk pada penelitian **Ozkol *et al.* (2011)**.⁽⁴⁵⁾ Pemaparan asap rokok dilakukan 2 kali sehari selama \pm 1 jam, setiap kelompok diberi paparan asap rokok masing-masing 2 batang rokok pada jam 09.00 pagi dan 2 batang pada jam 15.00 WIB sore. Pemaparan dilakukan selama 21 hari.
- d. Pemberian vitamin E sistemik dilakukan pagi hari setelah prosedur paparan, pada jam 09.00 WIB dengan tujuan agar obat dimetabolisme dengan baik, dan pemberian vitamin E topikal diberikan 4 kali sehari, pada jam 09.00; 11.00; 13.00; 16.00 WIB.
- e. Pada hari ke-21 dilakukan prosedur *enukleasi* dan pengambilan sampel lensa mata tikus untuk diperiksa kadar MDA

4. Prosedur Pengambilan Sampel

- a. Prosedur dilakukan oleh peneliti dan analisis farmasi, sebelumnya dilakukan prosedur euthanasia dengan menggunakan pembiusan ether.
- b. Letakkan tikus coba pada tempat datar dan kering.
- c. Lakukan enukleasi transpalpebral, buat insisi palpebra dan bebaskan bola mata dari jaringan sekitarnya, telusuri bagian belakang bola mata dengan pinset hingga nervus optikus dapat diraih.
- d. Gunting nervus optikus dan keluarkan bola mata.
- e. Evakuasi segmen anterior dengan gunting.
- f. Identifikasi lensa, angkat dan bilas dengan cairan fisiologis agar tidak tercampur jaringan lain.
- g. Lensa mata tikus dimasukkan kedalam wadah *microtube* bertutup yang berisi cairan NaCl 0,9%, satu wadah untuk satu sampel. Sampel-sampel sementara waktu disimpan di *cooler bag* (suhu $\leq 2^{\circ}$ C) dan segera disimpan dalam freezer (suhu -20° C) menjelang dianalisis di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Andalas (FKUA) Padang.
- h. Lakukan prosedur ini pada kedua mata.



5. Analisa Data

Penyajian data dilakukan secara komputerisasi, disajikan dalam bentuk data kuantitatif untuk melihat kadar *Malondialdehyde* (MDA)

a. Analisis univariat

Analisis univariat digunakan untuk melihat distribusi data kadar *Malondialdehyde* masing-masing variabel, dan kemudian disajikan dalam bentuk tabel.

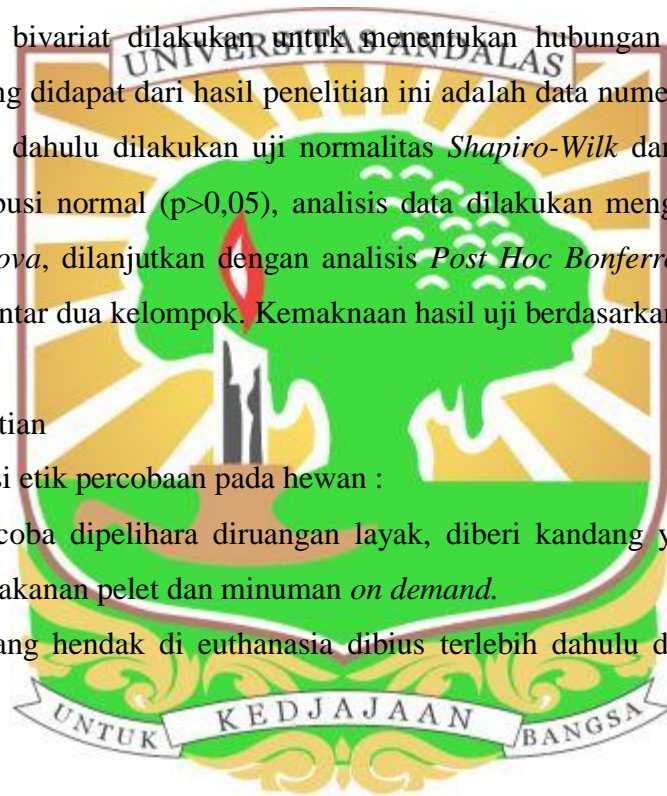
b. Analisis bivariat

Analisis bivariat dilakukan untuk menentukan hubungan dan kemaknaan. Data yang didapat dari hasil penelitian ini adalah data numerik dan kategorik. Terlebih dahulu dilakukan uji normalitas *Shapiro-Wilk* dan didapatkan data terdistribusi normal ($p > 0,05$), analisis data dilakukan menggunakan uji *One Way Anova*, dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc Bonferroni* untuk melihat variasi antar dua kelompok. Kemaknaan hasil uji berdasarkan nilai $p < 0,05$.

6. Etika Penelitian

Implikasi etik percobaan pada hewan :

- a. Hewan coba dipelihara diruangan layak, diberi kandang yang nyaman dan diberi makanan pelet dan minuman *on demand*.
- b. Tikus yang hendak di euthanasia dibius terlebih dahulu dengan pembiusan ether.



BAB V

HASIL PENELITIAN

Telah dilakukan penelitian eksperimental untuk mengetahui pengaruh pemberian vitamin E topikal dan sistemik terhadap kadar *Malondialdehyde* lensa tikus percobaan yang diberi paparan asap rokok. Penelitian dilaksanakan selama ± 1 bulan, 1 minggu untuk proses adaptasi, dan 3 minggu perlakuan penelitian, dilaksanakan dari bulan Maret sampai April 2019. Perlakuan penelitian dilakukan di Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Andalas, pembuatan *homogenate* dilakukan di Laboratorium Biomedik dan penilaian kadar MDA lensa dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang.

Dalam metode pengambilan sampel, berdasarkan perhitungan besar sampel didapatkan 28 ekor tikus yang kemudian dibagi secara acak menjadi 4 kelompok perlakuan, yaitu kelompok K adalah kelompok kontrol, kelompok P1 adalah kelompok yang mendapat paparan asap rokok, kelompok P2 adalah yang mendapat paparan asap rokok dan antioksidan topikal, dan kelompok P3 adalah yang mendapat paparan asap rokok dan antioksidan sistemik. Pada minggu terakhir perlakuan penelitian, terdapat 1 ekor hewan coba dari kelompok P3 yang *drop out* (mati), kemudian dilakukan pemilihan sampel secara acak, masing-masing kelompok diambil 6 sampel untuk untuk diperiksa kadar MDANYA dan dilakukan pengolahan data. Hasil pemeriksaan kadar MDA tercantum pada tabel 4.

Data yang diperoleh dikelompokkan dan ditabulasikan sesuai dengan karakteristik masing-masing, kemudian dianalisis sesuai dengan skala variabel untuk membandingkan dan melihat hubungan antar variabel. Tahap awal dilakukan uji normalitas data kadar MDA lensa 4 kelompok tikus coba dan karena sampel berjumlah kurang dari 50 dilakukan menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Didapatkan nilai $p > 0,05$ yang artinya sampel terdistribusi normal, dilanjutkan analisa kadar MDA lensa 4 kelompok hewan coba menggunakan uji *one way anova*, dilanjutkan analisis

multivariat *Post Hoc Bonferroni* untuk melihat variasi antar dua kelompok Hasil penelitian tercantum dalam tabel 5.2 dan 5.3.

Tabel 4. Kadar MDA Lensa Tikus Coba

Kelompok Perlakuan	Sampel No	Kadar <i>Malondialdehyde</i> (MDA) Lensa Tikus (nmol/ml)		
		Nilai	Mean	SD
K (Tanpa paparan asap rokok)	K.1	2.14	1.80	0,29
	K.2	1.78		
	K.3	2.05		
	K.4	1.34		
	K.5	1.87		
	K.6	1.60		
P1 (Paparan asap rokok)	P1.1	2.23	2.38	0.34
	P1.2	3.03		
	P1.3	2.49		
	P1.4	2.14		
	P1.5	2.23		
	P1.6	2.14		
P2 (Paparan asap rokok dan vitamin E topikal)	P2.1	2.23	2.14	0.11
	P2.2	2.14		
	P2.3	1.96		
	P2.4	2.05		
	P2.5	2.23		
	P2.6	2.23		
P3 (Paparan asap rokok dan vitamin E sistemik)	P3.1	1.96	2.06	0.17
	P3.2	1.96		
	P3.3	1.87		
	P3.4	1.78		
	P3.5	2.67		
	P3.6	2.14		

Dari tabel 4 terlihat terdapat perbedaan kadar MDA diantara 4 kelompok perlakuan, nilai rerata kadar MDA pada kelompok yang tidak mendapat paparan asap rokok (K) paling rendah dibandingkan kelompok yang mendapat paparan asap rokok (P1, P2, dan P3), sementara kelompok yang mendapat paparan asap rokok tanpa antioksidan (P1) memiliki nilai rerata kadar MDA paling tinggi.

Tabel 5. Perbandingan Kadar MDA Lensa Tikus Coba

Kelompok Perlakuan	N	Kadar MDA Lensa (nmol/ml)	P value
		Mean ± SD	
K	6	1.80 ± 0,29	0.018*
P1	6	2.38± 0.34	
P2	6	2.14 ± 0.11	
P3	6	2.06 ± 0.17	

(One Way Anova)

Keterangan : (*) menunjukkan kadar MDA kelompok perlakuan yang berbeda secara signifikan dengan nilai $p < 0,05$

Berdasarkan tabel 5, dengan uji statistik didapatkan perbedaan signifikan antara kadar MDA lensa tikus coba yang tidak diberi paparan asap rokok, yang diberi paparan asap rokok, serta yang diberi paparan asap rokok dengan perlindungan antioksidan ($p < 0,05$). Analisis lebih lanjut dilakukan dengan uji *post hoc Mann-Whitney* untuk melihat perbedaan antara 2 kelompok, dan hasilnya didapatkan perbedaan yang signifikan secara statistik antara masing-masing kelompok, kecuali pada kelompok P2 dengan P3, dan kelompok K dengan P3, didapatkan perbedaan kadar MDA yang tidak signifikan secara statistik. (Tabel 6)

Tabel 6. Uji Post Hoc Kadar MDA Lensa Tikus Coba yang tidak diberi paparan, yang diberi paparan asap rokok tanpa antioksidan dan yang diberi paparan asap rokok dengan antioksidan

Kelompok Perlakuan	Kelompok Perlakuan	P Value
K	P1	0.012*
	P2	0.023*
	P3	0.113
P1	P2	0.032*
	P3	0.020*
	K	0.012*
P2	P3	0.100
	K	0.023*
P3	P1	0.032*
	K	0.113
	P1	0.020*
	P2	0.100

(Bonferroni)

BAB VI PEMBAHASAN

Stres oksidatif terjadi ketika jumlah *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dihasilkan dalam sel melebihi kapasitas sistem detoksifikasi normal, yang menyebabkan terjadinya kerusakan seluler yang disebabkan oleh interaksi ROS dengan konstituen seluler. Penelitian-penelitian yang telah dilakukan sebelumnya telah banyak memberi bukti bahwa kerusakan oksidatif merupakan faktor utama yang memicu berkembangnya penyakit - penyakit degeneratif, diantaranya penyakit kardiovaskular, gangguan autoimun, gangguan neurodegeneratif, kanker dan juga berbagai kelainan dibidang oftalmologi. Mata merupakan jaringan sangat rentan terhadap kerusakan oksidatif. Sifat transparan kornea, aqueous humor, lensa dan retina memungkinkan paparan cahaya ultraviolet masuk, seiring proses penuaan, peradangan, dan polusi udara dapat menyebabkan peningkatan produksi ROS. Kerusakan degeneratif pada lensa diduga disebabkan oleh kerusakan oksidatif dan fisiologis yang diakibatkan reaksi fotokatalitik dari berbagai radikal oksigen, mekanisme ini juga diduga berperan penting dalam proses katarakogenesis.^(21, 63)

Vitamin E α -Tocopherol dikenal sebagai salah satu antioksidan yang berperan sebagai pemutus rantai reaksi peroksidasi lipid dengan kemampuan mengikat ROS, sehingga dapat menstabilkan membran sel. Keunggulan vitamin E dibandingkan antioksidan lain yaitu karena vitamin E merupakan antioksidan larut dalam lemak yang mampu melindungi PUFA yang banyak terdapat dipermukaan membran sel terhadap radikal bebas, selain itu vitamin E mempunyai banyak ikatan rangkap sehingga dapat menyumbangkan elektronnya untuk menstabilkan membran sel, melindungi lipid dari peroksidasi serta menghentikan penyebaran radikal bebas pada membran sel.^(18, 19, 24)

Pada penelitian ini, asap rokok digunakan untuk menginduksi terjadinya stres oksidatif pada lensa mata tikus coba dan dilakukan pemberian antioksidan vitamin E topikal dan sistemik. Kerusakan lensa akibat paparan asap rokok dan efek

perlindungan antioksidan vitamin E dinilai dari perubahan kadar *Malondialdehyde* lensa dibandingkan dengan kelompok kontrol. 28 ekor tikus coba dibagi atas 4 kelompok perlakuan, yaitu kelompok K merupakan kelompok kontrol, tidak mendapat paparan asap rokok dan antioksidan, kelompok P1 adalah kelompok yang mendapat paparan asap rokok, kelompok P2 adalah yang mendapat paparan asap rokok dan antioksidan topikal, dan kelompok P3 adalah yang mendapat paparan asap rokok dan antioksidan sistemik. Pada minggu terakhir perlakuan penelitian, terdapat 1 ekor hewan coba dari kelompok P3 yang *drop out* (mati), kemungkinan akibat prosedur penelitian, sehingga pada pengolahan data, sampel kelompok K, P1 dan P3 diambil masing-masing 6 sampel secara acak untuk pengolahan data, agar data yang diolah homogen.

Berdasarkan tabel kadar MDA lensa hewan coba pada penelitian ini terlihat pemaparan asap rokok menyebabkan peningkatan kadar MDA pada lensa tikus coba. Secara statistik terdapat perbedaan signifikan kadar MDA antara kelompok K, P1, P2, dan P3. Kelompok P1, memiliki rerata kadar MDA tertinggi dibandingkan kelompok lainnya, dan kelompok P3 memiliki rerata kadar MDA terendah. Namun dilihat dari sebaran nilai MDA yang diperoleh, data yang didapat memiliki standar deviasi (SD) serta standar error (SE) yang cukup tinggi, terutama pada kelompok kontrol (K) dan yang mendapat paparan asap (P1). Pada kelompok P1 didapat nilai SD cukup tinggi, kemungkinan hal tersebut dapat dipengaruhi prosedur perlakuan, dimana kecenderungan perilaku tikus coba yang senang berhimpitan dan tidur pada siang hari saat diberi paparan menyebabkan tidak meratanya distribusi asap yang sampai ke mata hewan sampel. Penyebab lain adalah karena pemilihan sampel secara acak dan menghomogenkan hewan coba berdasarkan usia dan berat badan tikus, sementara variasi biologi lainnya tidak ditelusuri kemungkinan juga berpengaruh terhadap besarnya nilai SD, termasuk pada kelompok kontrol, dan hal ini diantisipasi dengan pengolahan data yang dilakukan dengan *confidence interval* 95%,

Pada keadaan normal, radikal bebas terbentuk di dalam tubuh sangat lambat dan perlahan. Paparan asap rokok menyebabkan jumlah radikal bebas dilensa meningkat, saat akumulasi jumlah radikal bebas melebihi kemampuan pertahanan

endogen, terjadi ketidakseimbangan antara jumlah radikal bebas dengan antioksidan endogen, sehingga terjadilah ketidakstabilan (stres) oksidatif dilensa. Stres oksidatif menyebabkan peroksidasi lipid yang berlebihan menghasilkan produk MDA pada sel lensa, semakin tinggi kerusakan membran sel akan semakin tinggi nilai MDAny.⁽¹⁵⁾

Penelitian Ozkol *et al.* (2011), dilakukan untuk menilai efek sub akut paparan asap rokok terhadap beberapa organ tikus coba yang diberi paparan asap rokok selama 23 hari. Konsentrasi MDA dan PC (*protein concentrate*) diukur untuk menilai tingkat kerusakan lipid dan protein di beberapa jaringan tikus coba. Hasil penelitian menyatakan asap rokok menyebabkan kerusakan mekanisme pertahanan antioksidan alami di berbagai jaringan tubuh tikus coba, ditandai peningkatan signifikan level MDA dan PC terutama di otak tikus.⁽⁴⁵⁾ Aly (2011), mengamati perubahan protein lensa kelinci setelah memberi paparan asap rokok pada minggu kedua, keempat dan keenam menyatakan terjadi perubahan struktur protein lensa kelinci dan indeks bias secara kuantitatif setelah terpapar asap rokok lebih dari 2 minggu.⁽⁴⁹⁾ Avunduk *et al.* (1998) menyatakan paparan asap rokok pada tikus putih *Wistar* selama 90 hari, terbukti dapat menimbulkan hiperplasia, hipertropi dan penebalan lapisan epitelia pada sel-sel epitelia anterior lensa.⁽⁵⁰⁾ Sehingga hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa paparan asap rokok dapat menyebabkan kerusakan oksidatif dilensa.

Pada kelompok yang mendapat paparan asap rokok, yaitu kelompok P1, P2 dan P3, rerata kadar MDA kelompok yang mendapat antioksidan vitamin E (kelompok P2 dan P3) lebih rendah dibandingkan kelompok yang tidak mendapat antioksidan (P1). Rerata kadar MDA kelompok P2 (yang mendapat paparan asap rokok dan antioksidan topikal) lebih tinggi dibandingkan kelompok P3 (yang mendapat paparan asap rokok dan antioksidan sistemik), namun secara statistik perbedaan tersebut tidak signifikan. Rerata kadar MDA kelompok P3 dengan kelompok K juga menunjukkan perbedaan tidak signifikan secara statistik, sehingga dari penelitian ini disimpulkan penggunaan antioksidan vitamin E baik aplikasi topikal atau sistemik sama-sama berperan mencegah proses peroksidasi lipid di lensa tikus coba, namun antioksidan sistemik memberi perlindungan lebih baik terhadap

stress oksidatif dilensa akibat paparan asap rokok, dilihat dari rerata MDA kelompok P3 dengan kelompok K yang menunjukkan perbedaan tidak signifikan.

Hasil penelitian ini mendukung penelitian sebelumnya, yang menyatakan penggunaan antioksidan vitamin E baik sistemik dan topikal efektif untuk mencegah stres oksidatif dilensa. Penelitian yang dilakukan Seth dan Kharb (1999) yang melakukan penilaian marker stres oksidatif, yaitu MDA, GSH, GSH-Px, pada pasien katarak dengan pemberian suplementasi vitamin E 100 mg, 2 kali perhari selama 1 bulan menyimpulkan terdapat penurunan signifikan level MDA lensa pada pasien katarak yang menerima vitamin E dibanding kelompok placebo.⁽²³⁾ Kojima *et al.* (1996) melakukan studi untuk meneliti efektifitas vitamin E 5% topikal pada lensa tikus yang diinduksi katarak dengan pemberian steroid menyatakan pemberian vitamin E 5% topikal dapat menghambat perkembangan katarak yang signifikan tikus.⁽²⁵⁾ Nagata *et al.* (1999) melakukan pemberian vitamin E *acetate* 1% topikal, 5 kali sehari pada mata tikus yang diinduksi katarak dengan pemberian naftalen menemukan bahwa aplikasi vitamin E topikal bermanfaat memperlambat perkembangan katarak yang diinduksi naftalen.⁽²⁶⁾ Namun terdapat perbedaan penelitian yang dilakukan Kojima dan Nagata dengan penelitian ini, yaitu penggunaan steroid dan naftalen untuk menginduksi katarak, sehingga aplikasi topikal memberi hasil signifikan untuk mencegah kerusakan lensa, sementara penelitian ini menggunakan asap rokok yang mengganggu stabilitas *ocular surface* sehingga mengganggu penyerapan obat.

Penelitian mengenai farmakodinamika Vitamin E di okular yang sebelumnya pernah dilaporkan menyatakan bahwa vitamin E bisa mencapai tingkat terapeutik optimal dalam aquos humor dan lensa melalui aplikasi topikal, dan dalam retina ketika digunakan secara oral atau rute parenteral. Pada penelitian ini didapatkan rerata kadar MDA tikus coba yang mendapat antioksidan topikal lebih tinggi dibandingkan sistemik, walaupun hasilnya tidak signifikan secara statistik sehingga belum dapat dinyatakan bahwa penggunaan antioksidan sistemik lebih efektif untuk melindungi lensa dibanding antioksidan yang diberikan secara topikal.⁽⁶⁴⁾

Semua obat yang diaplikasikan dengan target organ okular, terlepas dari rute pemberiannya baik topikal atau sistemik, akan melewati beberapa *barrier* hingga akhirnya sampai ke organ target, bagaimana obat tersebut mampu mengatasi *barrier* tersebut berimplikasi pada keberhasilan terapi. Obat-obatan yang diberikan melalui rute sistemik, terutama yang diberikan secara oral, akan mengalami *first-pass metabolism* di hepar, di mana konsentrasi akan obat berkurang sebelum memasuki aliran darah. Setelah melewati transportasi aliran darah, obat mencapai jaringan target dimata dan berhadapan dengan *blood retina barrier*, yang terdiri dari sel-sel endotel kapiler retina dan sel-sel epitel pigmen retina. *Blood retina barrier* akan menyaring kembali aliran obat-obatan dari darah ke segmen posterior. *Barrier* pada lapisan luar, yaitu RPE, merupakan *barrier* interselular yang sulit dilewati karena struktur jaringan yang padat dan rapat. Sementara obat-obatan dapat dengan mudah memasuki koroid karena vaskularisasi koroid yang tinggi. Diperkirakan kurang dari 2% obat yang diberikan secara sistemik akan mencapai target jaringan okular setelah melewati *first-pass metabolism* dan *blood retina barrier*.^(64, 65)

Aplikasi obat secara topikal ke okular memiliki beberapa keuntungan, yaitu terhindar *first-pass metabolism* di hepar dan langsung sampai ke organ target, meskipun juga harus melewati beberapa *barrier* untuk sampainya obat ke jaringan target. Saat diaplikasikan, tidak semua obat topikal dapat masuk ke sirkulasi, konsentrasi obat yang masuk akan berkurang akibat adanya sejumlah obat yang tumpah, pengenceran konsentrasi obat, reflek mengedip dan drainase okular, serta reflek lakrimasi basal. Mata dapat menampung sekitar 10 hingga 15 μl cairan, jauh lebih kecil dari volume tetes obat topikal yang biasanya 40 μl . Ketidakseimbangan ini berakibat pada hilangnya obat pada awal penetesan karena meluap. Selanjutnya, obat yang tersisa di permukaan okular akan diencerkan oleh *tear film* di mana albumin dan protein lain dapat berikatan dengan obat, yang selanjutnya juga akan mengurangi konsentrasi obat. Dalam beberapa menit kemudian, *tear film* akan melakukan pembilasan sehingga obat serta material lain yang tidak diserap oleh kornea dan konjungtiva dialirkan ke nasolakrimal.^(64, 65)

Kornea merupakan jalur utama obat setelah menembus *tear film* ke segmen anterior. Epitel kornea sangat lipofilik, merupakan penghalang yang signifikan terhadap obat hidrofilik yang diberikan secara topikal, selain itu sel-sel epitel superfisial tersusun oleh sel yang rapat dan tebal yang memungkinkan hanya obat-obat dengan molekul kecil yang meresap secara transelular dari *tear film*. Stroma merupakan *barrier* berikutnya yang juga bersifat hidrofilik, membatasi penetrasi lebih lanjut lewatnya obat yang lipofilik. Kombinasi hambatan prekornea dan kornea menyebabkan kurang dari 5% konsentrasi obat yang diaplikasikan dapat menembus kornea dan mencapai jaringan intraokular.^(64, 65)

Konjungtiva juga memiliki *barrier*, namun ruang interselular sedikit lebih besar daripada kornea, sehingga memungkinkan penetrasi yang lebih baik oleh molekul yang lebih besar. Kapiler darah konjungtiva menurunkan bioavailabilitas obat yang dieliminasi melalui sirkulasi darah sistemik. Obat yang melewati sirkulasi konyungtiva selanjutnya akan berhadapan dengan *blood-aqueous barrier* yang tersusun dari sel-sel endotel di uvea, untuk selanjutnya mengikuti sirkulasi aliran *aqueous*.^(64, 65)

Pada penelitian ini, hewan coba diberi paparan asap rokok, kemudian dilakukan pemberian antioksidan vitamin E secara sistemik (Natur E[®]) dan antioksidan vitamin E topikal (Navitae[®]). Dibandingkan dengan aplikasi sistemik, obat yang diberikan dengan penetasan langsung semestinya menghasilkan bioavailabilitas obat yang lebih tinggi, terutama untuk organ target di ruang anterior. Namun, dari hasil penelitian ini didapatkan rerata kadar MDA tikus coba yang mendapat antioksidan topikal ternyata lebih tinggi dibandingkan sistemik. Perbedaan hasil tersebut kemungkinan dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, diantaranya paparan asap rokok yang panas menyebabkan iritasi dan trauma termis sehingga terganggunya stabilitas *ocular surface*, serta toksik asap rokok yang menyebabkan perubahan pH dan komposisi *tear film*, berdampak berkurangnya jumlah molekul obat yang dapat diikat oleh protein *tear film* sehingga menyebabkan jumlah obat yang terserap berkurang. Toksik asap rokok juga berpengaruh pada perubahan struktur kornea sebagai *barrier* utama permukaan okular, sehingga menyebabkan tidak

optimalnya jumlah obat yang diabsorpsi ke segmen anterior termasuk lensa, selain itu kondisi *dry eye* yang terjadi menyebabkan peningkatan *turns over tear films*, sehingga obat yang terbuang lebih banyak (masuk aliran nasolakrimal). Dari hasil tersebut, disimpulkan bahwa pada penelitian ini pemberian antioksidan secara topikal memiliki efek proteksi terhadap lensa, namun penggunaan antioksidan secara sistemik ternyata memberi hasil lebih baik terhadap rendahnya kadar MDA lensa tikus coba, walaupun secara statistik hasilnya tidak signifikan.

Keterbatasan penelitian ini yaitu hanya melihat pengaruh paparan asap rokok terhadap kadar MDA sebagai parameter terjadinya stres oksidatif dilensa serta manfaat pemberian antioksidan yang dilakukan pada hewan coba, yang dilakukan dengan jumlah sampel terbatas dan waktu penelitian yang singkat, sehingga mungkin belum sepenuhnya mewakili bagaimana efek asap rokok pada manusia serta pemilihan jenis antioksidan yang lebih efektif digunakan untuk mencegah kelainan okular akibat stres oksidatif. Selain itu parameter stress oksidatif lain yang mungkin juga terganggu akibat paparan asap rokok, seperti SOD, Cat, GPx, disemua jaringan okular, mulai dari *ocular surface*, *aquous humour*, hingga retina yang tidak diperiksa pada penelitian ini, selain itu sebaiknya juga dilakukan pemeriksaan sederhana status *ocular surface* dan *tear film* sebelum perlakuan untuk dapat dibandingkan dengan kondisi setelah perlakuan.



BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Rerata kadar MDA lensa hewan coba yang tidak mendapat paparan asap rokok lebih rendah daripada kadar MDA lensa hewan coba yang mendapat paparan asap rokok, mendapat paparan asap rokok dan antioksidan vitamin E topikal serta sistemik, secara statistik terdapat perbedaan bermakna.
2. Rerata kadar MDA lensa hewan coba yang mendapat paparan asap rokok dan antioksidan vitamin E baik secara topikal atau sistemik lebih rendah daripada kadar MDA lensa hewan coba yang mendapat paparan asap rokok tanpa antioksidan, secara statistik terdapat perbedaan bermakna.
3. Rerata kadar MDA lensa hewan coba yang mendapat paparan asap rokok dan antioksidan vitamin E sistemik lebih rendah daripada kadar MDA lensa hewan coba yang mendapat paparan asap rokok dan antioksidan vitamin E topikal. Menurut analisa peneliti, toksik asap rokok mempengaruhi struktur *tear films* dan kornea yang merupakan barrier utama, menyebabkan berkurangnya absorpsi obat topikal ke intra okular, tetapi secara statistik perbedaannya tidak bermakna.

B. Saran

1. Disarankan kepada pasien maupun masyarakat umum agar berperilaku hidup sehat dengan berhenti merokok, dan terlindunginya yang bukan perokok (perokok pasif) dari paparan asap rokok, sehingga dapat menunda onset terjadinya katarak dan kelainan-kelainan khususnya di mata serta organ tubuh lain akibat stress oksidatif, salahsatunya dengan pengembangan dan peningkatan kawasan tanpa asap rokok (KTR) sesuai Permenkes no 188/MENKES/PB/I/2011.

2. Disarankan kepada pasien maupun masyarakat untuk meningkatkan konsumsi makanan yang kaya antioksidan, baik dalam asupan makanan sehari-hari atau suplemen, untuk melindungi tubuh dari bahaya radikal bebas yang dihadapi setiap hari.
3. Perlunya penelitian lanjutan untuk mengetahui bagaimana efek asap rokok pada manusia khususnya jaringan okular, serta pemilihan jenis antioksidan yang lebih efektif digunakan untuk mencegah berbagai masalah okular akibat stres oksidatif.
4. Perlunya penelitian lebih lanjut untuk menilai pengaruh stres oksidatif terhadap perubahan aktivitas biomarker stres oksidatif lain, seperti SOD, Cat, GPx, disemua jaringan okular mulai dari *ocular surface*, *aquous humour*, hingga retina.



DAFTAR PUSTAKA

1. Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2000;72(2):637S-46S.
2. Guilliams TG. Free Radicals, Antioxidants And Eye Diseases. Not As Incurable As We Once Thought. *The Standard*. 1999;2(1):1-7.
3. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science*. 2008;4(2):89-96.
4. Sayuti K, Yenrina R. *Antioksidan, Alami dan Sintetik*. Padang: Andalas University Press; 2015.
5. Fletcher AE. Free Radicals, Antioxidants and Eye Diseases: Evidence from Epidemiological Studies on Cataract and Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmic Research*. 2010;44:191-8.
6. Williams DL. Oxidative Stress and the Eye. *Veterinary Clinic Small Animal Practice*. 2008;38:179-92.
7. Fitria, Triandhini R, Mangimbulude JC, Karwur FF. Merokok dan Oksidasi DNA. *Sains Medika*. 2013;5(2):113-20.
8. Oduntan O, Mashige K. A review of the role of oxidative stress in the pathogenesis of eye diseases. *The South African Optometrist* 2011;70(4):191-9.
9. DataLeads. Asia's smoking addiction. New Delhi: Asia News Network; 2017.
10. Center TCS. *Fakta Tembakau dan Permasalahannya di Indonesia*. Jakarta: TCSC AIKMI; 2014.
11. Kosen S, Hardjo H, Kadarmanto, Sinha DN, Palipudi KM, Wibisana W, et al. *Global Adult Tobacco Survey, Indonesia Report 2011*. Kosen S, editor. Jakarta: World Health Organization; 2012.
12. Riskesdas. *Riset Kesehatan Dasar*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2013.
13. Riskesdas. *Riset Kesehatan Dasar*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2018.
14. McCarty CA, Nanjan MB, Taylor HR. Attributable risk estimates for cataract to prioritize medical and public health action. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2000;41(12):3720-5.
15. Sulochana KN, Punitham R, Ramakrishnan S. Effect of Cigarette Smoking on Cataract : Antioxidant Enzymes and Constituent minerals in the Lens and Blood of Humans. *Indian Journal of Pharmacology* 2002;34:428-231.
16. Ayala A, F.Muñoz M, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Hindawi Publishing Corporation*. 2014;214:1-31.
17. Kyselova Z. Different experimental approaches in modelling cataractogenesis: An overview of selenite-induced nuclear cataract in rats. *Interdisciplinary toxicology*. 2010;3(1):3-14.
18. Dilsiz N, Olcucu A, Cay M, Naziroglu M, Cobanoglu D. Protective effects of selenium, vitamin C and vitamin E against oxidative stress of cigarette smoke in rats. *Cell biochemistry and function*. 1999;17(1):1-7.
19. Health NIO. *Vitamin E*. US Department of Health and Human Service. 2018.
20. Christen WG, Glynn RJ, Sesso HD, Kurth T, MacFadyen J, Bubes V, et al. Age-related Cataract in a Randomized Trial of Vitamins E and C in Men. *Arch Ophthalmology*. 2010 128(11):1397-405.

21. Xin J, Tang J, Bu M, Sun Y, Wang X, Wu L, et al. A novel eye drop of alpha tocopherol to prevent ocular oxidant damage: improve the stability and ocular efficacy. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2015;1-10.
22. Rocksén D, Ekstrand-Hammarström B, Johansson L, Bucht A. Vitamin E reduces transendothelial migration of neutrophils and prevents lung injury in endotoxin-induced airway inflammation. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2003;28(2):199-207.
23. Seth RK, Kharb S. Protective Function of Alpha-Tocopherol against the Process of Cataractogenesis in Humans. *Ann Nutr Metab*. 1999;43:286-9.
24. Ohta Y. Possibility of Clinical Application of Vitamin E to Cataract Prevention. *Journal Clinical Biochemia Nutritional*. 2004;35(1):35-45.
25. Kojima M, Shui YB, Murano H, Sasaki K. Inhibition of Steroid Induced Cataract in Rat Eyes by Administration of Vitamin E Ophthalmic Solution. *Ophthalmic Research*. 1996;28(2):64-71.
26. Nagata M, Kojima M, Sasaki K. Effect of Vitamin E Eye Drops on Naphthalene-Induced Cataract in Rats. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 1999;15(4):345-50.
27. Cantor LB, Rapuano CJ, Cioffi GA. *Embryology and Developmental Defect. Lens and Cataract*. 11. San Francisco: American Academy of Ophthalmology; 2016-2017. p. 38-40.
28. Li Y, Ding Y. Embryonic Development of the Human Lens. In: Liu Y, editor. *Pediatric Lens Diseases*. Singapore: Springer 2017. p. 1-9.
29. Ansari MW, Nadeem A. The Lens. 2016. In: *Atlas of Ocular Anatomy* [Internet]. Switzerland: Springer; [68-70].
30. Cantor LB, Rapuano CJ, Cioffi GA. *The Eye. Fundamental and Principles of Ophthalmology*. 2. San Francisco: American Academy of Ophthalmology; 2016-2017. p. 61-4.
31. Chen W, Tan X, Chen X. Anatomy and Physiology of the Crystalline Lens. In: Liu Y, editor. *Pediatric Lens Diseases*. Singapore: Springer; 2017. p. 21-8.
32. Cekić S, Zlatanović G, Cvetković T, Petrović B. Oxidative Stress in Cataractogenesis. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. 2010;10(3):265-9.
33. West-Mays J, Bowman S. *Animal Models of Cataracts. Essentials in Ophthalmology*. Switzerland Springer 2016. p. 11-29.
34. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *International Journal of Preventive Medicine* 2013;4(6):624-30.
35. Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of basic and clinical pharmacy*. 2016;7(2):27-31.
36. FDA. *Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers* US Department of Health and Human Services. 2005:19.
37. Vinson JA. *Oxidative Stress in Cataracts*. Elsevier. 2006;13:151-62.
38. Susanna D, Hartono B, Fauzan H. Penentuan Kadar Nikotin Dalam Asap Rokok. *Makara Kesehatan*. 2003;7(2).
39. Haris A, Ikhsan M, Rogayah R. Asap Rokok sebagai Bahan Pencemar dalam Ruangan. *Cermin Dunia Kedokteran* 2012;39(1).
40. Jallow IK, Britton J, Langley T. Prevalence and factors associated with exposure to secondhand smoke (SHS) among young people: a cross-sectional study from the Gambia. *BMJ Open*. 2018:1-7.

41. Kusuma DA, Yuwono SS, Wulan SN. Studi Kadar Nikotin dan Tar Sembilan Merk Rokok Kretek Filter yang Beredar di Wilayah Kabupaten Nganjuk. *Jurnal Teknologi Pertanian*. 2006;5(3):151-5.
42. Bradbury S. Reregistration Eligibility Decision for Nicotine: United States Environmental Prevention Agency; 2008.
43. Van der Vaart H, Postma DS, Timens W, Ten Hacken NHT. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax*. 2004;59(8):713.
44. Benowitz NL. Nicotine addiction. *The New England journal of medicine*. 2010;362(24):2295-303.
45. Özkol H, Tülüce Y, Koyuncu I. Subacute effect of cigarette smoke exposure in rats: Protection by pot marigold (*Calendula officinalis* L.) extract 2011. 3-9 p.
46. Adytia A, Untari EK, Wahdaningsih S. Efek Ekstrak Etanol Daun *Premna cordifolia* terhadap Malondialdehid Tikus yang Dipapar Asap Rokok. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*. 2016;1(2):35-42.
47. Agrawal N, Jharawal M, Paharia N, Bansal K. Effect of smoking on ocular surface and tear film: A clinico- pathological study. *Advances in Ophthalmology & Visual System* 2018;8(6):241-4.
48. Kusumawardani A, Sarwendah K, Rahmad L, Millah NU, Herliyani N, Sutrisno B, et al. Sitotoksik Asap Rokok pada Kornea Tikus Putih Wistar yang Diberi Ekstrak Kunyit (*Curcuma Domestica* Val.) *Jurnal Sains Veteriner*. 2013;31(1):89-99.
49. Aly E, S Elabrak E. Lens Protein Changes Associated With Cigarette Smoking. *Life Science Journal*. 2011;8:553-8.
50. Avunduk AM, Yardimci S, Avunduk MC, Kurnaz L, din AA, Kogkar MC, et al. Prevention of Lens Damage Associated with Cigarette Smoke Exposure in Rats by aTocopherol (Vitamin E) Treatment. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 1994;4(2):537-41.
51. Yadav A, Kumari R, Yadav A, Mishra JP, Srivatva S, Prabha S. Antioxidants and its functions in human body - A Review. *Research in Environment and Life Sciences*. 2016;9(11):1328-30.
52. Zhang P, Omaye ST. beta-Carotene: interactions with alpha-tocopherol and ascorbic acid in microsomal lipid peroxidation. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2001;12(1):38-45.
53. Tuna Keleştemur G. The Antioxidant Vitamin (A, C, E) and the Lipid Peroxidation Levels in Some Tissues of Juvenile Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W. 1792) at Different Oxygen Levels. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 2012;11(2):315-24.
54. Dao DQ, Ngo TC, Thong NM, Nam PC. Is Vitamin A an Antioxidant or a Pro-oxidant? *The journal of physical chemistry B*. 2017;121(40):9348-57.
55. Chen Y, Mehta G, Vasiliou V. Antioxidant defenses in the ocular surface. *The ocular surface*. 2009;7(4):176-85.
56. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, et al. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition*. 2003;22(1):18-35.
57. Engin KN. Alpha-tocopherol: looking beyond an antioxidant. *Molecular Vision*. 2009;15:855-60.
58. Ribeiroa A, Sandez I, B M, Casas M, Alvarez-Pérez S, Lorenzosa CA, et al. Poloxamine micellar solubilization of -tocopherol for topical ocular treatment. *Elsevier*. 2013;103:550-7.

59. Medicine Io. Dietary Reference Intakes: Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoid. In: Compounds PoDAaR, editor. Washington, DC: National Academy Press; 2000.
60. Braswell G. Liquid eye drop composition. <https://patents.google.com/patent/US6194457.1997>.
61. Singh Z, Karthigesu IP, Singh P, Kaur R. Use of Malondialdehyde as a Biomarker for Assessing Oxidative Stress in Different Disease Pathologies: a Review. *Iranian Journal Public Health*. 2014;43(3):7-16.
62. Lykkesfeldt J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clinica Chimica Acta* 2007 380:50-8.
63. Manikandan R, Thiagarajan R, Beulaja S, Sudhandiran G, Arumugam M. Effect of Curcumin on Selenite-Induced Cataractogenesis in Wistar Rat Pups. *Current Eye Research*. 2010;35(2):122-9.
64. Abelson MB. *The Hows and Whys of Pharmacokinetics*. Review of Ophthalmology. 2015.
65. Chader GJ, Thassu D. *Ocular Drug Delivery Systems*. In: Thassu D, Chader GJ, editors. Taylor & Francis Group. New York: Taylor & Francis Group; 2013. p. 18-38.

