

KEMAMPUAN SENYAWA LUTEIN DARI DAUN BAYAM (*Amaranthus sp*) UNTUK MENETRALISIR OKSIDAN *t*-BHP DALAM SEL DARAH

Kusmiati

Pusat Penelitian Bioteknologi- LIPI

Jl. Raya Bogor Km 46, Cibinong Bogor 16911 Telp.021-8754587 Fax.021-8754588

Email: Kusmiati02@yahoo.com

ABSTRAK

Salah satu sumber senyawa lutein berasal dari sayuran hijau seperti bayam. Kandungan lutein pada daun bayam dilaporkan sekitar 6,6 mg per 100 gram berat basah. Senyawa lutein merupakan pigmen yang tergolong xantofil bersifat larut dalam lemak. Fungsi utama lutein yaitu merupakan karotenoid yang bertanggung jawab untuk kesehatan makular retina mata. Manfaat lainnya sebagai antioksidan, antikolesterol, antitumor dan anti penuaan dini. Penelitian ini menguji potensi antioksidan lutein yang diekstraksi dari dua jenis daun bayam yaitu bayam hijau dan bayam merah untuk menetralkan kerja oksidan *tert* butil hidroksiperoksida (*t*-BHP) pada sel darah domba. Lutein diuji pada konsentrasi: 4, 6, 8 dan 10 µg/ml pada sel darah merah yang teroksidasi *t*-BHP 5mM. Perlakuan dibandingkan terhadap antioksidan Vitamin E 4µg/ml sebagai kontrol positif. Hasil menunjukkan bahwa perlakuan lutein dari bayam pada konsentrasi 6µg/ml dapat menurunkan kadar malonaldehid (MDA) paling tinggi sebesar 13,8 nmol/ml (bayam hijau) dan 13,44 nmol/ml (bayam merah). Aktifitas enzim superoksida dismutase (SOD) pada darah yang teroksidasi *t*-BHP mengalami peningkatan terbesar pada pemberian lutein bayam hijau konsentrasi 8µg/ml yaitu 1,7U/ml dan bayam merah 6µg/ml sebesar 1,74U/ml, sedangkan peningkatan aktifitas enzim katalase tertinggi dicapai pada perlakuan konsentrasi lutein 10µg/ml sebesar 264,43U/ml (bayam hijau) dan 213,275U/ml (bayam merah).

Kata Kunci: Lutein, daun Bayam, *t*-BHP, MDA, SOD, katalase

PENDAHULUAN

Lutein merupakan senyawa karotenoid yang diperlukan tubuh. Untuk memenuhi kebutuhan dapat melalui asupan makanan karena tubuh tidak dapat mensintesis senyawa lutein. Lutein dalam tubuh terakumulasi di makula retina dan bertanggung jawab untuk melindungi mata dari sinar biru. Lutein berfungsi sebagai antioksidan yang dapat mencegah perkembangan penyakit katarak dan penyakit-penyakit degeneratif yang berkaitan dengan pertambahan usia.

Salah satu sumber lutein yaitu tanaman bayam yang mengandung nilai gizi yang tinggi untuk kesehatan. Kandungan lutein dalam Bayam sebesar 6,6 mg per 100 gr bayam mentah (Thorne, 2005). Dilaporkan bahwa mengkonsumsi lutein 6–20mg lutein dapat mencegah terjadinya katarak pada mata yang diakibatkan oleh kerusakan oksidatif (Mozaffarieh, 2003; Madhavi, 2002) Penelitian ini melaporkan potensi antioksidan senyawa lutein yang terkandung dalam daun bayam, yang diuji terhadap sel darah yang terpapar oksidan *tert* butil hidroperoksida (*t*BHP). Senyawa lutein hasil ekstraksi dari dua jenis bayam yaitu bayam hijau (*Amaranthus hybridus* L.) dan bayam merah (*Amaranthus tricolor* L.) dibandingkan aktifitas antioksidan. Pengujian dilakukan dalam dosis yang bervariasi untuk memperoleh konsentrasi optimum dalam menetralkan radikal bebas akibat perlakuan *t*BHP. Pengukuran potensi antioksidan dilakukan terhadap kadar malonaldehid, aktifitas enzim superoksida dismutase dan enzim katalase dalam sel darah. Hasil ini akan memberikan informasi tambahan mengenai manfaat daun bayam.

METODE PENELITIAN

Ekstraksi lutein daun bayam (*Amaranthus spp.*) (Thorne, 2005)

Daun bayam hijau (*Amaranthus hybridus* L.) dan bayam merah (*Amaranthus tricolor* L.) suku *Amaranthaceae* kering dibuat serbuk. Sebanyak 3 gram serbuk daun bayam dimaserasi dengan *n*-heksana selama 24 jam. Filtrat dipisahkan dengan disentrifus dan diuapkan. Ekstrak didigesti dengan isopropanol dan disaponifikasi dengan NaOH 50% pada suhu 60°C, selama 90 menit, kemudian ditambahkan KOH jenuh aduk sampai terbentuk masa semisolid. ditambahkan akuades sebanyak 4 kali volume larutan diaduk selama 4 jam. Ekstrak disentrifus, endapan yang terbentuk dicuci 3 kali dan dikeringkan pada suhu 40°C, sehingga diperoleh ekstrak lutein kering.

Uji Aktifitas Antioksidan

Persiapan substrat darah (Fransworth, 1996)

Sejumlah 10 ml darah domba disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 5°C selama 5 menit untuk memisahkan antara lapisan plasma yang digunakan untuk kadar MDA dan sel darah untuk pengukuran aktifitas enzim SOD dan katalase. Lapisan sel darah dicuci menggunakan larutan *phosphate buffer saline* (PBS) kemudian di sentrifus dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 5°C selama 5 menit.



Pembuatan Larutan uji

Larutan uji ekstrak lutein dari daun bayam dibuat dengan konsentrasi 4,0 µg/ml; 6,0 µg/ml; 8,0 µg/ml; 10,0 µg/ml. Larutan vitamin E 100IU dibuat 4,0µg/ml sebagai kontrol positif. Larutan *t*-BHP 5 mM sebagai kontrol negatif.

Kelompok Perlakuan

Percobaan dibagi menjadi 7 kelompok yaitu Kelompok I, kontrol normal (darah domba tanpa penambahan larutan *t*-BHP dan tanpa lutein); Kelompok II, kontrol negatif (darah domba +5 mM *t*-BHP); Kelompok III, kontrol positif (darah domba +5mM *t*-BHP + Vit E 4,0µg/ml); Kelompok IV, kelompok uji (darah domba + 5mM *t*-BHP+ lutein 4,0µg/ml); Kelompok V, kelompok uji (darah domba +5mM *t*-BHP + lutein 6,0µg/ml); Kelompok VI, kelompok uji (darah domba + 5mM *t*-BHP + lutein 8,0 µg/ml); Kelompok VII, kelompok uji (darah domba + 5mM *t*-BHP + lutein 10,0 µg/ml).

Penentuan Kadar Malondialdehida (MDA) (Fransworth, 1996)

Pembuatan kurva baku

Sebanyak 10,0; 20,0; 40,0; 60,0; dan 80,0µl larutan TEP (1:80000) dipipet, kemudian ditambahkan akuades hingga 250µl. Blanko menggunakan akuades. Masing-masing tabung reaksi ditambah 1,25 ml asam trikloroasetat (TCA) 20% dan 0,5ml asam tiobarbiturat (TBA) 0,67%, kemudian dihomogenkan. Campuran dididihkan selama 30 menit dan didinginkan. Larutan diukur serapannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 532 nm. Masing-masing kadar larutan baku TEP dan serapannya diplot sebagai kurva baku TEP dan kemudian dihitung persamaan garis regresi. $Y=a + bX$

Dengan koefisien korelasi (*r*) untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi dan serapan baku perbandingan.

Kadar MDA (Fransworth, 1996)

Sejumlah 1,0 ml plasma darah ditambahkan 1,0 ml larutan uji, kemudian diinkubasikan pada suhu ruang selama 15 menit, larutan tersebut ditambah larutan *t*-BHP dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 15 menit, kemudian disentrifus Selama 5 menit dengan kecepatan 3000 *rpm*.

Supernatan hasil sentrifus ditambah asam trikloro asetat (TCA) 20% dan asam tiobarbiturat (TBA) 0,67 % kemudian dihomogenkan. Campuran dididihkan selama 30 menit dan segera didinginkan. Larutan diukur serapannya pada panjang gelombang 532 nm. Kadar MDA dihitung menggunakan persamaan garis regresi kurva baku tetraetoksipropan (TEP).

Penentuan Aktifitas Enzim Superdioksida Dismutase (SOD) (Tüközkan *et al.* 2006)

Blanko dalam analisis ini adalah campuran 2900 µl dapar karbonat pH 10,2; 50 µl akuades, 50 µl epinephrine 0,02 M, kemudian serapan larutan diukur setelah menit ke 1, 2, 3, dan 4 pada panjang gelombang 480 nm dengan suhu 30⁰C.

Sejumlah 1,0 mL sel darah merah domba ditambahkan 1,0 ml larutan uji, kemudian diinkubasikan pada suhu ruang selama 15 menit. Larutan tersebut ditambah *t*-BHP dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit, kemudian disentrifus. Sebanyak 1,0 ml supernatan hasil sentrifus diencerkan dengan 7,0 ml akuades. Sejumlah 1,0 ml supernatan encer diekstraksi dengan 1,0 ml campuran kloroform-etanol 96% (3:5), kemudian dikocok dengan kecepatan 2500 *rpm* selama 10 menit. Sejumlah 50 µl fase air dicampur dengan 2900 µl dapar karbonat pH 10,2 dan 50 µl epinephrine 0,02 M dalam kuvet. Serapan larutan diukur setelah menit 1, 2, 3, dan 4 pada panjang gelombang 480 nm dengan suhu 30⁰C.

Penentuan Aktifitas Enzim Katalase (Mayes & Granner, 1988).

Sejumlah 1,0 ml sel darah merah domba ditambahkan 1,0 ml larutan uji, kemudian diinkubasikan pada suhu ruang selama 15 menit. Larutan ditambah *t*-BHP dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit kemudian ditambah 2,0 mL akuades. Larutan disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 3000 *rpm*. Sejumlah 100µl supernatan hasil sentrifus ditambah 1,0 ml H₂O₂ 0,059 M dan 1,9 ml dapar fosfat 0,05 M pH 7, kemudian diukur serapan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 240 nm selama 4 menit.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan daun bayam merah (*Amaranthus hybridus* L.) dan daun bayam hijau (*Amaranthus tricolor* L.) karena tanaman bayam mengandung komponen pigmen karotenoid, terutama



senyawa lutein. Di dalam tubuh lutein terakumulasi pada retina mata yang berfungsi menghambat kerusakan oksidatif akibat adanya sinar biru yang masuk kedalam mata (Muselik, 2007; Dalimantha, 1981).

Penapisan Fitokimia.

Hasil penapisan fitokimia terhadap serbuk daun bayam (*Amaranthus* sp) menunjukkan bahwa terkandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, glikosida dan steroid/triterpenoid, sedangkan uji fenolik dinyatakan negatif. Hasil tercantum pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil penapisan fitokimia serbuk daun bayam (*Amaranthus* sp)

No	Golongan senyawa metabolit sekunder	Serbuk daun bayam
1.	Alkaloid	+
2.	Flavanoid	+
3.	Saponin	+
4.	Tanin	+
5.	Glikosida	+
6.	Fenolik	-
7.	Steroid/triterpenoid	+

Keterangan: + menunjukkan adanya senyawa yang diuji

- menunjukkan tidak adanya senyawa yang diuji

Uji Aktifitas Antioksidan.

Pada penelitian ini konsentrasi lutein daun bayam divariasikan yaitu 4,0 µg/ml; 6 µg/ml; 8 µg/ml; dan 10 µg/ml. Dosis tersebut digunakan berdasarkan penggunaan lutein sebagai suplemen tubuh sebesar 20 mg yang dikonversi terhadap jumlah total darah manusia sebesar 5000-6000 ml. Dosis lutein yang bervariasi digunakan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap kadar MDA, aktifitas enzim SOD dan katalase sel darah yang telah diinduksi dengan oksidan *t*-BHP (Mozaffarieh, 2003; Thibodeau & abbattista, 2008)

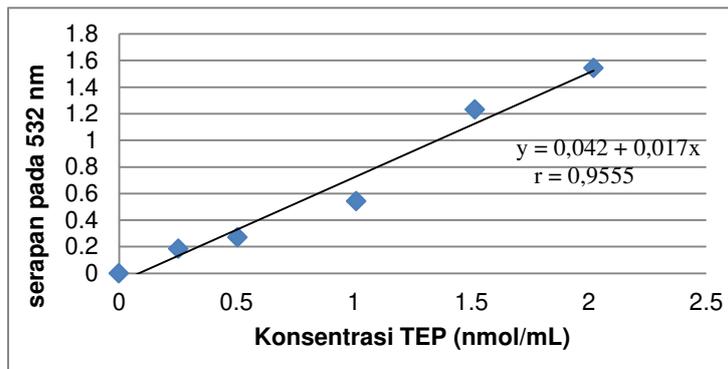
Dalam penelitian ini dipilih *t*-BHP sebagai oksidator karena senyawa ini sebagai peroksida organik, yang mudah terurai dan dalam reaksi tersebut membentuk radikal bebas *t*-butoksi (*t*-BuO[•]), yang sangat cepat bereaksi dengan asam lemak tak jenuh ganda di membran sel darah sehingga terjadi peroksida lipid pada membran sel. Peroksida lipid yang terbentuk akan menyebabkan rusaknya struktur membran dan berakibat menurunnya fluiditas membran. Penggunaan dosis oksidan *t*-BHP sebesar 5mM dapat menyebabkan granulosit sel. Percobaan *in vitro* dipilih dengan pertimbangan bahwa model *in vitro* dapat menghilangkan pengaruh metabolisme xenobiotik oleh hati, karena dilakukan tidak di dalam tubuh. Metabolisme xenobiotik adalah proses masuknya zat kimia ke dalam tubuh yang menyebabkan toksik. Metabolisme tersebut dapat terjadi bila pada sel darah terdapat organel termasuk mikrosom Darah yang digunakan dalam percobaan ini darah domba dipilih karena mempunyai perangkat metabolisme terbatas, tidak mempunyai organel, termasuk mikrosom yang diperlukan untuk metabolisme xenobiotik sehingga diperkirakan tidak mampu melakukan metabolisme xenobiotik (Thibodeau & abbattista, 2008; Handayani, 2008).

Kadar MDA.

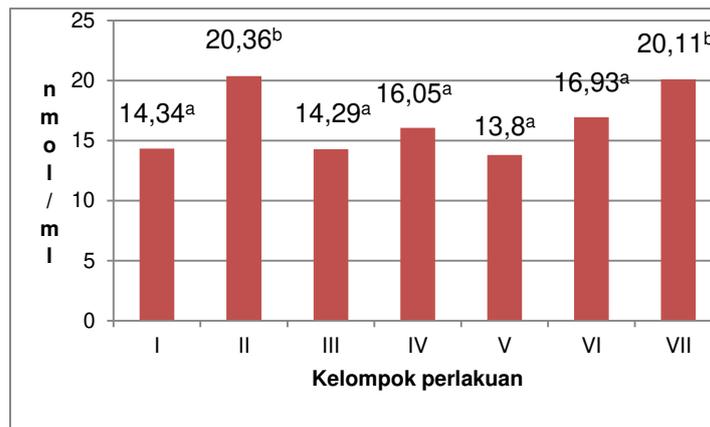
Tubuh yang terpapar radikal bebas menyebabkan terbentuknya peroksidasi lipid, produk akhir dari reaksi ini berupa malondialdehid (MDA), tingginya kadar MDA dalam plasma menunjukkan kadar radikal bebas dalam tubuh yang tinggi (Winasar, 2007). Pengukuran lipid peroksidasi dapat dilakukan secara tidak langsung dengan mengukur kadar MDA menggunakan metode *TBARS* yang diukur dengan spektrofotometer pada λ 532 nm.

Hasil percobaan menunjukkan hubungan konsentrasi larutan baku TEP (nmol/ml) terhadap serapan memberikan nilai korelasi (r) 0,9555 (Gambar 1). Hasil pengukuran kadar MDA dalam plasma dengan perlakuan lutein bayam hijau (Gambar 2) menunjukkan bahwa kelompok perlakuan III (penambahan vitamin E), IV, V dan VI ((lutein 4, 6 dan 8 µg/ml) tidak berbeda nyata terhadap kadar MDA kelompok I (normal) dan terdapat perbedaan nyata terhadap kelompok II (perlakuan *t*-BHP tanpa antioksidan). Perlakuan induksi *t*-BHP pada sel darah pada kelompok II (kontrol negatif) menyebabkan peningkatan pembentukan lipid peroksidasi yang mengakibatkan hasil produksi metabolisme akhir berupa malondialdehida meningkat dibandingkan dengan kelompok normal.

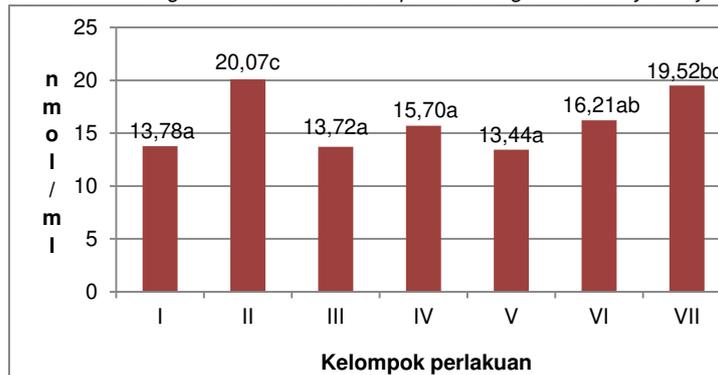




Gambar 1. Kurva hubungan konsentrasi TEP (nmol/ml) dengan serapan pada λ 532 nm.



Gambar 2. Histogram kadar MDA dalam plasma dengan lutein bayam hijau



Gambar 3. Histogram kadar MDA dalam plasma dengan lutein bayam merah

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama pada gambar menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata.

Hasil pada Gambar 3 menunjukkan kadar MDA kelompok perlakuan III, IV, V, dan VI tidak berbeda nyata terhadap kelompok I (normal) dan berbeda nyata terhadap kelompok II. Pemberian lutein daun bayam serta vitamin E dapat menghambat terjadinya oksidasi dari *t*-BHP yang mengurangi reaksi radikal bebas, sehingga menekan pembentukan malondialdehida. Hal ini disebabkan lutein daun bayam memiliki aktifitas antioksidan yang mampu menghambat terjadinya peroksidasi lipid sehingga kadar MDA yang terbentuk tertekan. Dosis lutein daun bayam hijau dan bayam merah yang paling baik menurunkan kadar MDA yaitu dosis 6,0 μ g/ml.

Aktifitas Superoksida dismutase (SOD).

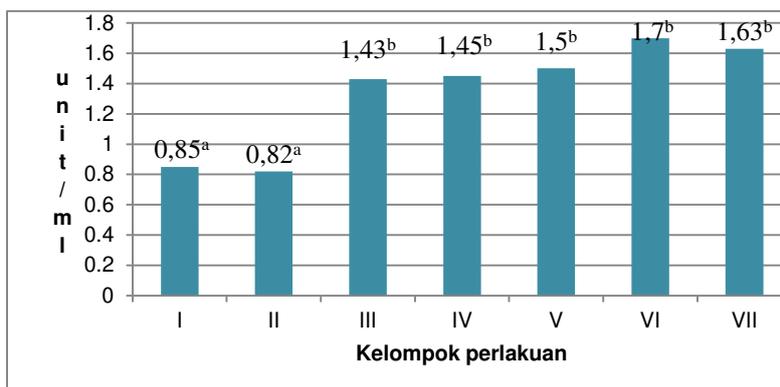
Enzim superoksida dismutase (SOD) memiliki peran penting dalam sistem pertahanan tubuh, terutama terhadap aktifitas senyawa oksigen reaktif yang dapat menimbulkan stres oksidatif. Uji aktifitas



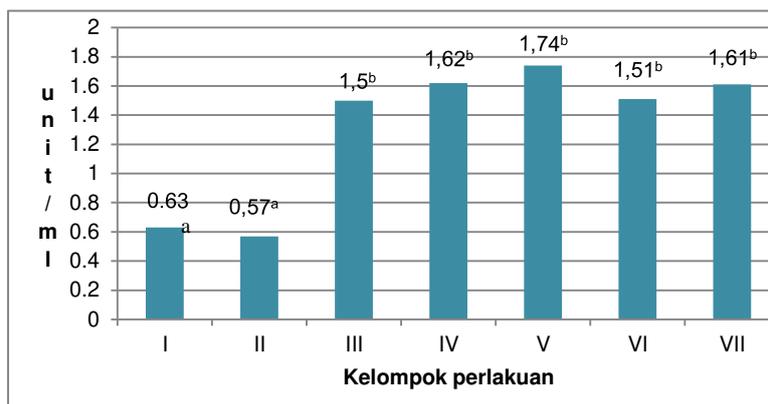
superoksid dismutase dapat diukur menggunakan spektrofotometer cahaya tampak dengan metode *Adrenochrome assay* pada panjang gelombang 480 nm.

SOD dalam tubuh mempunyai aktifitas mengkatalisis radikal superoksida (O_2^*) menjadi hidrogen peroksida dan oksigen, SOD menghambat terjadinya ootoksidasi epinefrin menjadi adenokrom, hal ini akibat adanya dapar karbonat yang menyebabkan suasana menjadi basa, sehingga epinefrin yang stabil terhadap asam tersebut teroksidasi menjadi adenokrom (Winterbourn *et al*, 1975).

Hasil pengukuran aktifitas SOD menunjukkan bahwa pemberian 5mM *t*-BHP tanpa penambahan antioksidan (kelompok II) terjadi penurunan aktifitas SOD karena adanya penambahan oksidan *t*-BHP dapat mengkatalisasi ootoksidasi epinefrin menjadi adenokrom, sehingga aktifitas SOD dalam menghambat ootoksidasi epinefrin tersebut berkurang. Kelompok perlakuan dengan penambahan antioksidan vitamin E 4µg/ml (kelompok III), serta kelompok IV, V, VI, dan VII yang mendapat perlakuan lutein daun bayam dengan dosis masing-masing 4,0 µg/ml; 6,0 µg/ml; 8,0 µg/ml; dan 10 µg/ml mampu meningkatkan aktifitas SOD pada sel darah yang diinduksi *t*-BHP. Peningkatan aktifitas SOD pada kelompok perlakuan III (Vitamin E), IV, V, VI dan VII (perlakuan lutein) menunjukkan perbedaan nyata terhadap kelompok perlakuan I dan II. Adanya peningkatan aktifitas enzim superoksida dismutase pada kelompok perlakuan lutein daun bayam menunjukkan adanya efek antioksidan yang tinggi. Dosis 8,0µg/ml pada bayam hijau dan dosis 6,0µg/ml pada bayam merah merupakan dosis terbaik untuk meningkatkan aktifitas enzim superoksida dismutase.



Gambar 4. Histogram hasil analisis aktifitas enzim SOD bayam hijau



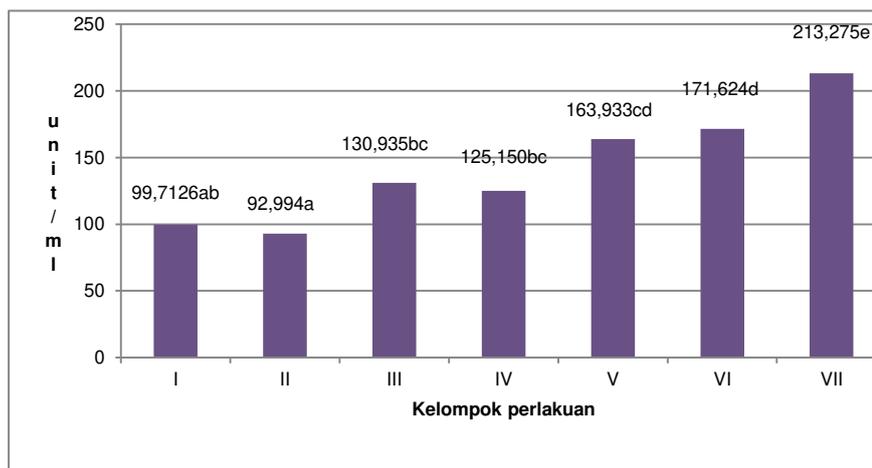
Gambar 5. Histogram hasil analisis aktifitas enzim SOD bayam merah

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama pada gambar menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata.

Aktifitas Katalase.

Enzim katalase mengandung heme yang mengkatalisis hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air dan oksigen serta mencegah pembentukan gelembung CO_2 dalam darah. ⁽¹²⁾ Enzim ini penting untuk memusnahkan H_2O_2 yang terbentuk dalam peroksisom melalui reaksi oksidasi. Aktifitas katalase dapat diukur menggunakan spektrofotometer pada $\lambda 240$ nm. Hasil menunjukkan bahwa dengan pemberian *t*-BHP 5mM tanpa perlakuan antioksidan (kelompok II kontrol negatif) terjadi penurunan aktifitas katalase dibandingkan terhadap kondisi normal (kelompok I). Hasil aktifitas kelompok III yang mendapat perlakuan vitamin E 4,0 µg/ml serta kelompok IV, V, VI, dan VII yang mendapat perlakuan lutein daun bayam dengan

dosis masing-masing 4,0 µg/ml; 6,0 µg/ml; 8,0 µg/ml; dan 10 µg/ml menunjukkan peningkatan aktifitas katalase dibandingkan kelompok I dan II, hal ini membuktikan adanya efek antioksidan dari lutein daun bayam tersebut. Dosis 10 µg/ml lutein bayam hijau dan bayam merah merupakan dosis yang paling efektif dalam meningkatkan aktifitas enzim katalase.



Gambar 7. Histogram analisis aktifitas enzim katalase bayam merah
Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada gambar menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata.

Pengaruh pemberian lutein daun bayam pada sel darah yang mengalami stres oksidatif menunjukkan adanya penurunan kadar malondialdehid dan peningkatan aktifitas enzimatis. Pemberian lutein daun bayam ternyata mampu melawan efek toksik yang ditimbulkan oleh *t*-BHP, hal ini diduga berkaitan dengan kemampuan senyawa lutein daun bayam untuk mengikat radikal bebas, sehingga potensial sebagai antioksidan.

KESIMPULAN

1. Lutein hasil ekstraksi dari daun bayam hijau (*Amaranthus hybridus* L.) dan bayam merah (*Amaranthus tricolor* L.) memiliki aktifitas antioksidan pada sel darah yang diinduksi oleh *t*-BHP.
2. Kadar MDA dalam darah yang dioksidasi *t*-BHP mengalami penurunan tertinggi setelah diberi lutein bayam hijau dan merah dengan dosis 6,0 µg/ml. Peningkatan aktifitas enzim SOD terbesar dihasilkan pada perlakuan lutein bayam hijau 8,0µg/ml dan lutein bayam merah 6,0µg/ml. Peningkatan aktifitas enzim katalase yang terbesar dicapai pada pemberian lutein daun bayam hijau dan merah 10,0µg/ml.
3. Uji statistik menunjukkan sebaran data terdistribusi normal dan homogen. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa dosis lutein memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap penurunan kadar MDA dan peningkatan aktifitas enzim katalase, Perlakuan variasi dosis lutein tidak memberikan perbedaan nyata terhadap aktifitas SOD.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Sdr. R. Alexis Ginting yang telah membantu selama penelitian berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Dalimantha, S. (1981). Atlas Tumbuhan Obat Indonesia. jilid II, *Trubus Agriwidya*. Jakarta: Direktorat Gizi, Depkes RI.
- Fransworth N.R., (1996). Biological and Phytochemical Screening Of Plant. *Journal Of Pharmaceutical Science* 55(3):225-76
- Halliwell B, Gutteridge J.M.C., (1989). *Free Radicals in biology and medicine*. Ed. 2, New York: Oxford University press. Hal 196-200
- Handayani, W., Haribowo, A.S., (2008). *Asuhan Keperawatan pada Klien dengan Gangguan Sistem Hematologi*. Jakarta: Penerbit Salemba Medika, Hal. 1-17.
- Madhavi. D.L., dan Kagan D.I., (2002). *Process For The Isolation Of Mixed Carotenoids From Plants*. United States Patent Documents, United States. 6,380,442



- Mayes P.A., Granner D.K., (1988). *Alih Bahasa Hartono A. Biokimia Harper.*, Ed. 22. Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta: EGC., Hal 134-138.
- Muselik, Jan. (2007). Measurement Of Antioxidant Activity Of Wine Chatecins, Procianidins, Anthocyanins, and Paranoanthocyanins. *International Journal Of Molecular Sciences*, MDPI., (8): 797-809. Czech Republic.
- Mozaffarieh, M., Sacu, S. dan Wedrich, A., (2003). The Role Of The Carotenoids, Lutein And Zeaxanthin, In Protecting Against Age-Related Macular Degeneration: A Review Based On Controversial Evidence, *Nutrition Journal* 2(20). Austria: Department of Ophthalmology, University of Vienna.
- Thibodeau. A. dan abbattista, S., (2008). *The Antioxidant Activity Of Olive Leaf Extract And Its Anti-Inflammatory Effect, Cosmetic Science Technology.* Italy: Milan, Hal 1- 4.
- Thorne Reaserch, (2005). Lutein and Zeaxanthin monograph, *Alternative Medicine Review*, 2(10):128-135.
- Tüközkan^a Nu., Erdamar. H., dan Seven. I. (2006), Measurement of total malondialdehyde in plasma and tissues by High Performance Liquid Chromatography and Thiobarbituric Acid assay. *experimental reaserch. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, ANKARA, Firat Tıp Dergisi*, 11(2):88-92.
- Winasari, H., (2007). *Antioksidan alami dan Radikal Bebas.* Cetakan pertama. Yogyakarta: Kanisius. Hal 12-211
- Winterbourn, C., Hawkins, R., Brian, M. dan Carrell, R., (1975). The Estimation of Red Cell Superoxide Dismutase Activity, *J Lab Clin Med*, Hal 85, 337

DISKUSI

