

**KADAR VITAMIN E RENDAH SEBAGAI  
FAKTOR RISIKO PENINGKATAN BILIRUBIN SERUM  
PADA NEONATUS**

*THE LOW LEVEL OF VITAMIN E AS A RISK FACTOR OF INCREASING  
SERUM BILIRUBIN IN NEONATES*



**Tesis**

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Sarjana S-2  
dan memperoleh keahlian dalam bidang Ilmu Kesehatan Anak**

**Tun Paksi Sareharto**

**PROGRAM PASCA SARJANA  
MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
DAN  
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I  
ILMU KESEHATAN ANAK  
UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG  
2010**

**LEMBAR PENGESAHAN**

**TESIS**

**KADAR VITAMIN E RENDAH SEBAGAI FAKTOR RISIKO  
PENINGKATAN BILIRUBIN SERUM PADA NEONATUS**

disusun oleh:

**Tun Paksi Sareharto**

**G4A004029 / G3C004033**

Telah dipertahankan di hadapan Tim Penguji pada tanggal 20 Februari 2010  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui

Pembimbing Utama

Pembimbing Kedua



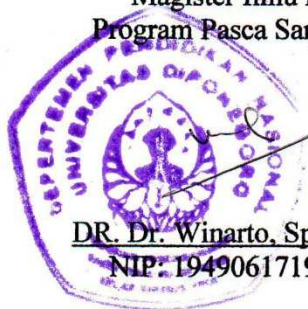
Dr. Kamilah Budhi Rahardjani, SpA(K)  
NIP: 130 354 868

Dr. Noor Wijayahadi, MKes, PhD, SpFK  
NIP: 196406301996031001

Mengetahui

Ketua Program Studi  
Magister Ilmu Biomedik  
Program Pasca Sarjana UNDIP

Ketua Program Studi PPDS I  
Ilmu Kesehatan Anak  
Fakultas Kedokteran UNDIP



DR. Dr. Winarto, SpMK, SpM(K)  
NIP: 194906171978021001



Dr. Alifiani Hikmah Putranti, SpA(K)  
NIP: 196404221988032001

## **PERNYATAAN**

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan dalam tulisan dan daftar pustaka. Saya juga menyatakan bahwa hasil penelitian ini menjadi milik Bagian Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr. Kariadi Semarang, dan setiap upaya publikasi hasil penelitian ini harus mendapat ijin dari Ketua Bagian Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr. Kariadi Semarang.

Semarang, Februari 2010

Penulis

## **RIWAYAT HIDUP**

### **A. Identitas**

Nama : Tun Paksi Sareharto  
Tempat, tanggal lahir : Semarang, 24 Oktober 1973  
Agama : Islam  
Jenis kelamin : Laki-laki  
Alamat : Jl. Lampersari no. 65 Semarang 50249

### **B. Riwayat Pendidikan**

1. SD Negeri Candi Baru II Semarang, 1980 – 1986.
2. SMP Negeri 3 Semarang, 1986 – 1989.
3. SMA Negeri 3 Semarang, 1989 – 1992.
4. Kedokteran Umum Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, 1992 – 1999
5. PPDS-I Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, 2004 – sekarang.
6. Magister Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Diponegoro, 2004 – sekarang.

### **C. Riwayat Pekerjaan**

- Dokter Puskesmas (Rawat Inap) Pringsurat sebagai Pegawai Tidak Tetap (PTT), 2000 – 2003.
- Dokter pada Klinik TPK Khusus Yayasan Kesehatan Telkom Area Jateng & DIY, 2003 – 2004.

### **D. Keterangan Keluarga**

- Ayah kandung : H. Dulah Sarengat
- Ibu kandung : Hj. Chomsiatun
- Isteri : Nadiya Amaliya
- Anak : 1. Fadgham Hamiyz Nur Afiq  
2. Faiq Azzam Nafidz

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT, karena berkat rahmat serta ridho-Nya, Laporan Penelitian dengan judul **“Kadar Vitamin E Rendah sebagai Faktor Risiko Peningkatan Bilirubin Serum pada Neonatus”** dapat terselesaikan, guna memenuhi sebagian syarat dalam mencapai derajat Strata 2 dan memperoleh keahlian dalam bidang Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

Kami menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna karena keterbatasan kami. Dengan dorongan keluarga, bimbingan para guru, serta bantuan dan kerjasama yang baik dari rekan-rekan maka tulisan ini dapat terwujud.

Banyak pihak yang telah membantu dalam penyelesaian laporan ini, untuk itu pada kesempatan ini kami menghaturkan terima kasih serta penghormatan yang setinggi-tingginya kepada :

1. Prof. DR. Dr. Susilo Wibowo, MS.Med, SpAnd, Rektor Universitas Diponegoro Semarang beserta jajarannya, dan mantan Rektor Prof. Ir. Eko Budihardjo, MSc yang telah memberikan ijin bagi penulis untuk menempuh PPDS-1 IKA FK UNDIP Semarang.
2. Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro, Prof. Drs. Y. Warella, MPA, PhD yang telah memberikan ijin untuk menempuh Program Pascasarjana UNDIP Semarang.

3. Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pascasarjana UNDIP DR. Dr. Winarto, SpMK, SpM(K), serta mantan Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pascasarjana UNDIP Prof. Dr. H. Soebowo, SpPA(K), atas bimbingan dan sarannya serta sebagai tim penguji Proposal Penelitian dan Tesis.
4. Dr. Soejoto, PAK, SpKK(K), Dekan FK UNDIP beserta jajarannya, serta mantan Dekan Dr. Anggoro DB Sachro, SpA(K), DTM&H dan Prof. Dr. Kabulahman, SpKK(K), yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti PPDS-1 IKA FK UNDIP.
5. Dr. Budi Riyanto, SpPD, MSc, KPTI, Direktur Utama RSUP Dr. Kariadi Semarang beserta jajaran Direksi, serta mantan Direktur Utama RSUP Dr. Kariadi Semarang Dr. Gatot Suharto, MMR, yang telah memberikan ijin pada penulis untuk menempuh PPDS-1 di Bagian IKA/SMF Kesehatan Anak di RSUP Dr. Kariadi Semarang.
6. Dr. Dwi Wastoro Dadiyanto SpA(K), Ketua Bagian Ilmu Kesehatan Anak FK UNDIP/SMF Kesehatan Anak RSUP Dr. Kariadi Semarang, serta Dr. Budi Santosa, SpA(K), mantan Ketua Bagian Ilmu Kesehatan Anak FK UNDIP/SMF Kesehatan Anak RSUP Dr. Kariadi Semarang, yang telah memberi kesempatan serta bimbingan kepada penulis dalam mengikuti PPDS-1.
7. Dr. Kamilah Budhi Rahardjani, SpA(K), mantan Ketua Bagian IKA FK UNDIP/SMF Kesehatan Anak RSUP Dr. Kariadi Semarang yang juga selaku pembimbing, serta Dr. Noor Wijayahadi, MKes, PhD, SpFK, sebagai

pembimbing kedua, yang telah memberikan kesempatan, bimbingan serta arahan dengan sabar, tulus, dan bijaksana dalam menyelesaikan tesis serta tugas ilmiah lainnya selama mengikuti PPDS-1.

8. Dr. Alifiani Hikmah Putranti, SpA(K), Ketua Program Studi PPDS-1 IKA FK UNDIP, serta Dr. Hendriani Selina, MARS, SpA(K) selaku mantan Ketua Program Studi PPDS-1 IKA FK UNDIP, atas kebijaksanaan, dorongan serta motivasi kepada penulis.
9. DR. Dr. Tatty Ermin Setiati, SpA(K), PhD, selaku dosen wali, yang telah dengan sabar dan penuh perhatian memberikan motivasi kepada penulis.
10. Dr. Hardian, sebagai pembimbing metodologi dan statistik dalam proposal penelitian sebelumnya dan dalam penyusunan laporan penelitian ini.
11. Prof. Dr. M. Sidhartani Zain, MSc, SpA(K), Prof. DR. Dr. Tjahjono, SpPA(K), FIAC, Dr. Kusmiyati DK, MKes, dan Dr. Suhartono, MKes, sebagai tim penguji, atas bimbingannya serta kebijaksanaan dalam perbaikan dan penyelesaian tesis ini.
12. Kepada para guru besar serta staf pengajar Bagian IKA Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr. Kariadi Semarang: Prof. dr. Moeljono S. Trastotenojo, SpA(K), Prof. DR. Dr. Ag. Soemantri, SpA(K), SSi(Stat), Prof. DR. Dr. I. Sudigbia, SpA(K), Prof. DR. Dr. Lydia Kristanti K, SpA(K), Prof. DR. Dr. Harsoyo N, SpA(K), DTM&H, DR. Dr. Tatty Ermin S, SpA(K), PhD, Dr. R. Rochmanadji W, SpA(K), MARS, DR. Dr. Tjipta Bachtera, SpA(K), Dr. H.M. Sholeh Kosim, SpA(K), Dr. Rudy Susanto, SpA(K), Dr. I. Hartantyo, SpA(K), Dr. Herawati Juslam, SpA(K), Dr. Agus Priyatno,

SpA(K), Dr. Asri Purwanti, SpA(K), MPd, Dr. Bambang Sudarmanto, SpA(K), Dr. MM DEAH Hapsari, SpA(K), Dr. Mexitalia Setiawati, SpA(K), Dr. H.M. Herumuryawan, SpA, Dr. H. Gatot Irawan S, SpA, Dr. Anindita S, SpA, Dr. Wistiani, SpA, Dr. Omega Mellyana, SpA, Dr. M. Supriatna, SpA, Dr. Yetty Movieta N, SpA, Dr. Ninung Rose D, SpA, MSi.Med, Dr Nahwa Arkhaesi, SpA, MSi.Med yang telah berperan besar dalam proses pendidikan penulis.

13. Dr. MI. Tjahjati DM SpPK, selaku Kepala Laboratorium RS Dr. Kariadi, serta Dr. Herniah, SpPK dan Dr. Ria, SpPK, yang telah memberikan ijin penulis melakukan pemeriksaan laboratorium untuk penelitian ini, juga Ibu Farida, yang telah banyak membantu kelancaran dari penelitian ini.
14. Bapak Solikhin dan Bapak Priyanto atas ketelitian dan keterampilan beliau selaku petugas sampling, serta seluruh paramedis ruang Rawat Gabung serta ruang Perawatan Bayi Risiko Tinggi, atas kerja samanya yang baik dalam pengambilan sampel penelitian.
15. Ibu Suprihatin dari Laboratorium Bioteknologi/Parasitologi Universitas Gajah Mada/RS Dr. Sardjito Yogyakarta atas segala bantuan dalam pemeriksaan sampel penelitian ini.
16. Staf tata usaha dan karyawan Bagian IKA, atas kerja sama dan kebersamaan selama penulis menempuh pendidikan di Bagian IKA.
17. Kepada seluruh teman sejawat peserta PPDS-1 IKA serta khususnya teman-teman angkatan Juli 2004 yaitu Dr. F. Novita Wijayanti, SpA, Msi.Med, Dr. Zuhriah Hidajati, SpA, MSi.Med, Dr. Abdul Khanis, terima kasih atas



dukungan moril, bantuan serta kerjasamanya dalam suka dan duka dalam menempuh pendidikan dan penelitian ini. Sukses selalu.

18. Kepada istri tercinta Nadiya Amaliya, serta anak-anakku tersayang Fadgham Hamiyz Nur Afiq dan Faiq Azzam Nafidz, ayahanda H. Dulah Sarengat, serta ibunda Hj. Chomsiatun, ayah mertua Dr. HM Soegijono, ibu mertua Dra. Hj. Endang SW, serta kakak-kakak dan adik-adik: Dra. Ngatindriatun, SE, MH, Satiarsiatun, SPsi, Sariniatun, SSi, Fara Rahmalia, Maulana Hafid, ST, penulis ucapkan terima kasih tiada terhingga atas dukungan moril, materiil, perhatian, dukungan nasehat, serta doa restu terus menerus untuk penulis sejak awal pendidikan hingga sekarang. Semoga Allah SWT senantiasa memuliakan, memberi kebahagiaan serta keselamatan di dunia dan akhirat.
19. Kepada seluruh orang tua beserta anak-anak yang kami gunakan sebagai sampel penelitian, baik yang pada akhirnya masuk dalam penelitian maupun yang tidak, atas partisipasinya dalam penelitian ini, karena kalianlah maka laporan penelitian ini ada. Hanya Allah SWT yang dapat membalas kebaikan kalian dengan penuh rahmat.
20. Terima kasih juga penulis ucapkan kepada semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu yang telah membantu dalam penyelesaian tesis ini. Kiranya hanya Allah SWT yang dapat membalas segala kebaikan, Amin.

Kesempurnaan hanyalah milik Allah SWT, kekurangan adalah milik mahluk-Nya. Penulis mohon kepada semua pihak dengan rela hati memberikan

masuk serta sumbang saran untuk dapat meningkatkan kualitas dan memberikan bekal bagi penulis untuk penelitian ilmiah di masa yang akan datang.

Akhirnya, dari lubuk hati yang paling dalam penulis mohon maaf setulusnya kepada semua pihak atas segala kesalahan serta kekhilafan dalam bertutur kata maupun sikap yang kurang berkenan dalam berinteraksi selama pendidikan dan kegiatan penelitian ini. Semoga Allah Arrahman dan Arrahim senantiasa melimpahkan rahmat, berkah, serta ridlo-Nya kepada kita semua, Amin.

Semarang, Februari 2010

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>PERNYATAAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>RIWAYAT HIDUP .....</b>	<b>iv</b>
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>v</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN.....</b>	<b>xvii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xviii</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>xix</b>
<b>BAB 1 - PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	5
1.3. Tujuan Penelitian .....	5
1.3.1. Tujuan umum .....	5
1.3.2. Tujuan khusus .....	5
1.4. Manfaat Penelitian .....	6
1.5. Orisinalitas Penelitian .....	7
<b>BAB 2 - TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>9</b>
2.1. Hiperbilirubinemia .....	9
2.1.1. Sintesis hemoglobin .....	10
2.1.2. Metabolisme bilirubin .....	12
2.1.3. Penyebab hiperbilirubinemia .....	15
2.1.4. Dampak hiperbilirubinemia .....	18
2.2. Oksidan, Radikal Bebas, dan Antioksidan.....	20
2.2.1. Dampak oksidan dan radikal bebas.....	22

2.3. Vitamin E .....	24
2.3.1. Metabolisme vitamin E .....	24
2.3.2. Vitamin E sebagai antioksidan.....	26
2.3.3. Defisiensi vitamin E.....	30
2.4. Vitamin C .....	31
2.4.1. Metabolisme vitamin C sebagai antioksidan.....	31
2.5. Interaksi antar Antioksidan .....	33
<b>BAB 3 - KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS</b>	<b>36</b>
3.1. Kerangka Teori.....	36
3.2. Kerangka Konsep .....	37
3.3. Hipotesis.....	37
<b>BAB 4 - METODE PENELITIAN .....</b>	<b>38</b>
4.1. Ruang Lingkup Penelitian.....	38
4.2. Tempat dan Waktu Penelitian .....	38
4.3. Rancangan Penelitian .....	38
4.4. Populasi dan Sampel .....	39
4.4.1. Populasi Penelitian .....	39
4.4.2. Sampel Penelitian.....	39
4.4.3. Cara Sampling.....	41
4.4.4. Besar Sampel.....	41
4.5. Variabel Penelitian .....	42
4.6. Definisi Operasional.....	43
4.7. Pengumpulan Data .....	44
4.8. Alur Penelitian .....	48
4.9. Analisis Data .....	50
4.10. Etika Penelitian .....	53
<b>BAB 5 - HASIL PENELITIAN.....</b>	<b>54</b>
5.1. Karakteristik Ibu dan Neonatus.....	54
5.2. Rerata Kadar Bilirubin Total.....	57
5.3. Rerata Kadar Vitamin E.....	57
5.4. Hubungan Kadar Vitamin E dengan Bilirubin.....	58

5.5. Kadar Vitamin E sebagai Faktor Risiko Peningkatan Bilirubin .....	58
5.6. Kadar Vitamin E dan C sebagai Faktor Risiko Peningkatan Bilirubin.....	59
<b>BAB 6 - PEMBAHASAN.....</b>	<b>60</b>
6.1. Pembahasan Hasil .....	60
6.2. Keterbatasan Penelitian.....	65
<b>BAB 7 - SIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>66</b>
7.1. Simpulan .....	66
7.2. Saran.....	67
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>68</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>75</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Beberapa penelitian terdahulu yang berkaitan dengan kadar bilirubin dan antioksidan vitamin E .....	7
Tabel 2. Kadar vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) serum pada manusia.....	30
Tabel 3. Karakteristik ibu dan neonatus pada kelompok kasus dan kontrol.....	56
Tabel 4. Rerata kadar bilirubin total (mg/dL) pada kelompok kasus dan kontrol	57
Tabel 5. Rerata kadar vitamin E (mg/dL) menurut kelompok kasus dan kontrol.	58
Tabel 6. Tabulasi silang antara kelompok kadar vitamin E terhadap kelompok kasus dan kontrol .....	59
Tabel 7. Hasil analisis multivariat regresi logistik.....	59

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Diagram yang menunjukkan molekul hemoglobin A. ....	10
Gambar 2. Perkembangan rantai hemoglobin manusia.....	11
Gambar 3. Alur metabolisme pemecahan hem dan pembentukan bilirubin .....	13
Gambar 4. Penyebab terjadinya hiperbilirubinemia patologis (modifikasi dari beberapa sumber). ....	17
Gambar 5. Peranan antioksidan.....	22
Gambar 6. Struktur kimia Vitamin E .....	25
Gambar 7. Mekanisme vitamin E untuk mengurangi radikal-radikal bebas menjadi metabolit yang tidak berbahaya dengan memberikan gugus hidrogennya. ....	27
Gambar 8. Siklus vitamin E. ....	28
Gambar 9. Struktur kimia Vitamin C.....	32
Gambar 10. Oksidasi askorbat untuk mereduksi radikal <i>tocopheroxyl</i> .....	34
Gambar 11. Siklus vitamin E dan vitamin C sebagai <i>antioxidant network</i> bereaksi terhadap radikal bebas .....	34
Gambar 12. Alur penelitian.....	49
Gambar 13. Sampel penelitian. ....	54

## DAFTAR LAMPIRAN

1. Lampiran 1 : *Ethical Clearance*
2. Lampiran 2 : Ijin penelitian dari RSUP Dr. Kariadi Semarang
3. Lampiran 3 : Persetujuan Setelah Penjelasan
4. Lampiran 4 : Prosedur Pemeriksaan Kadar Bilirubin Serum
5. Lampiran 5 : Prosedur Pemeriksaan Kadar Vitamin E Serum
6. Lampiran 6 : Prosedur Pemeriksaan Kadar Vitamin C Serum
7. Lampiran 7 : Data Penelitian
8. Lampiran 8 : Hasil Analisa Data



## DAFTAR SINGKATAN

AKB	:	Angka kematian bayi
AKN	:	Angka kematian neonatus
ASI	:	Air susu ibu
BBL	:	Bayi baru lahir
BCB	:	Bayi cukup bulan
BKB	:	Bayi kurang bulan
BST	:	Bilirubin serum total
cGMP	:	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i>
DNA	:	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
G6PD	:	<i>Glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>
GC	:	<i>Guanylyl cyclase</i>
GPX	:	Glutation peroksidase
GR	:	Glutation reduktase
HbA	:	Hemoglobin <i>adult</i>
HbF	:	Hemoglobin <i>fetal</i>
IMR	:	<i>Infant mortality rate</i>
KB	:	Keluarga berencana
MDA	:	<i>Malondialdehyde</i>
NADPH	:	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NMR	:	<i>Neonatal mortality rate</i>
PUFA	:	<i>Polyunsaturated fatty acid</i>
RCT	:	<i>Randomized control trial</i>
SKN	:	Sistem kesehatan nasional
SOD	:	Superoksida dismutase
SOR	:	Spesies oksigen reaktif
SSP	:	Susunan saraf pusat
TR	:	Tioredoksin reduktase

## ABSTRACT

**Background.** Hyperbilirubinemia was found in 25-50% newborn babies and cause a low quality of life. Physiologically hyperbilirubinemia peak level 5-6 mg/dL on 3<sup>rd</sup>-4<sup>th</sup> days, mostly caused by hemolysis (75%) which might be due to oxidant exposure. Vitamin E protects erythrocyte membrane from oxidative damage.

**Objective.** To analyze low levels of serum vitamin E with concern to vitamin C as a risk factor of increasing pathological serum bilirubin level in neonates.

**Method.** A nested case control design was done in 80 healthy newborn babies in Dr. Kariadi Hospital (March-May 2009). Serum bilirubin were measured on the 3<sup>rd</sup>-4<sup>th</sup> day, serum vitamin E and vitamin C level were examined from blood sample taken on the 1<sup>st</sup> day of life. Risk factor was analyzed by odds ratio (95%CI) and logistic regression.

**Results.** Subjects consist of 40 neonates with bilirubin  $\geq 5$  mg/dL and 40 with  $< 5$  mg/dL as control group. Mean total bilirubin level (mg/dL): 9,69 ( $\pm 2,41$ ) in case and 2,81 ( $\pm 1,21$ ) in control. Mean vitamin E level (mg/dL): 0,19 ( $\pm 0,03$ ) and 0,23 ( $\pm 0,02$ ). Bivariate analysis showed that the low level of vitamin E is a risk factor to the increasing bilirubin level (OR=23,727; 95%CI 6,836-82,361). Multivariate analysis showed that the low level of serum vitamin E and vitamin C are a bigger risk factor to the increasing bilirubin level (OR=55,860; 95%CI 6,672-467,704).

**Conclusion.** The low levels of serum vitamin E and vitamin C are a risk factor to the increasing bilirubin level in neonates.

**Keywords:** Low vitamin E, risk factor, serum bilirubin, neonates.

## ABSTRAK

**Latar belakang.** Hiperbilirubinemia terjadi pada 25-50% bayi baru lahir (BBL) yang dapat menurunkan kualitas hidup. Secara fisiologis bilirubin meningkat mencapai puncak pada kadar 5-6 mg/dL pada hari ke 3-4, terbanyak karena hemolisis (75%) yang kemungkinan terjadi akibat paparan oksidan. Vitamin E melindungi membran eritrosit dari kerusakan oksidatif.

**Tujuan.** Menganalisis kadar vitamin E dengan memperhitungkan kadar vitamin C serum yang rendah sebagai faktor risiko peningkatan kadar bilirubin serum yang patologis pada neonatus.

**Metode penelitian.** Desain penelitian adalah *nested case control* dengan subyek 80 neonatus aterm sehat di RSUP Dr. Kariadi pada Maret-Mei 2009, 40 neonatus sebagai kasus dan 40 neonatus sebagai kontrol. Kadar bilirubin diperiksa hari ke 3-4, kadar vitamin E dan vitamin C diperiksa dari sampel darah hari ke-1. Faktor risiko dianalisis dengan rasio *odds* (95% interval kepercayaan) dan regresi logistik.

**Hasil.** Subjek 40 neonatus aterm sehat dengan kadar bilirubin  $\geq 5$  mg/dL sebagai kasus dan 40 neonatus dengan kadar bilirubin  $< 5$  mg/dL sebagai kontrol. Rerata bilirubin total (mg/dL):  $9,69 \pm 2,41$  (kasus),  $2,81 \pm 1,21$  (kontrol). Rerata kadar vitamin E (mg/dL):  $0,19 \pm 0,03$  (kasus) dan  $0,23 \pm 0,02$  (kontrol). Analisis bivariat menunjukkan kadar vitamin E rendah merupakan faktor risiko terjadinya peningkatan kadar bilirubin (OR=23,727; 95%CI 6,836-82,361). Analisis multivariat menunjukkan kadar vitamin E dan vitamin C rendah mempunyai faktor risiko yang lebih tinggi terhadap peningkatan kadar bilirubin (OR=55,860; 95%CI 6,672-467,704).

**Simpulan.** Kadar vitamin E dan vitamin C rendah merupakan faktor risiko peningkatan kadar bilirubin pada neonatus.

**Kata kunci:** Vitamin E rendah, faktor risiko, bilirubin serum, neonatus.

# **BAB 1**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1. Latar Belakang**

Kematian neonatus di Indonesia tahun 2000 sebesar 82.000, dengan angka kematian neonatus (*AKN/Neonatal Mortality Rate*) 18 per 1000 kelahiran hidup.<sup>1-3</sup> Salah satu penyebab mortalitas pada bayi baru lahir (BBL) adalah ensefalopati bilirubin (lebih dikenal sebagai *kern icterus*) yang merupakan komplikasi ikterus neonatorum yang paling berat.<sup>4-6</sup>

Hiperbilirubinemia dapat terjadi pada 25-50% bayi baru lahir (BBL) dari ibu dengan berbagai usia kehamilan.<sup>7</sup> Tahun 1998 di Amerika Serikat 65% BBL menderita ikterus dalam minggu pertama kehidupan,<sup>5</sup> di Malaysia sebanyak 75% dari BBL yang dirawat menderita ikterus dalam minggu pertama kehidupan.<sup>5,8</sup> Di Indonesia, insiden ikterus pada BCB di beberapa RS pendidikan antara lain RS Dr. Cipto Mangunkusumo, RS Dr. Sardjito, RS Dr. Soetomo, dan RS Dr. Kariadi bervariasi dari 13,7% hingga 85%. Data di RS Dr. Kariadi pada tahun 2003 menyebutkan insiden ikterus neonatorum sebesar 12% pada BCB dimana 78% merupakan ikterus fisiologis. Kasus kematian BBL terkait dengan hiperbilirubinemia terhadap seluruh BBL yang dirawat pada tahun 2003 di RS Dr. Sardjito sebesar 24% dan di RS Dr. Kariadi sebesar 13,1%.<sup>5</sup> Hiperbilirubinemia dapat mengakibatkan kerusakan otak pada neonatus yang mampu bertahan hidup yang pada akhirnya dapat menurunkan kualitas hidup anak.<sup>9,10</sup>

Hiperbilirubinemia adalah peningkatan kadar bilirubin, ditandai dengan warna kuning pada kulit dan mukosa yang disebut ikterus pada kadar bilirubin

lebih 5 mg/dl.<sup>4,11</sup> Kadar bilirubin bayi baru lahir dipengaruhi oleh usia kehamilan, berat lahir dan asupan ASI, serta adanya inkompatibilitas golongan darah, abnormalitas struktur eritrosit, dan defisiensi enzim G6PD.<sup>4,12</sup> Hiperbilirubinemia sebagian besar merupakan ikterus fisiologis dimana bilirubin umumnya meningkat sampai melebihi 2 mg/dL pada hari-hari pertama kehidupan,<sup>7,12</sup> mencapai puncak rata-rata pada kadar 5–6 mg/dL pada hari ke 3–4 dan kemudian menurun setelah usia 1 minggu pada bayi cukup bulan (BCB).<sup>6,11</sup> Sebagian kecil merupakan ikterus patologis dengan berbagai penyebab seperti inkompatibilitas, infeksi/sepsis, atau penyakit metabolik.<sup>4-6</sup>

Kadar bilirubin sampai 10 mg/dl merupakan suatu masalah pada neonatus, dicurigai sebagai suatu kondisi patologis.<sup>12</sup> Peningkatan kadar bilirubin patologis bila: terjadi pada 24 jam pertama kehidupan, peningkatan lebih 5 mg/dl per hari, atau bila terjadi ikterus yang menetap lebih 1 minggu pada BCB atau lebih 2 minggu pada bayi kurang bulan (BKB).<sup>5,13</sup>

Bilirubin pada neonatus sebagian besar berasal dari pemecahan hemoglobin akibat hemolisis sehingga bilirubin dapat dipakai sebagai petunjuk adanya hemolisis.<sup>9,14</sup> Sebagian kecil lainnya berasal dari pelepasan hemoglobin karena eritropoesis yang tidak efektif di dalam sumsum tulang, jaringan yang mengandung protein hem (mioglobin, katalase, peroksidase, sitokrom), dan hem bebas.<sup>9,15,16</sup> Kadar bilirubin pada neonatus meningkat disebabkan karena lisis eritrosit akibat besarnya jumlah eritrosit pada awal kehidupan dan siklus pergantian eritrosit yang cepat, umur hidup eritrosit yang lebih pendek yaitu 80 hari dibandingkan pada usia dewasa yang 120 hari.<sup>17</sup>

Metabolisme bilirubin dalam hepar pada neonatus belum sempurna sehingga bilirubin indirek (*unconjugated bilirubin*) banyak yang beredar dalam sirkulasi mengakibatkan warna kuning pada kulit dan mukosa.<sup>10,15</sup> Bilirubin indirek dapat melewati sawar darah otak, mengendap pada jaringan susunan saraf pusat (SSP), bersifat toksik terhadap sel otak berdampak perubahan neuropatologi/kerusakan otak menetap terjadi *kern icterus* yang secara klinis disebut ensefalopati bilirubin, ditandai oleh letargi, hipotonia, dan atetosis, dan berisiko mengalami kematian. Neonatus yang dapat bertahan hidup akan timbul gejala sisa berupa palsy serebral, gangguan pendengaran, paralisis, dan displasia dental, hal ini berdampak pada penurunan kualitas hidup anak berupa kecacatan perkembangan di kemudian hari.<sup>6,9-11,17</sup>

Eritrosit BBL relatif sensitif terhadap oksidan dibanding eritrosit anak mengakibatkan mudah terjadi kerusakan oksidatif, hal ini karena masih kurangnya kemampuan kapasitas eritrosit neonatus terhadap stres oksidatif sebagai akibat kurangnya pertahanan antioksidan terutama pada bayi prematur.<sup>18,19</sup> Oksidan, sebagian berbentuk radikal bebas, dihasilkan selama proses metabolisme pada sebagian besar sel tubuh termasuk eritrosit.<sup>20-22</sup> Tubuh menghasilkan antioksidan yang efisien terhadap kerusakan oksidatif, yaitu beberapa enzim termasuk katalase, superoksidase dismutase, glutathion peroksidase, dan antioksidan non enzim seperti glutathion, dan vitamin E.<sup>23</sup> Pembentukan oksidan/radikal bebas yang melebihi *antioxidant defences capacity* menyebabkan kerusakan oksidatif, meningkatkan spesies oksigen reaktif (SOR) dan dapat mengganggu integritas komponen fosfolipid penyusun membran sel,

*deoxyribonucleic acid* (DNA), dan protein sel, terjadi peroksidasi lipid yang berakibat hemolisis.<sup>20,22</sup>

Eritrosit pada neonatus berumur pendek dengan jumlah yang besar dan rentan terhadap paparan oksidan sehingga mudah terjadi hemolisis, beberapa hal inilah yang memudahkan terjadinya peningkatan kadar bilirubin dalam sirkulasi.<sup>17-19</sup>

Vitamin E, suatu antioksidan poten yang bekerja pada membran sel dengan melepaskan ion hidrogen menjadi radikal *tocopheroxyl*, dapat mencegah peroksidasi lipid yang secara efektif melindungi membran sel termasuk membran sel eritrosit terhadap kerusakan oksidatif yang mengakibatkan lisis sel,<sup>24</sup> sehingga vitamin E dapat mencegah terjadinya hemolisis, yang kemudian dapat mencegah hiperbilirubinemia pada neonatus.<sup>25</sup> Dalam menjalankan fungsinya vitamin E yang telah teroksidasi mengalami regenerasi kembali dibantu oleh vitamin C.<sup>26,27</sup> Vitamin C dan vitamin E mempunyai kemampuan antioksidan karena mampu bereaksi dengan radikal bebas dengan cara melepas elektronnya.<sup>21</sup> Vitamin C melepas elektron menjadi *ascorbyl radical*, bereaksi dengan SOR terutama dengan radikal hidroksil (OH<sup>-</sup>) dan anion superoksida (O<sub>2</sub><sup>-</sup>).<sup>26,27</sup>

Hiperbilirubinemia terbanyak disebabkan karena hemolisis (75%),<sup>6,9,16</sup> yang salah satu penyebabnya adalah adanya stres oksidatif,<sup>20,22</sup> maka dari itu usaha-usaha untuk mengurangi stres oksidatif perlu dilakukan. Penelitian tentang hubungan antioksidan (vitamin E dan vitamin C) dengan kejadian hemolisis maupun hiperbilirubinemia belum banyak dijumpai di Indonesia.

Berdasarkan latar belakang tersebut maka penulis tertarik untuk

mengadakan penelitian tentang kadar vitamin E yang rendah merupakan faktor risiko terhadap peningkatan kadar bilirubin pada neonatus.

## **1.2. Rumusan Masalah**

Berdasarkan patofisiologi, bahwa stres oksidatif dapat menyebabkan hemolisis, berdampak pada peningkatan kadar bilirubin serum darah, dan vitamin E serta vitamin C merupakan antioksidan yang bekerja secara bersama-sama dapat mencegah atau menurunkan tingkat stres oksidatif, maka dirumuskan permasalahan penelitian sebagai berikut:

Apakah kadar vitamin E serum yang rendah dengan memperhitungkan kadar vitamin C serum yang rendah merupakan faktor risiko terjadinya peningkatan kadar bilirubin total serum yang cenderung patologis pada neonatus?

## **1.3. Tujuan Penelitian**

### **1.3.1. Tujuan umum**

Menganalisis kadar vitamin E serum yang rendah, dengan memperhitungkan kadar vitamin C serum yang rendah, sebagai faktor risiko kejadian peningkatan kadar bilirubin total serum yang cenderung patologis pada neonatus.

### **1.3.2. Tujuan khusus**

1. Mengukur kadar bilirubin total serum pada neonatus.
2. Mengukur kadar vitamin E serum pada neonatus.



3. Mengukur kadar vitamin C serum pada neonatus.
4. Menganalisis hubungan kadar vitamin E serum yang rendah dengan kejadian peningkatan kadar bilirubin total serum yang cenderung patologis pada neonatus.
5. Menganalisis kadar vitamin E serum yang rendah sebagai faktor risiko kejadian peningkatan kadar bilirubin total serum yang cenderung patologis pada neonatus.

#### **1.4. Manfaat Penelitian**

1. Pendidikan

Sebagai tambahan pustaka dan pengetahuan, khususnya mengenai antioksidan vitamin E dan vitamin C dalam kaitannya dengan hiperbilirubinemia pada neonatus.

2. Penelitian

Penelitian mengenai hubungan kadar vitamin E yang rendah dengan kejadian peningkatan kadar bilirubin pada neonatus ini, diharapkan dapat dijadikan dasar bagi penelitian selanjutnya mengenai antioksidan.

3. Pelayanan Kesehatan

Hasil penelitian dapat meyakinkan terapi antioksidan yang belum banyak diterapkan dalam mencegah hiperbilirubinemia.

## 1.5. Orisinalitas Penelitian

Berdasarkan penelusuran pustaka yang telah dilakukan, kondisi-kondisi dibawah ini belum banyak dijumpai, yaitu:

Tabel 1. Beberapa penelitian terdahulu yang berkaitan dengan kadar bilirubin dan antioksidan vitamin E

No	Judul, peneliti, nama jurnal	Tujuan, jumlah sampel, desain	Hasil
1	- <i>Vitamin E and neonatal hemolysis</i> <sup>28</sup> - Gross, Landaw, Oski. - Pediatrics 1977; 59; 995-997	- Melihat efek defisiensi vitamin E neonatus prematur selama minggu pertama kehidupan terhadap pemendekan umur eritrosit. - 20 neonatus. - <i>Randomized Controlled Trial (RCT)</i> .	Pemberian vitamin E tidak menunjukkan efek pada nilai rata-rata hemoglobin pada kelompok kontrol maupun kelompok kasus.
2	- <i>Vitamin E and neonatal bilirubinemia</i> <sup>29</sup> - Gross. - Pediatrics 1979; 64; 321-323	- Melihat efek vitamin E terhadap bilirubinemia pada neonatus preterm. - 40 neonatus. - RCT.	Neonatus berat lahir $\leq$ 1500 g yang mendapat vitamin E menunjukkan penurunan bilirubin signifikan pada hari ke-3 kehidupan, seperti penurunan puncak bilirubin minggu pertama kehidupan. Perbedaan ini kurang jelas pada neonatus berat lahir > 1500 g.
3	- <i>Antioxidant vitamins and hyperbilirubinemia in neonates</i> <sup>30</sup> - Abdul-Razzak, Nusier, Obediat, Salim. - Ger Med Sci 2007; 5: Doc03.	- Melihat hubungan antara kadar vitamin E dan vitamin C plasma dengan keparahan hiperbilirubinemia pada neonatus aterm dengan aktivitas G-6-PD yang normal. - 130 neonatus. - <i>Cross-sectional</i> .	Kadar vitamin C dan E plasma rata-rata hari pertama neonatus aterm yang berkembang menjadi hiperbilirubinemia secara signifikan < dibanding neonatus aterm yang tidak berkembang menjadi hiperbilirubinemia.
4	- <i>Status of lipid peroxidation, glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant enzymes in neonatal jaundice patients.</i> <sup>31</sup> - Mohan, Priya. - J Clin Diag Res. 2008 June;(3)827-832.	- Mengetahui status antioksidan dan pro-oksidan pada neonatus yang mengalami ikterus. - 48 neonatus yang mengalami ikterus dan 48 neonatus yang sehat. - Observasional.	Kadar MDA pada bayi ikterus meningkat signifikan, terdapat aktifitas SOD dan GPx, kadar GSH, vitamin C, vitamin E, dan aktivitas katalase menurun signifikan, mendukung adanya stres oksidatif pada neonatus yang mengalami ikterus.

- Penelitian tentang antioksidan khususnya vitamin E pada neonatus di Indonesia.
- Hubungan antioksidan khususnya vitamin E dengan kejadian hemolisis maupun hiperbilirubinemia.

Penelitian yang dilakukan berbeda dibandingkan dengan penelitian yang sudah ada sebelumnya yaitu pada: desain, tujuan, dan jumlah sampel. Penelitian ini desain yang digunakan adalah *nested case control*, dengan sampel neonatus sehat.

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. Hiperbilirubinemia**

Hiperbilirubinemia adalah peningkatan kadar bilirubin serum total (BST), apabila kadarnya lebih 5 mg/dL akan tampak secara klinis pada kulit yang disebut ikterus,<sup>4,5,8</sup> yaitu suatu gambaran klinis berupa warna kuning pada kulit, sklera atau jaringan lain yang terlihat, karena adanya deposisi bilirubin yang merupakan produk akhir pemecahan atau katabolisme hem.<sup>4,5,11,12,32</sup>

Hiperbilirubinemia terjadi pada 25-50% neonatus dari ibu dengan berbagai usia kehamilan, dapat bersifat fisiologis atau patologis.<sup>7</sup> Bilirubin pada neonatus didominasi oleh bilirubin indirek sehingga kadar bilirubin total dapat menggambarkan kadar bilirubin indirek. Bayi baru lahir umumnya mengalami peningkatan kadar bilirubin indirek sampai melebihi 2 mg/dL pada minggu pertama kehidupan dan tidak kurang dari 2 mg/dL sampai usia satu bulan.<sup>12</sup>

Bilirubin pada neonatus meningkat disebabkan karena lisis eritrosit akibat besarnya jumlah eritrosit pada awal kehidupan dan siklus pergantian eritrosit yang cepat, umur hidup eritrosit yang lebih pendek yaitu 80 hari dibandingkan pada usia dewasa yang 120 hari.<sup>17</sup>

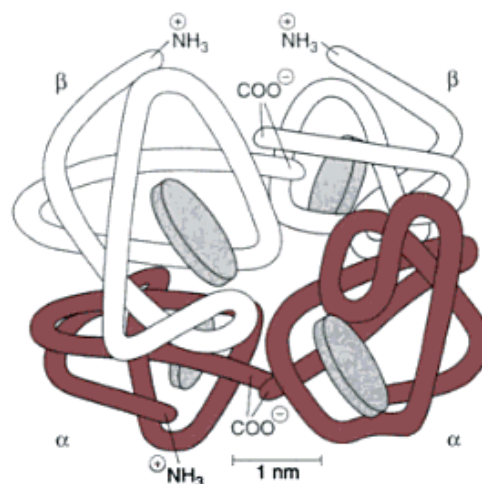
Kadar bilirubin mencapai puncak rata-rata pada 5-6 mg/dL (86–103  $\mu$ mol/L) pada hari ke 3-4 kehidupan dan kemudian akan menurun setelah usia 1 minggu.<sup>11</sup> Peningkatan sampai 12 mg/dL masih dalam kisaran fisiologis, dan pada bayi kurang bulan (BKB) kadar puncak dapat mencapai 10-12 mg/dL dalam 5 hari pertama, bahkan dapat melebihi 15 mg/dL tanpa disertai kelainan metabolisme

bilirubin.<sup>7,12</sup> Kadar bilirubin yang mencapai 10 mg/dL harus diwaspadai karena dapat merupakan suatu proses yang patologis.<sup>6</sup>

### 2.1.1. Sintesis hemoglobin

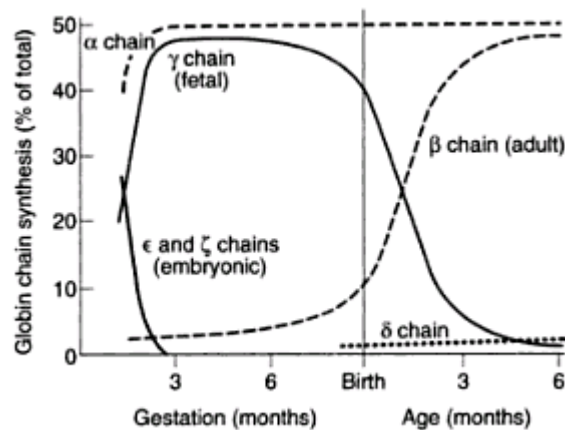
Hemoglobin, suatu protein pembawa oksigen yang dikandung eritrosit, terdiri atas empat rantai polipeptida (globin), yang pada masing-masing terikat sebuah hem. Penyusun rantai globin merupakan kombinasi asam amino yang berbeda-beda, kombinasi tersebut membentuk tiga hemoglobin normal: HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ), HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ), dan HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ).<sup>33,34</sup>

Selama perkembangan fetus dan periode neonatus terjadi transisi sintesis HbF menjadi HbA. HbF mendominasi pada awal kehamilan, kemudian berganti menjadi HbA seiring dengan meningkatnya usia kehamilan.<sup>33-36</sup> HbA pertama



Gambar 1. Diagram yang menunjukkan molekul hemoglobin A. Terlihat 4 subunit, dengan 2 rantai polipeptida  $\alpha$  dan  $\beta$ , masing-masing mengandung hem.

Sumber: Ganong WF. Circulating body fluid. In: Ganong WF. Review of medical physiology 22<sup>nd</sup> ed. California: Lange Medical Publication; 2008. p. 515-46.<sup>34</sup>



Gambar 2. Perkembangan rantai hemoglobin manusia.

Sumber: Ganong WF. Circulating body fluid. In: Ganong WF. Review of medical physiology 22<sup>nd</sup> ed. California: Lange Medical Publication; 2008. p. 515-46.<sup>34</sup>

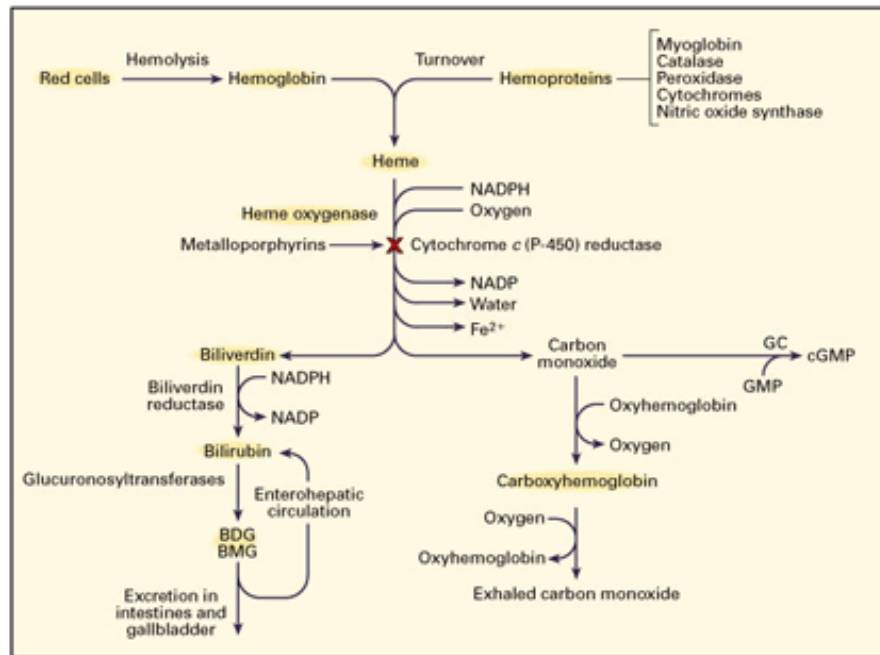
kali timbul pada sirkulasi fetal kira-kira minggu ke-20, saat sumsum tulang pertama kali mulai berfungsi.<sup>37</sup> HbF mendadak menurun dan HbA relatif meningkat dimulai antara minggu ke 32-36 masa kehamilan.<sup>33</sup> Awal masa kehamilan terdapat 90% HbF, saat lahir HbF turun menjadi sekitar 80% dan HbA sekitar 20%.<sup>33,35,37</sup> Dalam keadaan normal HbF tidak dibentuk lagi setelah lahir.<sup>37</sup>

Usia 2-3 bulan terjadi peningkatan sintesis HbA dan penurunan sintesis HbF, kadar HbF menurun menjadi 10%, kadar HbA menjadi 90%. Usia satu tahun pergantian dari HbF ke HbA selesai.<sup>33,36,37</sup> Sejak usia satu tahun sampai dewasa, hampir semua hemoglobin adalah HbA (97%), sisanya 3% merupakan HbA<sub>2</sub> dan sedikit HbF (kurang dari 1%).<sup>33</sup> Perubahan sintesis hemoglobin tersebut berhubungan dengan maturasi biologis, dan tidak terpengaruh oleh paparan lingkungan sesudah bayi lahir.<sup>35</sup>

### 2.1.2. Metabolisme bilirubin

Sekitar 75% produksi bilirubin pada neonatus berasal dari katabolisme hemoglobin dimana 1 gram hemoglobin akan menghasilkan 34 mg bilirubin, 25% sisanya berasal dari pelepasan hemoglobin karena eritropoesis yang tidak efektif di dalam sumsum tulang, jaringan yang mengandung protein hem (mioglobin, katalase, peroksidase, sitokrom), dan hem bebas.<sup>6,15,16</sup> Mula-mula hem dilepaskan dari hemoglobin eritrosit yang mengalami hemolisis di sel-sel retikuloendotelial juga dari hemoprotein lain (mioglobin, katalase, peroksidase, sitokrom, nitrit oksida sintase) yang terdapat di berbagai organ dan jaringan. Selanjutnya, globin akan diuraikan menjadi unsur-unsur asam amino pembentuk semula untuk digunakan kembali, zat besi dari hem memasuki depot zat besi untuk pemakaian kembali, sedangkan hem akan dikatabolisme melalui serangkaian proses enzimatik. Bagian porfirin tanpa besi pada hem juga diuraikan, terutama di dalam sel-sel retikuloendotelial pada hati, limpa dan sumsum tulang.<sup>9,17</sup>

Hem yang dilepaskan oleh hemoglobin didegradasi secara enzimatik dalam fraksi mikrosom sel retikuloendotelial. Proses ini dikatalisir oleh enzim hem oksigenase, yaitu enzim pertama dan enzim pembatas-kecepatan (*a rate-limiting enzyme*) yang bekerja dalam suatu reaksi dua tahap dengan melibatkan *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate* (NADPH) dan oksigen ( $O_2$ ). hem direduksi oleh NADPH,  $O_2$  ditambahkan pada jembatan  $\alpha$ -metenil antara pirol I dan II porfirin, penambahan lebih banyak oksigen, ion fero ( $Fe^{2+}$ ) dilepaskan, menghasilkan karbon monoksida (CO) dan biliverdin IX- $\alpha$  dengan jumlah ekuimolar dari pemecahan cincin tetrapirrol.<sup>9,17,38,39</sup>



Gambar 3. Alur metabolisme pemecahan hem dan pembentukan bilirubin

Sumber: Dennery PA, Seidman DS, Stevenson DK. Neonatal hyperbilirubinemia. N England J Med. 2001;344(8):581-90.<sup>9</sup>

Proses selanjutnya CO mengaktivasi GC (*guanylyl cyclase*) menghasilkan pembentukan cGMP (*cyclic guanosine monophosphate*). CO juga dapat menggeser O<sub>2</sub> dari oksi hemoglobin (HbO) atau diekshalasi. Reaksi ini melepaskan O<sub>2</sub> dan menghasilkan karboksi hemoglobin (COHb). Selanjutnya COHb dapat bereaksi kembali dengan oksigen, menghasilkan oksi hemoglobin (HbO<sub>2</sub>) dan CO yang diekshalasi.<sup>9,17,39</sup>

Biliverdin dari hasil degradasi hem direduksi menjadi bilirubin oleh enzim biliverdin reduktase dalam sitosol. Bilirubin inilah (suatu pigmen berwarna kuning) yang disebut sebagai bilirubin indirek, dalam jaringan perifer diikat oleh albumin, diangkut oleh plasma ke dalam hati. Peristiwa metabolisme ini dapat dibagi menjadi tiga tahapan, (1) pengambilan bilirubin oleh sel parenkim hati, (2)



konjugasi bilirubin dalam retikulum endoplasma halus, dan (3) sekresi bilirubin direk (*conjugated bilirubin*) ke dalam empedu.<sup>13,17,38-40</sup> Penjabaran proses di atas dapat diketahui bahwa produksi bilirubin sebagian besar dihasilkan dari pemecahan hemoglobin yang berasal dari adanya hemolisis eritrosit, sehingga dapat dikatakan kadar bilirubin pada neonatus dapat dipakai sebagai petunjuk adanya hemolisis eritrosit.<sup>9,14</sup>

Hemolisis adalah destruksi eritrosit dimana membran sel mengalami lisis, pada preparat darah hapus terlihat gambaran eritrosit yang mengalami kerusakan, yaitu adanya sel eritrosit yang tidak normal: anisositosis, poikilositosis, krenasi, sel burr, sel lepuh, fragmentosit, sferosit, dan eliptosit.<sup>22</sup>

Enzim *glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD)* berfungsi sebagai katalisator proses oksidatif jalur pentosa fosfat, suatu jalur alternatif pada metabolisme glukosa yang merupakan satu-satunya jalur yang menyediakan NADPH dalam sel eritrosit yang tidak mempunyai mitokondria.<sup>41,42</sup> NADPH dibentuk bila *glucose-6-phosphat (G6P)* dioksidasi menjadi *6-phosphogluconat (6PG)* dengan bantuan enzim G6PD. Fungsi utama NADPH adalah mereduksi glutation teroksidasi (glutation bentuk disulfida/GSSG) menjadi glutation tereduksi (glutation bentuk sulfidril/GSH). GSH berperanan sangat penting bagi sel eritrosit, karena dengan gugus sulfidril bebasnya (SH) berfungsi sebagai pemecah peroksida dan oksidan radikal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mempertahankan residu sistein pada hemoglobin dan protein lain pada sel eritrosit terutama pada membran sel agar tetap dalam bentuk tereduksi dan aktif sehingga dapat mempertahankan struktur normal eritrosit. dengan besi dalam bentuk *ferro*, serta berperan pada

proses detoksifikasi. GSH ini dapat menjaga keutuhan eritrosit sekaligus mencegah hemolitik.<sup>32,41,43,44</sup>

Defisiensi G6PD mengakibatkan kadar NADPH serta GSH berkurang, apabila terpapar bahan eksogen yang potensial menimbulkan kerusakan oksidatif (stres oksidatif), antara lain: obat-obatan, bahan kimia (naftalen, *benzena*), dan infeksi, akan mempengaruhi pembentukan ikatan disulfide, mengakibatkan hemoglobin mengalami denaturasi dan membentuk partikel kental (*Heinz bodies*). Badan Heinz ini akan berikatan dengan membran sel, menyebabkan perubahan isi, elastisitas, dan permeabilitas sel. Eritrosit pada kondisi tersebut dikenali sebagai eritrosit yang rusak dan akan dihancurkan oleh sistem retikulo-endotelial (lien, hepar dan sumsum tulang), mengalami proses hemolitik.<sup>42</sup> Meskipun gen G6PD terdapat pada semua jaringan tubuh, tetapi efek defisiensi dalam eritrosit pengaruhnya sangat besar karena enzim G6PD diperlukan dalam menghasilkan energi untuk mempertahankan umur eritrosit, membawa oksigen, regulasi transport ion dan air ke dalam dan keluar sel, membantu pembuangan karbondioksida dan proton yang terbentuk pada metabolisme jaringan. Karena tidak ada mitokondria di dalam eritrosit maka oksidasi G6PD hanya bersumber dari NADPH, bila kadar enzim G6PD menurun, eritrosit mengalami kekurangan energi dan perubahan bentuk yang memudahkan mengalami lisis bila mengalami stres oksidatif.<sup>41,42</sup> Sampel dengan defisiensi enzim G6PD tidak kami sertakan pada penelitian ini.

### **2.1.3. Penyebab hiperbilirubinemia**

Kadar bilirubin serum total pada neonatus didominasi oleh peningkatan

kadar bilirubin indirek. Penyebabnya antara lain:<sup>11,12,17</sup>

1. Proses fisiologis

Peningkatan kadar bilirubin indirek serum pada minggu pertama kehidupan, terjadi terutama pada BKB. Keadaan ini disebabkan karena:

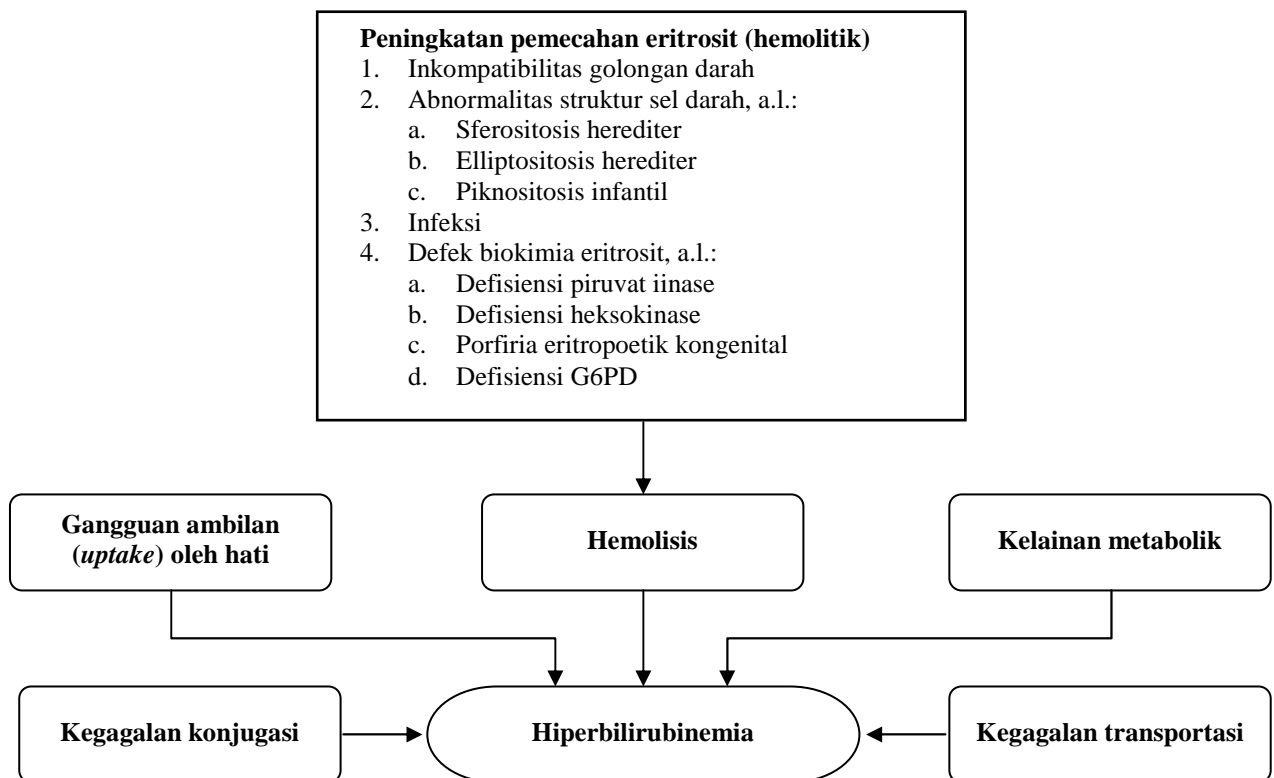
- i. Beban bilirubin (*bilirubin load*) meningkat pada neonatus: volume eritrosit meningkat sebagai kompensasi tekanan partial oksigen yang rendah, umur eritrosit pendek, dan peningkatan resirkulasi bilirubin entero hepatal.
- ii. Kurangnya "*uptake* hati" sebagai dampak penurunan kadar protein pengikat bilirubin (seperti ligandin).
- iii. Kurangnya konjugasi karena masih rendahnya aktivitas enzim glukoronil transferase.

2. Peningkatan produksi

Peningkatan berlebihan lisis eritrosit (hemolisis) menyebabkan peningkatan jumlah hem yang dilepaskan sehingga kadar bilirubin indirek meningkat, hal ini dapat disebabkan antara lain:

- i. Inkompatibilitas golongan darah: Rhesus, ABO, dan lain-lain.
  - ii. Defek biokimia (enzim) eritrosit, antara lain: defisiensi enzim G6PD, defisiensi *Pyruvat Kinase*, defisiensi *Hexokinase*.
  - iii. Abnormalitas struktur (membran) eritrosit, antara lain: Sferositosis herediter, Elliptositosis herediter, Piknositosis infantil.
  - iv. Infeksi, antara lain: Bakterial, Viral, dan Protozoa.
3. Kelainan ambilan (*uptake*) oleh hati.

4. Defek/kegagalan konjugasi.
  - i. Defisiensi kongenital enzim glukoronil transferase (misalnya pada penyakit sindroma Crigler-Najjar dan sindroma Gilbert).
  - ii. Inhibisi enzim glukoronil transferase (misalnya karena pengaruh obat dan sindroma Lucey-Driscoll).
5. Sekuestrasi eritrosit, seperti: sefal hematoma, perdarahan intrakranial, dan perdarahan saluran cerna, akan menyebabkan peningkatan hemolisis dan membebani jalur degradasi bilirubin.



Gambar 4. Penyebab terjadinya hiperbilirubinemia patologis (modifikasi dari beberapa sumber).<sup>7,9,12</sup>

#### 2.1.4. Dampak hiperbilirubinemia

Bilirubin indirek dalam keadaan tidak terikat dengan albumin (dalam bentuk bebas), disebut juga bilirubin anion, karena sifat hidrofobitasnya dapat dengan mudah melewati sawar darah otak untuk masuk ke dalam sistem saraf pusat.<sup>9,11,39,45</sup> Bilirubin anion berikatan dengan fosfolipid dan juga gangliosida pada membran permukaan neuronal, membentuk kompleks bilirubin anion-fosfolipid yang tidak stabil. Bilirubin anion mengambil ion hidrogen dan membentuk asam bilirubin yang menempel kuat pada membran. Pengendapan bilirubin pada pH yang rendah mempunyai efek toksik, menimbulkan kerusakan membran plasma, mempermudah masuknya bilirubin anion ekstraseluler masuk ke dalam sel neuron.<sup>45</sup>

Bilirubin anion tersebut berikatan kembali dengan membran fosfolipid dari organela sub seluler seperti mitokondria, retikulum endoplasma, dan nukleus, menyebabkan terbentuknya kembali asam bilirubin dan menimbulkan kerusakan membran sub seluler.<sup>45</sup> Bilirubin ini menghambat enzim mitokondrial, mengganggu sintesis DNA, menginduksi patahnya benang DNA, dan menghambat sintesis dan fosforilasi protein, yang pada akhirnya menyebabkan lisisnya membran sel yang menuju kepada kematian sel neuron.<sup>9,45</sup> Bilirubin mempunyai afinitas terhadap fosfolipid membran, dan menghambat pengambilan tirosin, yaitu suatu penanda transmisi sinaptik serta menghambat fungsi kanal ion reseptor *N-methyl-d-aspartate*, mengganggu signal neuroeksitasi sehingga memperlambat konduksi saraf.<sup>9</sup> Karena sifat hidrofobitasnya maka hanya bilirubin indirek yang bisa melewati sawar darah otak untuk masuk ke dalam

sistem saraf pusat.<sup>9,11,39</sup> Selain kerusakan pada sel-sel neuron, bilirubin dapat juga menghambat pertukaran elektrolit dan transport air di ginjal.<sup>46</sup>

Bilirubin indirek yang terikat albumin dapat pula memasuki susunan saraf pusat apabila permeabilitas sawar darah otak meningkat, yaitu pada keadaan infeksi, asidosis, hiperoksia, sepsis, prematuritas, dan hiperosmolaritas.<sup>9,11,47</sup> Pengendapan bilirubin tersebut menyebabkan kerusakan sel-sel otak menetap yang disebut *Kernicterus*, merupakan perubahan neuropatologi akibat deposisi bilirubin indirek pada jaringan otak, terjadi kerusakan di ganglia dan nukleus batang otak.<sup>9,48,49</sup> Efek neurotoksik bilirubin ini secara klinis disebut ensefalopati bilirubin.<sup>9,39</sup> Gejala dan tanda yang timbul karena adanya ensefalopati bilirubin akut terbagi dalam tiga fase:<sup>7</sup>

1. Hipotonia, letargi, tangis melengking tinggi, dan malas minum.
2. Hipertonia dari otot-otot ekstensor (disertai *opistotonus*, *rigidity*, *oculogyric crisis*, dan *retrocollis*), demam, serta kejang.

Banyak neonatus yang meninggal pada fase ini.

3. Hipotonia kembali setelah usia 1 minggu.

*Kernicterus*/ensefalopati bilirubin dapat terjadi pada bayi sehat aterm, memiliki mortalitas yang tinggi. Neonatus yang dapat bertahan hidup mempunyai gejala sisa seperti palsy serebral, atetosis, paralisis, tuli sensorineural parsial atau komplit, tatapan mata ke arah superior terbatas, displasia dentis, dan defisit intelektual, hal ini semua tentunya berdampak pada kualitas hidup.<sup>7,9,11,12,17</sup> Kepekaan terhadap efek neurotoksik bilirubin bervariasi sesuai dengan tipe sel, maturitas otak, dan metabolisme otak.<sup>9,11,17</sup>

## 2.2. Oksidan, Radikal Bebas, dan Antioksidan

Oksidan adalah senyawa penerima elektron (*electron acceptor*), yaitu senyawa-senyawa yang dapat menarik elektron. Oksidan dapat mengganggu integritas sel karena dapat bereaksi dengan komponen-komponen sel yang penting untuk mempertahankan kehidupan sel, baik komponen struktural (misalnya molekul-molekul penyusun membran) maupun komponen-komponen fungsional (misalnya enzim-enzim dan DNA). Oksidan berasal dari berbagai sumber: dari tubuh sendiri, yang berasal dari proses-proses biologik normal (*fisiologis*) oleh suatu sebab terdapat dalam jumlah besar, dari proses-proses peradangan, dari luar tubuh (obat-obatan dan senyawa pencemar), dan dari akibat radiasi.<sup>21,50</sup> Oksidan dapat menimbulkan kerusakan sel dan menjadi penyebab atau mendasari berbagai keadaan patologis seperti penyakit kardiovaskuler, penyakit respiratorik, gangguan sistem kekebalan, karsinogenesis, bahkan diperkirakan ikut berperan dalam proses penuaan (*aging*).<sup>51</sup> Pembentukan oksidan atau radikal bebas yang melebihi *antioxidant defences capacity* menyebabkan kerusakan oksidatif dan meningkatkan SOR.<sup>20,22</sup>

SOR adalah metabolit oksigen utama yang dihasilkan melalui reduksi satu elektron, yang terdiri dari hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ion superoksida ( $\text{O}_2^-$ ), radikal peroksil ( $\text{RCOO}^\cdot$ ), radikal bebas hidroksil ( $\text{OH}^\cdot$ ), dan singlet oksigen ( $\text{O}_2$ ). Diantara senyawa oksigen reaktif ini yang paling berbahaya adalah  $\text{OH}^\cdot$  karena mempunyai reaktifitas tinggi, dapat merusak 3 jenis senyawa yang penting untuk mempertahankan integritas sel, yaitu: asam lemak, khususnya asam lemak tak

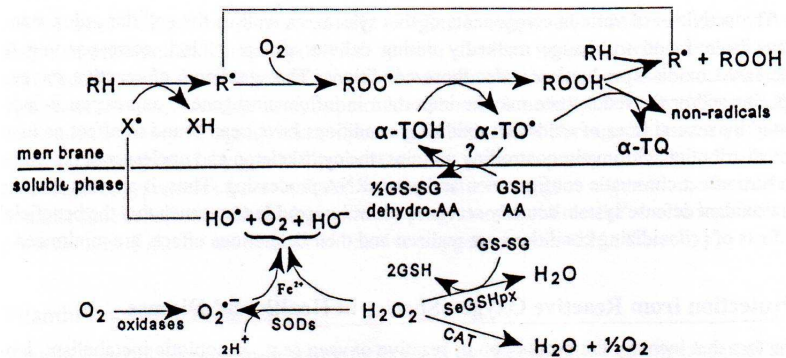
jenuh yang merupakan komponen penting fosfolipid penyusun membran sel, DNA, dan protein, yang memegang berbagai peran penting seperti enzim.<sup>21,52</sup>

Radikal bebas adalah atom atau molekul (kumpulan atom) yang memiliki elektron yang tak berpasangan (*unpaired electron*), yang cenderung untuk membentuk pasangan dengan menarik elektron dari senyawa lain sehingga terbentuk radikal baru.<sup>21,52</sup> Radikal bebas mempunyai sifat reaktifitas tinggi, karena kecenderungan menarik elektron, serta dapat mengubah suatu molekul menjadi suatu radikal. Karena kecenderungannya untuk menarik elektron, maka sama halnya dengan oksidan, radikal bebas adalah penerima elektron. Karena itu radikal bebas digolongkan dalam oksidan, tetapi tidak setiap oksidan adalah radikal bebas.<sup>21</sup>

Radikal bebas cenderung membentuk radikal yang baru lagi apabila menjumpai molekul lain, sehingga terjadi reaksi rantai (*chain reaction*) dan bersifat merusak. Daya perusak radikal bebas jauh lebih besar dibandingkan dengan oksidan biasa. Reaksi rantai tersebut baru berhenti apabila radikal tersebut dapat diredam. Karena reaktifitasnya yang tinggi, radikal bebas tidak stabil dan berumur pendek, walaupun begitu ada beberapa jenis radikal bebas yang relatif stabil, salah satunya adalah vitamin E, dimana hal ini berhubungan struktur molekul yang memungkinkan terjadi resonansi, radikal vitamin E tidak terlalu reaktif, sehingga dapat berfungsi sebagai peredam (*quencher*).<sup>51</sup>

Antioksidan adalah senyawa-senyawa pemberi elektron (*electron donors*), secara biologis dapat diartikan sebagai senyawa-senyawa yang dapat meredam dampak negatif oksidan, termasuk enzim-enzim dan protein pengikat logam.





Gambar 5. Peranan antioksidan.

Sumber: Combs GF. The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health, 2<sup>nd</sup> ed, Orlando 1998, Academic Press. <sup>53</sup>

Antioksidan dapat bekerja sebagai antioksidan pencegah, dengan cara mencegah terjadinya radikal hidroksil dan terhimpunnya senyawa-senyawa oksidan berlebihan, serta antioksidan pemutus rantai, mencegah reaksi rantai berlanjut dengan memutus rantai oksidan.<sup>21,54</sup>

Antioksidan pencegah (*preventif antioxidants*) diantaranya adalah superoksida dismutase (SOD), katalase dan peroksidase (glutation peroksidase). Antioksidan pemutus rantai (*chain-breaking antioxidants*) diantaranya adalah vitamin E (tokoferol), asam askorbat (vitamin C), dan  $\beta$ -karoten. Senyawa glutation (GSH) dan sistein (Cys-SH) dapat berperan sebagai antioksidan pencegah maupun antioksidan pemutus rantai.<sup>54</sup>

### 2.2.1. Dampak oksidan dan radikal bebas

#### Dampak pada membran sel

Pembentukan oksidan/radikal bebas yang melebihi antioxidant defences capacity menyebabkan kerusakan oksidatif, menimbulkan SOR, merusak

komponen-komponen sel yang penting untuk mempertahankan integritas dan kehidupan sel. Komponen terpenting membran sel adalah fosfolipid, glikolipid, dan kolesterol. Dua komponen pertama mengandung asam lemak tak jenuh (asam linoleat, linolenat dan arakhidonat) yang sangat rawan terhadap serangan radikal, terutama radikal hidroksil, menyebabkan reaksi rantai yang dikenal dengan peroksidasi lipid (*lipid peroxidation*), berdampak terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa yang bersifat toksik terhadap sel, antara lain aldehida, seperti *malondialdehyde (MDA)*, 9-hidroksi-nonenal serta bermacam-macam hidrokarbon seperti etana ( $C_2H_6$ ) dan pentana ( $C_5H_{12}$ ). Dapat pula terjadi ikatan silang (*cross-linking*) antara dua rantai asam lemak atau antara asam lemak dan rantai peptida (protein) yang timbul karena reaksi dua radikal. Hal-hal tersebut menyebabkan kerusakan parah membran sel tak terkecuali membran eritrosit.<sup>20-22</sup>

Oksidan akan merubah hemoglobin dari eritrosit menjadi met hemoglobin (met Hb) yang akhirnya mengalami denaturasi dan presipitasi dalam sel eritrosit yang dikenal sebagai badan Heinz, berakibat penurunan deformabilitas eritrosit sehingga tidak dapat melalui sinusoid limpa, terperangkap dan dihancurkan di dalamnya (hemolisis ekstravaskuler). Oksidan bereaksi juga dengan protein dan lipid membran sel, menyebabkan perubahan deformabilitas sehingga sel mudah hancur (hemolisis intravaskuler).<sup>55,56</sup>

### **Dampak pada DNA**

Perubahan pada DNA antara lain berupa: hidroksilasi basa timin dan sitosin, pembukaan inti purin dan pirimidin serta terputusnya rantai fosfodiester.

Bila kerusakannya tidak terlalu parah maka masih bisa diperbaiki oleh sistem perbaikan DNA (*DNA repair system*), namun apabila kerusakan parah misalnya rantai terputus-putus di berbagai tempat, maka kerusakan tersebut tak dapat diperbaiki dan replikasi sel terganggu menimbulkan mutasi DNA.<sup>21</sup>

### **Dampak pada protein**

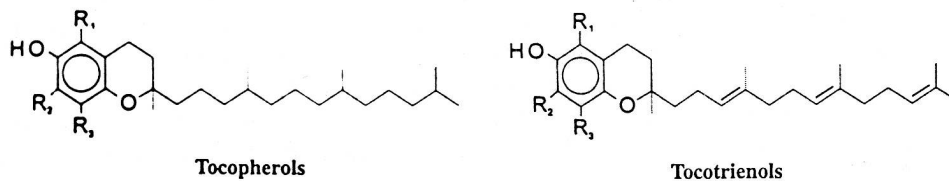
Oksidan dapat merusak protein karena dapat mengadakan reaksi dengan asam amino penyusun protein, diantaranya yang paling rawan adalah sistein. Sistein mengandung gugusan sulfhidril (SH) yang paling peka terhadap radikal bebas seperti radikal OH<sup>-</sup> membentuk ikatan disulfida (-S-S-) sehingga protein kehilangan fungsi biologisnya.<sup>21</sup>

## **2.3. Vitamin E**

### **2.3.1. Metabolisme vitamin E**

Vitamin E terdiri atas 2 kelas substansi aktif biologis yaitu tokoferol dan tokotrienol, dimana yang terpenting adalah  $\alpha$ -tokoferol.<sup>57</sup> Struktur kimia vitamin E terdiri atas rantai samping gugus merupakan nukleus *methylated 6-chromanol* (3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-6-ol), kemudian 3 unit isoprenoid, dan ikatan ester atau hidroksil bebas pada C-6 dari nukleus chromanol.<sup>53,58</sup>

Seperti vitamin larut lemak yang lain, vitamin E diabsorpsi di usus halus secara difusi, absorpsinya tergantung adanya lemak dalam diet, fungsi kelenjar biliar dan pankreas yang baik. Vitamin E tidak mempunyai protein pembawa yang spesifik dalam plasma, vitamin E yang terabsorpsi bergabung ke dalam



Vitamer	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
α-Tocopherol/α-tocotrienol	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
β-Tocopherol/β-tocotrienol	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
γ-Tocopherol/γ-tocotrienol	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
δ-Tocopherol/δ-tocotrienol	H	H	CH <sub>3</sub>
Tocol/tocotrienol	H	H	H

Gambar 6. Struktur kimia Vitamin E

Sumber: Combs GF. *The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health*, ed 2, Orlando 1998, Academic Press.<sup>59</sup>

kilomikron, yang secara cepat berpindah ke lipoprotein plasma dimana dia terikat tidak spesifik.<sup>57</sup>

Vitamin E ditangkap oleh hepar dan bergabung dengan *Very-Low-Density Lipoprotein* (VLDL), lebih banyak dalam bentuk α-tokoferol dibanding bentuk yang lain, untuk kemudian disekresikan kembali. Sebagian besar sisa VLDL kaya trigliserida akan kembali ke hepar, sebagian lagi berubah oleh lipoprotein lipase menjadi *Low-Density Lipoprotein* (LDL). Selama proses ini vitamin E juga secara spontan berpindah ke lipoprotein densitas tinggi (*High-Density Lipoprotein* / HDL). Tokoferol plasma lebih banyak didistribusikan oleh LDL dan HDL. Transpor vitamin E oleh *polyunsaturated lipids* menjamin perlindungan lipid tersebut terhadap radikal bebas, kadar tokoferol yang bersirkulasi cenderung sesuai dengan kadar total lipid dan kolesterol.<sup>53</sup>

Masuknya vitamin E ke dalam sel dapat terjadi melalui proses mediasi reseptor (LDL membawa vitamin ini ke dalam sel) atau melalui proses yang

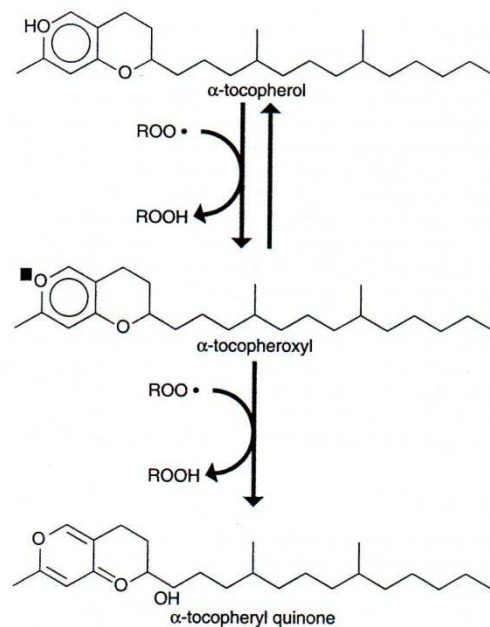
dibantu oleh lipoprotein lipase dimana vitamin E dilepaskan dari kilomikron dan VLDL. Di dalam sel, transpor intraseluler dari tokoferol membutuhkan protein pengikat tokoferol intraseluler. Vitamin E pada sebagian besar sel-sel non adiposa terdapat pada membran sel dimana dapat dimobilisasi.<sup>57</sup>

### 2.3.2. Vitamin E sebagai antioksidan

Vitamin E merupakan antioksidan larut lemak dalam sel. Berada pada bagian lemak dalam membran sel, melindungi fosfolipid *unsaturated* dalam membran dari degradasi oksidatif terhadap oksigen reaktif spesies yang tinggi dan radikal bebas yang lain. Vitamin E mempunyai kemampuan untuk mengurangi radikal bebas menjadi metabolit yang tidak berbahaya dengan memberikan gugus hidrogennya. Vitamin E dikenal sebagai komponen penting dari sistem pertahanan antioksidan seluler, yang melibatkan enzim-enzim yang lain seperti superoksida dismutase (SODs), glutathion peroksidase (GPXs), glutathion reduktase (GR), katalase, tioredoksin reduktase (TR), dan faktor-faktor non enzim (misalnya glutathion, asam urat), yang mana banyak tergantung pada zat gizi esensial yang lain.<sup>57</sup>

Dalam fungsinya sebagai antioksidan vitamin E mengalami oksidasi primer menjadi *tocopherylquinone*, prosesnya melalui radikal *tocopheroxyl* semi stabil. Oksidasi monovalen tokoferol menjadi radikal *tocopheroxyl* adalah reaksi yang dapat kembali, tetapi proses oksidasi selanjutnya satu arah. *Tocopherylquinone* tidak mempunyai aktivitas vitamin E, produksinya menggambarkan katabolisme dan hilangnya vitamin dari sistem.  $\alpha$ -

*tocopherylquinone* dapat tereduksi menjadi  $\alpha$ -*tocopherylhydroquinone*, yang dapat terkonjugasi dengan asam glukoronat disekresikan dalam empedu, dan kemudian diekskresikan dalam feses, ini merupakan jalur eliminasi dari vitamin E. Keadaan asupan vitamin E normal, kurang dari 1% vitamin E yang diabsorpsi dikeluarkan melalui urin.<sup>53,57</sup> Vitamin E dapat didaur ulang dengan reduksi radikal *tocopheroxyl* kembali menjadi tokoferol. Beberapa mekanisme dikemukakan untuk reduksi in vivo *tocopheroxyl* oleh beberapa reduktan intraselular. Penelitian in vitro menunjukkan bahwa proses ini dapat terjadi dalam liposom oleh asam askorbat (vitamin C), dalam mikrosom oleh NAD(P)H, dan dalam mitokondria oleh NADH dan suksinat, dengan dua sistem terakhir



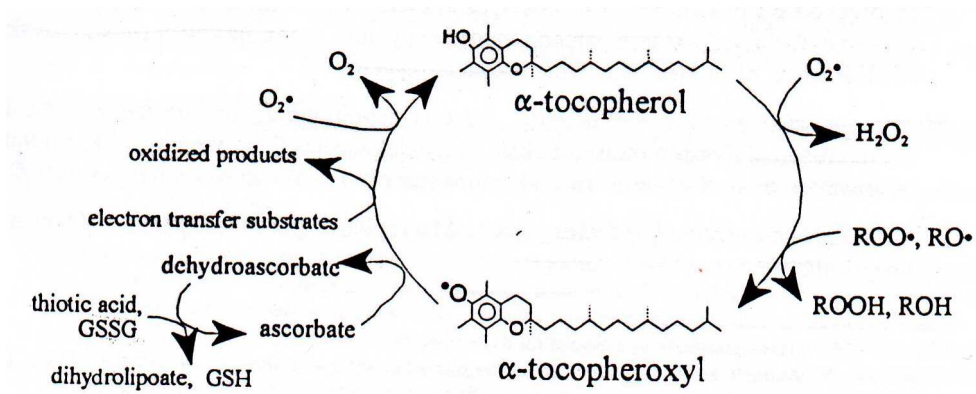
Gambar 7. Mekanisme vitamin E untuk mengurangi radikal-radikal bebas menjadi metabolit yang tidak berbahaya dengan memberikan gugus hidrogennya.

Sumber: Gallagher ML. Vitamins. In: Mahan LK, Escott-Stump S. Krause's food, nutrition, & diet therapy. Saunders. Pennsylvania, 2004.<sup>57</sup>

menunjukkan sinergisme dengan glutathion tereduksi (GSH).<sup>53</sup>

Vitamin E berperan sebagai antioksidan biologis dengan fungsi pentingnya memelihara integritas membran semua sel dalam tubuh. Fungsi antioksidan ini meliputi reduksi radikal bebas, perlindungan terhadap reaksi-reaksi yang berpotensi merusak seperti SOR.<sup>53</sup> Vitamin E mempunyai kemampuan antioksidan dalam memutus reaksi rantai di antara *Polyunsaturated fatty acids* (PUFAs) dalam membran dimana dia berada, hal ini karena reaktifitas dari *phenolic hydrogen* pada kelompok C-6 hidroksil dan kemampuan dari sistem cincin *chromanol* untuk menstabilkan elektron yang tidak berpasangan. Kemampuan ini, yang disebut "penyapu" radikal bebas, melibatkan donasi hidrogen *phenol* ke radikal bebas dari asam lemak (atau  $O_2^-$ ) untuk melindungi serangan senyawa tersebut pada PUFAs yang lain.<sup>53</sup>

Dalam menjalankan fungsinya sebagai antioksidan, vitamin E berubah bentuk dari bentuk alkoholnya menjadi suatu bentuk antara radikal semistabil, radikal *tocopheroxyl* (atau *chromanoxyl*). Tidak seperti radikal bebas yang



Gambar 8. Siklus vitamin E.

Sumber: Combs GF. The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health, 2<sup>nd</sup> ed, Orlando 1998, Academic Press.<sup>53</sup>

dibentuk dari PUFAs, radikal *tocopheroxyl* relatif tidak reaktif sehingga dapat menghentikan proses penyebarluasan perusakan oleh peroksidase lipid. *Tocopheroxyl* cukup stabil bereaksi dengan suatu radikal peroksil yang kedua untuk membentuk senyawa inaktif, produk nonradikal termasuk *tocopherylquinone*. Karena  $\alpha$ -tokoferol dapat bersaing dengan radikal peroksil lebih cepat dibanding PUFAs, sejumlah kecil vitamin mampu untuk memberikan efek proteksi antioksidan dalam jumlah besar.<sup>53</sup>

Sebagaimana vitamin E sebagai proteksi membran, kadar tokoferol plasma berhubungan berkebalikan terhadap kerentanan terhadap hemolisis oksidatif. Hubungan ini membuat kadar alfa-tokoferol berguna sebagai parameter status vitamin E. Kadar  $\geq 0,5$  mg/dL pada orang sehat berhubungan dengan perlindungan terhadap hemolisis dan dipakai sebagai indikasi kecukupan nutrisi. Kadar tokoferol ibu meningkat selama kehamilan, tetapi kadar pada fetus tetap rendah, hal ini menunjukkan adanya penahan pada aliran transplasental dari vitamin ini.<sup>53</sup> Kadar vitamin E pada neonatus saat di dalam kandungan hanya sedikit dipengaruhi oleh asupan vitamin E ibu melalui transfer plasental, mengakibatkan bayi baru lahir mempunyai kadar yang rendah. Bayi prematur mempunyai risiko kekurangan vitamin E karena kapasitas absorpsi lemak yang terbatas.<sup>57,60</sup> Air susu ibu (ASI), terutama kolustrum mengandung vitamin E konsentrasi tinggi. BCB mempunyai kadar vitamin E sepertiga dari kadar vitamin E ibunya, dalam 4-6 hari menyusui kadarnya akan sama dengan kadar vitamin E pada dewasa. (Ostrea dkk,1986).<sup>60</sup>

Vitamin E efektif sebagai terapi pada beberapa kelainan pada manusia.



Tabel 2. Kadar vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) serum pada manusia.

Kelompok	$\alpha$ -tokoferol (mg/dl)	Kelompok	$\alpha$ -tokoferol (mg/dl)
Dewasa sehat	$0,85 \pm 0,03$	Bayi	
Wanita post partum	$1,33 \pm 0,40$	Aterm	$0,22 \pm 0,10$
Anak usia 2-12 tahun	$0,72 \pm 0,02$	Prematur	$0,23 \pm 0,10$
Pasien dengan kistik fibrosis, 1-19 tahun	$0,15 \pm 0,15$	Prematur saat usia 1 bulan	$0,13 \pm 0,05$
Pasien dengan atresia bilier, 3-15 bulan	$0,10 \pm 0,10$	2 bulan, dengan susu botol	$0,33 \pm 0,15$
		2 bulan, dengan ASI	$0,71 \pm 0,25$
		5 bulan	$0,42 \pm 0,20$
		2 tahun	$0,58 \pm 0,20$

Sumber: Combs GF. Vitamin E. In: Combs GF. The Vitamins, Fundamental Aspects in Nutrition and Health 2nd ed. Academic Press. California, 1998.<sup>53</sup>

Seperti pada anemia hemolisis pada bayi prematur, klaudikasio intermitten, dan hemolisis kronik pada pasien dengan defisiensi *glucose-6-phosphate dehydrogenase*, melindungi bayi terhadap *retinopathy of prematurity*.<sup>53</sup>

### 2.3.3. Defisiensi vitamin E

Defisiensi vitamin E terjadi bila asupan kurang atau absorpsi terganggu. Malabsorpsi lemak juga dapat menimbulkan defisiensi vitamin E, karena pembawa vitamin ini adalah lemak. Defisiensi vitamin E dapat mempengaruhi beberapa sistem organ yang berbeda. Manifestasi kekurangan vitamin E sangat beragam, terkait dengan fungsinya sebagai pelindung membran sel terhadap SOR yang terbentuk selama metabolisme atau karena pengaruh lingkungan. Secara umum defisiensi ini mempengaruhi 3 sistem yaitu neuromuskuler, vaskuler, dan reproduksi.<sup>53,57</sup> Kelainan yang timbul pada sistem neuromuskuler adalah ataksia, kelemahan otot, penurunan refleks-refleks, neuropati perifer, serta degenerasi

saraf dan otot. Defisiensi berat yang terjadi lama dapat berakibat kebutaan, irama jantung abnormal, dan penyakit jantung. Defisiensi vitamin E pada beberapa hewan coba dapat mengakibatkan peningkatan permeabilitas membran kapiler, peningkatan jumlah dan agregasi trombosit, pada manusia dapat menimbulkan fragilitas eritrosit, penurunan jumlah eritrosit, serta anemia.<sup>53</sup>

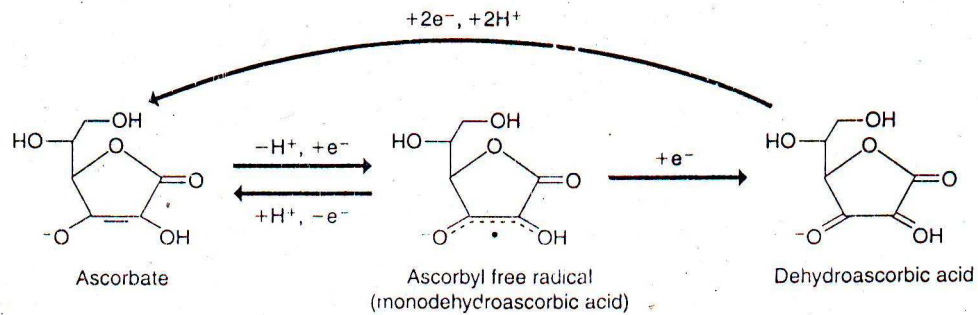
Berbagai tanda defisiensi vitamin E ini merupakan akibat adanya disfungsi membran disebabkan degradasi oksidatif dari membran fosfolipid *polyunsaturated* (peroksidasi lipid) dan/atau terganggunya proses seluler penting yang lain, sehingga menyebabkan kerusakan sel dan nekrosis.<sup>53,57</sup>

## **2.4. Vitamin C**

### **2.4.1. Metabolisme vitamin C sebagai antioksidan**

Vitamin C (asam askorbat) adalah rantai 6 karbon lakton yang dibentuk dari glukosa dalam hepar pada sebagian besar spesies mamalia. Manusia dan sebagian kecil spesies yang lain tidak dapat mensintesis asam askorbat, tidak mempunyai enzim gulonolakton oksidase, yang esensial pada sintesis prekursor asam askorbat 2-keto-l-gulonolakton. Asam askorbat sangat penting pada banyak fungsi fisiologis, diantaranya adalah fungsi antioksidan dalam melindungi sel bersama  $\alpha$ -tokoferol, *reduced glutathione*, dan faktor-faktor yang lain.<sup>26,61</sup>

Absorpsi asam askorbat melalui proses “*uptake*” yang melewati dua mekanisme. Pertama melibatkan transport aktif Na dan transporter bergantung energi, kedua melibatkan transport dari asam dehidroaskorbat melalui satu atau lebih *transporter* glukosa.<sup>26,61</sup> Asam dehidroaskorbat cepat tereduksi intraseluler



Gambar 9. Struktur kimia Vitamin C

Sumber: Gallagher ML. Vitamins. In: Mahan LK, Escott-Stump S. Krause's food, nutrition, & diet therapy. Saunders. Pennsylvania, 2004.<sup>57</sup>

menjadi asam askorbat, kemungkinan oleh glutaredoksin reduktase dan mungkin secara kimiawi oleh glutathion tereduksi (GSH).<sup>61</sup>

Asam askorbat ditransportasikan dalam plasma, mudah melepaskan elektron karena oksidasi monovalen reversibel menjadi radikal askorbil yang berperan dalam sistem redoks biokimia. Dehidroaskorbat tidak terdeteksi dalam plasma, dan terbentuk sementara oleh oksidasi asam askorbat secara ekstraseluler.<sup>26,61</sup> Fungsi metabolik asam askorbat adalah kofaktor enzim klasik (*hydroxylating enzymes*), agen protektif (sebagai hidrosilase pada biosintesis kolagen), dan sebagai radikal askorbil dalam reaksi dengan metal ion transisi.<sup>61</sup>

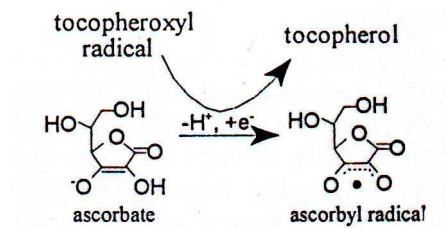
Asam askorbat mampu bereaksi dengan radikal bebas, mengalami oksidasi dengan kehilangan satu elektronnya. Oksidasi yang pertama menghasilkan radikal bebas askorbil dan yang kedua terbentuk asam dehidro-L-askorbid. Hidrolisis asam dehidroaskorbat menghasilkan asam 2,3-diketo-L-glukonat dimana akan mengalami dekarboksilasi menjadi CO<sub>2</sub>. Asam askorbat dapat bereaksi dengan zat toksik, SOR anion superoksida (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) dan radikal hidroksil (OH<sup>-</sup>). Reaksi tersebut sangat penting pada semua sel-sel aerobik, dimana harus bertahan

melawan toksisitas berbagai elemen yang mengandalkan terminal penerima elektron untuk produksi energi melalui enzim rantai respirasi. Reaksi inilah yang merupakan dasar dari sebagian besar fungsi biologis esensial asam askorbat.<sup>26,61</sup>

Asam askorbat dapat meregenerasi radikal askorbil dengan bantuan enzim semi dehidroaskorbil reduktase, dan NADPH sebagai sumber energi. Regenerasi vitamin C dari dehidroaskorbat melalui reaksi kimia dengan bantuan GSH atau asam lipoat juga dengan bantuan katalisa reduksi oleh GSH-dependen asam dehidroaskorbat reduktase. Keberadaan aktifitas asam dehidroaskorbat reduktase bisa merangsang redoks asam askorbat potensial, secara tidak langsung berperan pada antioksidan yang lain. Hal tersebut penting dalam memperluas fungsi proteksi antioksidan pada sel-sel yang hidrofobi, dimana asam askorbat dapat mengurangi radikal kromanoksil semistabil, yang dapat meregenerasi bentuk aktif metabolik dari antioksidan lipid vitamin E (*α-tocopherol recycling*).<sup>27,61</sup>

## **2.5. Interaksi antar Antioksidan**

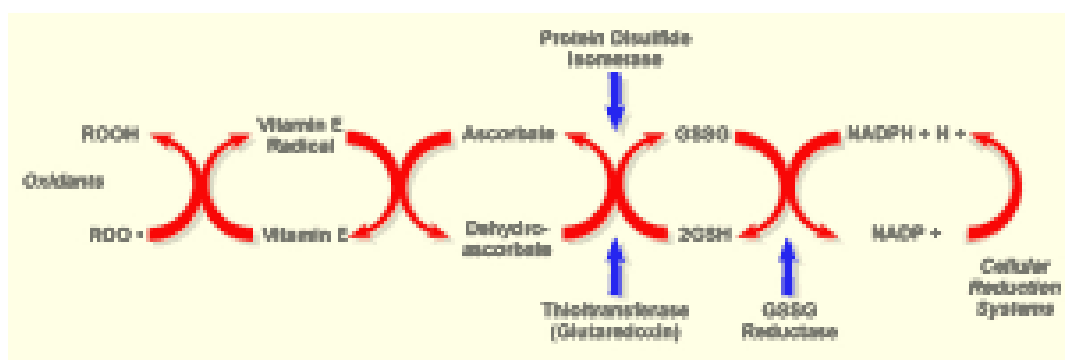
Interaksi antar antioksidan bersifat sinergis dan mempunyai efek saling memberi dimana satu antioksidan melindungi yang lain melawan destruksi oksidatif. Vitamin C mempunyai peran dalam memberdayakan efek proteksi antioksidan vitamin E pada area sel yang hidrofobik dengan cara mengurangi radikal kromanoksil semistabil yang akan membentuk kembali bentuk aktif vitamin E setelah berinteraksi dengan radikal bebas. Selenium sebagai bahan dasar glutathion peroksidase dan vitamin E bekerja secara sinergis dalam fungsinya untuk melindungi membran sel dari serangan peroksidase lipid.<sup>21,27,54</sup>



Gambar 10. Oksidasi askorbat untuk mereduksi radikal *tocopheroxyl*

Sumber: Combs GF. Vitamin E. In: Combs GF. The vitamins, fundamental aspects in nutrition and health, 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press. California, 1998. <sup>61</sup>

Dalam keadaan normal peroksida dan radikal bebas dibuang oleh katalase dan glutathion peroksidase, selanjutnya meningkatkan produksi GSSG. Senyawa GSH pada awalnya dalam suatu glutathion bentuk disulfida (glutathion teroksidasi, GSSG) yang direduksi menjadi glutathion bentuk sulfhidril (glutathion tereduksi, GSH). GSH dibentuk dari GSSG dengan bantuan enzim glutathion reduktase yang keberadaannya tergantung pada NADPH. Fungsi GSH adalah mempertahankan residu sistein pada hemoglobin dan protein-protein lain pada membran eritrosit agar tetap dalam bentuk tereduksi dan aktif, mempertahankan hemoglobin dalam bentuk fero, mempertahankan struktur normal eritrosit, serta berperan dalam



Gambar 11. Siklus vitamin E dan vitamin C sebagai *antioxidant network* bereaksi terhadap radikal bebas

Sumber: Packer L. The antioxidant network. Cyberpac, Inc. 1999.

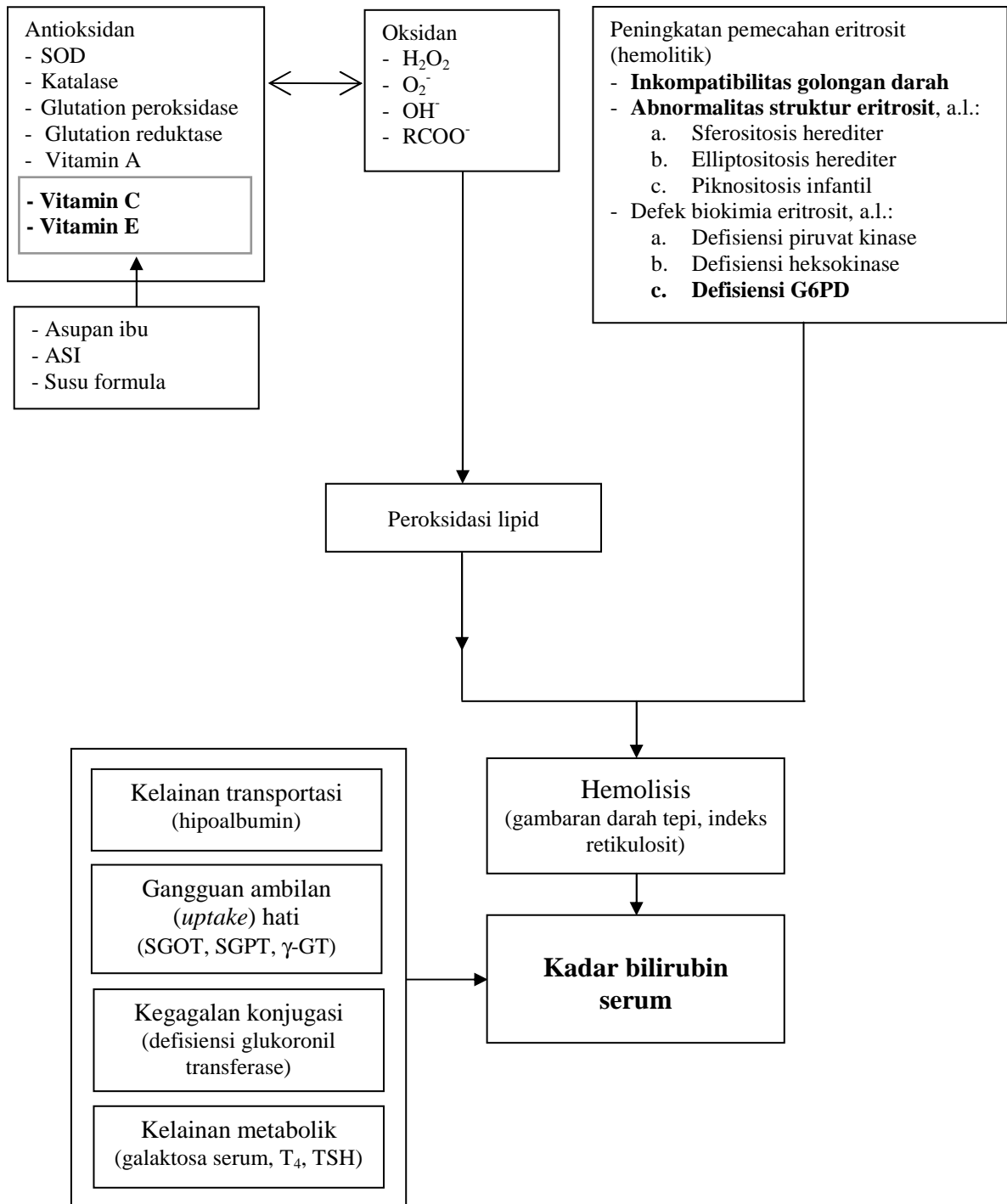
proses detoksifikasi, dimana GSH merupakan substrat kedua bagi enzim glutathione peroxidase dalam menetralkan hidrogen peroksida yang merupakan oksidan yang berpotensi untuk menimbulkan kerusakan oksidatif pada eritrosit.<sup>21,51,52</sup>

Terdapat hubungan yang sinergis antara antioksidan vitamin C dan vitamin E dalam mencegah proses hemolisis, yang kemudian mencegah terjadinya peningkatan kadar bilirubin pada neonatus.

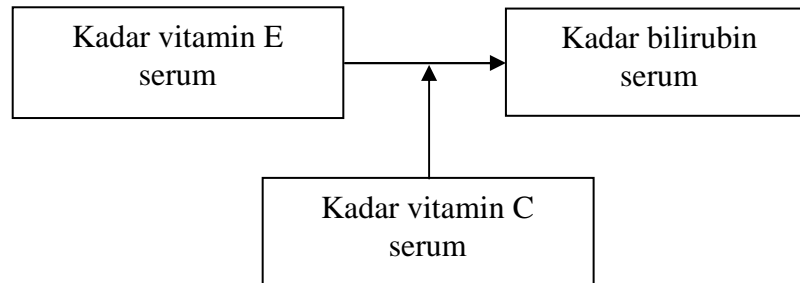
### BAB 3

## KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

### 3.1. Kerangka Teori



### 3.2. Kerangka Konsep



### 3.3. Hipotesis

1. Terdapat hubungan antara kadar vitamin E serum yang rendah dengan peningkatan kadar bilirubin total serum pada neonatus.
2. Kadar vitamin E serum yang rendah merupakan faktor risiko kejadian peningkatan kadar bilirubin total serum yang cenderung patologis pada neonatus.
3. Kadar vitamin E serum yang rendah, dengan memperhitungkan kadar vitamin C yang rendah, merupakan faktor risiko kejadian peningkatan kadar bilirubin total serum yang cenderung patologis pada neonatus.



## **BAB 4**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1. Ruang Lingkup Penelitian**

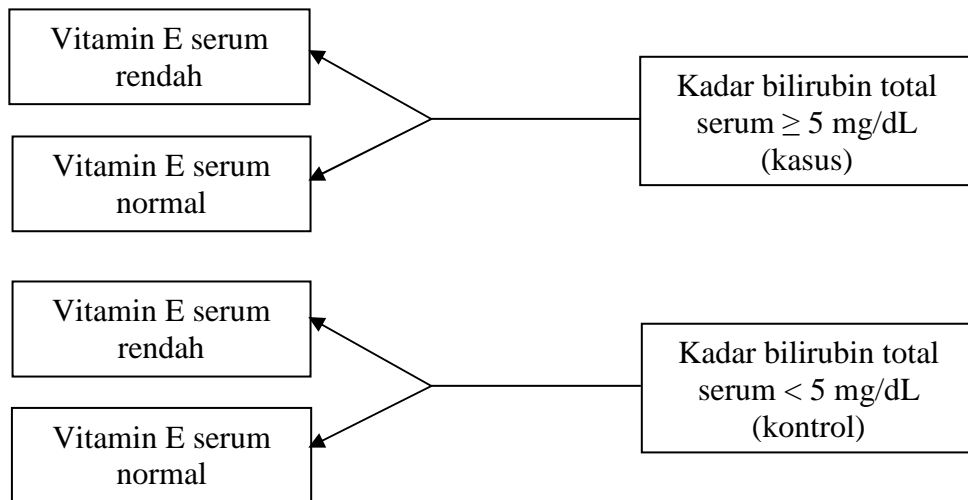
Penelitian dilakukan dalam lingkup SMF Ilmu Kesehatan Anak Sub Bagian Perinatologi RSUP Dr. Kariadi/FK UNDIP Semarang.

#### **4.2. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di bangsal rawat gabung SMF Ilmu Kesehatan Anak RSUP Dr. Kariadi pada bulan Maret sampai dengan Mei 2009. Pemeriksaan laboratorium dilakukan di Instalasi Laboratorium RSUP Dr. Kariadi Semarang dan Laboratorium Bioteknologi Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

#### **4.3. Rancangan Penelitian**

Sampel yang diambil pada hari pertama pada penelitian ini tidak semuanya dapat diamati sampai hari ke 3-4, dalam waktu pengamatan sampel dapat tereksklusi atau *drop out*. Jumlah sampel yang diambil pada masing-masing kelompok baru diketahui setelah sampel dikelompokkan menjadi kasus dan kontrol berdasarkan hasil pemeriksaan bilirubin total serum dari sampel darah hari ke 3-4. Karena cara pengambilan dan pemeriksaan dengan cara tersebut maka penelitian ini merupakan penelitian *nested case-control*, digambarkan sebagai berikut:



#### 4.4. Populasi dan Sampel

##### 4.4.1. Populasi Penelitian

###### a. Populasi Target

Populasi target adalah neonatus sehat, yaitu neonatus dengan kondisi aktif, gerakan simetris, tangis serta minum kuat, napas spontan dan teratur, berat lahir 2500-4000 gram, skor Apgar pada menit pertama  $> 7$ , tidak terdapat kelainan bawaan berat/mayor.<sup>62</sup>

###### b. Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau adalah neonatus sehat yang dirawat di ruang Rawat Gabung (R. 10) RSUP Dr. Kariadi Semarang sejak bulan Maret-Mei 2009.

##### 4.4.2. Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah neonatus sehat yang dirawat di ruang

Rawat Gabung (R. 10) RSUP Dr. Kariadi Semarang yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

1. Kriteria Inklusi

- a. Neonatus sehat selama pengamatan.
- b. Lahir cukup bulan (masa gestasi  $\geq 37$  minggu).
- c. Berat lahir 2500 – 4000 gram.
- d. Kadar bilirubin total serum  $< 5$  mg/dL pada hari pertama kehidupan.
- e. Tidak terdapat kelainan bawaan berat/mayor.
- f. Mendapat persetujuan orang tua/wali untuk diikutsertakan dalam penelitian.

2. Kriteria Eksklusi

Bayi yang dieksklusi adalah bayi dengan:

- a. Abnormalitas struktur eritrosit (kelainan eritrosit herediter).
- b. Inkompatibilitas golongan darah.
- c. Defisiensi enzim G6PD.
- d. Mendapat minum selain ASI.

Kelompok kasus: memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dengan kadar bilirubin total serum hari ke 3-4  $\geq 5$  mg/dL.

Kelompok kontrol: memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dengan kadar bilirubin total serum hari ke 3-4  $< 5$  mg/dL.

#### 4.4.3. Cara Sampling

Pengambilan sampel penelitian dilakukan dengan cara *consecutive sampling*, dimana pemilihan sampel sesuai dengan masuknya neonatus ke ruang Rawat Gabung untuk dirawat. Kontrol diambil dengan jumlah yang sama dengan kasus. Pengambilan sampel dihentikan apabila jumlah sampel telah sesuai dengan besar sampel minimal.

#### 4.4.4. Besar Sampel

Sesuai dengan rancangan penelitian yaitu penelitian kasus kontrol, maka besar sampel dihitung dengan menggunakan rumus besar sampel untuk penelitian kasus kontrol yaitu:<sup>63</sup>

$$n_1 = n_2 = \frac{(z_\alpha \sqrt{2PQ} + z_\beta \sqrt{P_1Q_1 + P_2Q_2})^2}{(P_1 - P_2)^2}$$

Keterangan:

1.  $P_1$  = perkiraan proporsi efek pada subyek dengan faktor risiko (kelompok kasus).
2.  $P_2$  = perkiraan proporsi efek pada kelompok tanpa faktor risiko (kelompok kontrol).

$P_1$  dapat dihitung dari  $P_2$  dengan rumus:

$$P_1 = (OR \times P_2) / (1 - P_2 + OR \times P_2)$$

3.  $P = \frac{1}{2} (P_1 + P_2)$

4.  $Z_{\alpha}$  = tingkat kemaknaan  $\alpha$  (pada penelitian ini  $\alpha = 5\%$ , maka  $Z_{\alpha}=1,96$ )
5.  $Z_{\beta}$  = *power* yang diinginkan (pada penelitian ini *power* ditetapkan sebesar 80%, dengan nilai  $\beta=0,2$  maka  $Z_{\beta}=0,842$ )

Nilai  $P_2$  adalah perkiraan proporsi bayi cukup bulan normal yang mengalami hiperbilirubinemia yaitu sebesar 25%.<sup>7</sup>

Nilai *odd ratio* (OR) untuk kejadian hiperbilirubinemia ditentukan berdasarkan penelitian terdahulu adalah sebesar 4,3.<sup>14</sup>

Hasil penghitungan dengan rumus tersebut diatas didapatkan jumlah sampel minimal yang dibutuhkan untuk setiap kelompok yang diobservasi adalah  $32,06 \approx 33$  neonatus.

Apabila diperkirakan kemungkinan *drop-out* adalah 10% maka besar sampel dengan koreksi *drop-out* adalah sebagai berikut:

$$n_{do} = \frac{n}{(1 - do)^2}$$

Berdasarkan perhitungan rumus-rumus tersebut di atas, maka besar sampel penelitian minimal untuk setiap kelompok adalah  $39,58 \approx 40$  neonatus dengan hiperbilirubinemia dan tanpa hiperbilirubinemia, sehingga secara keseluruhan sampel minimal yang dibutuhkan adalah 80 neonatus.

#### 4.5. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Kadar vitamin E serum.

2. Variabel terikat : Kadar bilirubin total serum.

3. Variabel perancu : Kadar vitamin C serum.

#### 4.6. Definisi Operasional

No	Definisi Operasional	Skala
1.	<p>Kadar vitamin E adalah konsentrasi vitamin E (<math>\alpha</math>- tokoferol) serum darah yang diambil pada hari pertama kehidupan.</p> <p>Pengukuran menggunakan metoda Elisa (<i>Immunoassay</i>).</p> <p>Kategori kadar vitamin E serum:<sup>53</sup></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Normal = <math>\geq 0,22</math> mg/dL.</li><li>- Rendah = <math>&lt; 0,22</math> mg/dL.</li></ul>	Nominal
2.	<p>Kadar vitamin C adalah konsentrasi vitamin C (asam askorbat) serum darah yang diambil pada hari pertama kehidupan.</p> <p>Pengukuran menggunakan metoda <i>Colorimetric Assay</i>.</p> <p>Kategori kadar vitamin C serum:<sup>67</sup></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Normal = <math>\geq 7</math> <math>\mu</math>g /mL.</li><li>- Rendah = <math>&lt; 7</math> <math>\mu</math>g /mL.</li></ul>	Nominal
3.	<p>Kadar bilirubin adalah kadar bilirubin total serum darah yang diperiksa pada hari ketiga atau keempat kehidupan.</p> <p>Metode dengan memeriksa serum darah, diukur dengan menggunakan metoda <i>Bichromatic</i> modifikasi prosedur Jendrassik dan Grof.</p> <p>Kategori peningkatan kadar bilirubin total serum:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Tidak meningkat = <math>&lt; 5</math> mg/dL.</li><li>- Meningkat = <math>\geq 5</math> mg/dL.</li></ul>	Nominal

#### 4.7. Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan adalah data primer dari neonatus yang dirawat di ruang Rawat Gabung RSUP Dr. Kariadi Semarang selama periode penelitian.

Pemeriksaan laboratorium untuk kadar bilirubin serum, enzim G6PD kualitatif, tes Coomb, dan gambaran darah tepi dikerjakan di Instalasi Laboratorium RSUP Dr. Kariadi, sedangkan pemeriksaan kadar vitamin E dan vitamin C serum dikerjakan di Laboratorium Bioteknologi Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

Teknik dan instrumen serta peralatan yang digunakan untuk pengumpulan data adalah sebagai berikut:

##### 1. **Bilirubin**

Bahan diambil dari darah vena yang dilakukan sentrifugasi untuk mendapatkan serum. Sejumlah  $\pm 0,5$  mL serum dimasukkan ke dalam tabung khusus, dan kemudian dimasukkan ke dalam mesin pemeriksa. Pengukuran menggunakan alat *Dimension<sup>®</sup> TBIL Method* dengan *Flex<sup>®</sup> reagent cartridge* buatan Dade Behring Jerman, yang dioperasikan di Instalasi Laboratorium RSUP Dr. Kariadi Semarang. Nilai kadar bilirubin total dinyatakan dalam mg/dL.<sup>64</sup>

##### 2. **Vitamin E**

Kadar vitamin E diperiksa dengan menggunakan metode Elisa (*immunoassay*), menggunakan panjang gelombang 450 nm. Pemeriksaan dimulai dengan mempersiapkan reagen yang digunakan.

Pembuatan reagen *Wash buffer* dengan mengencerkan 20 mL *Wash buffer concentrate* ke dalam air suling sampai volume 500 mL. Reagen *Standard* dibuat dengan mencampurkan reagen *Standard concentrate* dengan 1,0 mL reagen *Sample diluent*, menghasilkan *stock solution* dengan konsentrasi 20 µg/mL. *Detection reagent* A dan B dibuat dengan melarutkan konsentrasi reagen yang tercantum pada label vial dengan menggunakan *Assay diluent* A dan B (1:100). Semua reagen didiamkan dalam suhu ruangan sebelum digunakan.<sup>65</sup>

Pemeriksaan kadar vitamin E serum dilakukan dengan memasukkan reagen *Standard*, kontrol, dan sampel serum ke dalam cekungan masing-masing sebanyak 100 µL, tutup dengan strip perekat, dan inkubasi selama 2 jam dalam suhu 37°C. Setelah itu larutan dalam tiap cekungan dikeluarkan, tidak dibilas. Tambahkan 100 µL *Detection reagent* A ke dalam tiap cekungan, inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Aspirasi larutan di tiap cekungan dan bilas dengan menggunakan *Wash buffer* 350 µL yang dimasukkan di tiap cekungan menggunakan botol semprot, pipet multi-kanal, dispenser *manifold* atau *autowasher*. Ulangi langkah aspirasi dan pembilasan tadi sebanyak 3 kali. Setelah bilasan terakhir bersihkan *Wash buffer* yang tersisa dengan menyedotnya (aspirasi) atau menuangkannya ke tempat lain. Balikkan plat dan keringkan noda dengan kertas isap yang bersih. Kemudian tambahkan 100 µL *Detection reagent* B di tiap cekungan, tutup dengan strip perekat, inkubasi selama 1 jam dalam suhu 37°C. Kemudian



ulangi aspirasi/pembilasan seperti pada langkah sebelumnya. Tambahkan 90  $\mu\text{L}$  *Substrate solution* ke dalam tiap cekungan, inkubasi selama 30 menit dalam suhu kamar, lindungi dari sinar. Tambahkan 50  $\mu\text{L}$  *Stop solution* di tiap cekungan, jika warna berubah namun tidak seragam tepuk dengan lembut plat untuk memastikan tercampur dengan baik. Periksa densitas optik (O.D.) di tiap cekungan dalam 30 menit menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 450 nm. Pembacaan sebaiknya dilakukan lebih dari satu kali, semua nilai yang didapat dirata-rata, kemudian dikurangi dengan rata-rata densitas optik dari standard nol. Setelah itu buat kurva standard dengan axis y merupakan nilai mean dari absorbance (O.D.) tiap standard, dan axis x merupakan nilai konsentrasi. Data yang didapat diplotkan pada kurva, dan didapatkan konsentrasi vitamin E hasil pemeriksaan. Konsentrasi/kadar vitamin E yang didapat merupakan nilai dalam  $\mu\text{g/mL}$  sehingga perlu dilakukan konversi menjadi  $\text{mg/dL}$ .<sup>65</sup>

Nilai normal untuk BCB:  $\geq 0,22 \text{ mg/dL}$ .<sup>53</sup>

### 3. **Vitamin C**

Kadar vitamin C serum diperiksa dengan metode *Colorimetric* dengan panjang gelombang 570 nm. Pertama kali dibuat larutan standard asam askorbat dengan melarutkan 10  $\mu\text{L}$  dari 100 mM reagen *Ascorbic acid standard* ke dalam 990  $\mu\text{L}$  air suling, sehingga menghasilkan larutan 1 mM. Larutan tersebut dimasukkan dalam *96-well plate* masing-masing sebanyak 2, 4, 6, 8, dan 10  $\mu\text{L}$  pada cekungan. 1 cekungan yang

pertama tidak diberi larutan tersebut. Kemudian ditambahkan *Ascorbic acid buffer* sampai volume 120  $\mu\text{L}$  pada masing-masing cekungan, sehingga menghasilkan *Ascorbic acid standard* dengan konsentrasi 0, 2, 4, 6, 8, dan 10 nmol.<sup>66</sup>

Sampel serum darah sebanyak 120  $\mu\text{L}$  dimasukkan ke dalam cekungan yang lain. Pemeriksaan sampel dilakukan beberapa kali untuk memastikan pembacaan berada dalam jangkauan kurva standard. Kemudian 30  $\mu\text{L}$  *catalyst* ditambahkan dalam tiap cekungan yang berisi standard dan sampel. Dibuat 50  $\mu\text{L}$  larutan *Ascorbic acid reaction mix* dengan mencampurkan 46  $\mu\text{L}$  *Ascorbic acid assay buffer*, 2  $\mu\text{L}$  *Ascorbic acid probe*, dan 2  $\mu\text{L}$  *Ascorbic acid enzyme mix*. 50  $\mu\text{L}$  *Reaction mix* tersebut ditambahkan dalam tiap cekungan yang telah terisi *Ascorbic acid standard* dan sampel. Warna terbentuk dalam 3 menit dan stabil dalam 1 jam. Ukur dengan O.D. 570 nm menggunakan *micro-plate reader*. Koreksi *background* dengan mengurangi nilai yang didapat dari *Ascorbic acid standard* 0 dari semua hasil pembacaan sampel. Terapkan pembacaan sampel untuk menghasilkan kurva standard. Kadar *Ascorbic acid* didapat dari perhitungan rumus:  $C = \text{As}/\text{Sv}$  nmol/ $\mu\text{L}$  atau  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ . As=banyaknya *ascorbic acid* dari kurva standard (nmol), Sv=volume sampel yang ditambahkan dalam cekungan sampel ( $\mu\text{L}$ ). Hasil perhitungan tersebut kemudian dikonversi ke dalam satuan  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dengan dasar 1 mol *ascorbic acid*=176,12 mg.<sup>66</sup>

Nilai normal neonatus:  $\geq 7 \mu\text{g}/\text{mL}$ .<sup>67</sup>

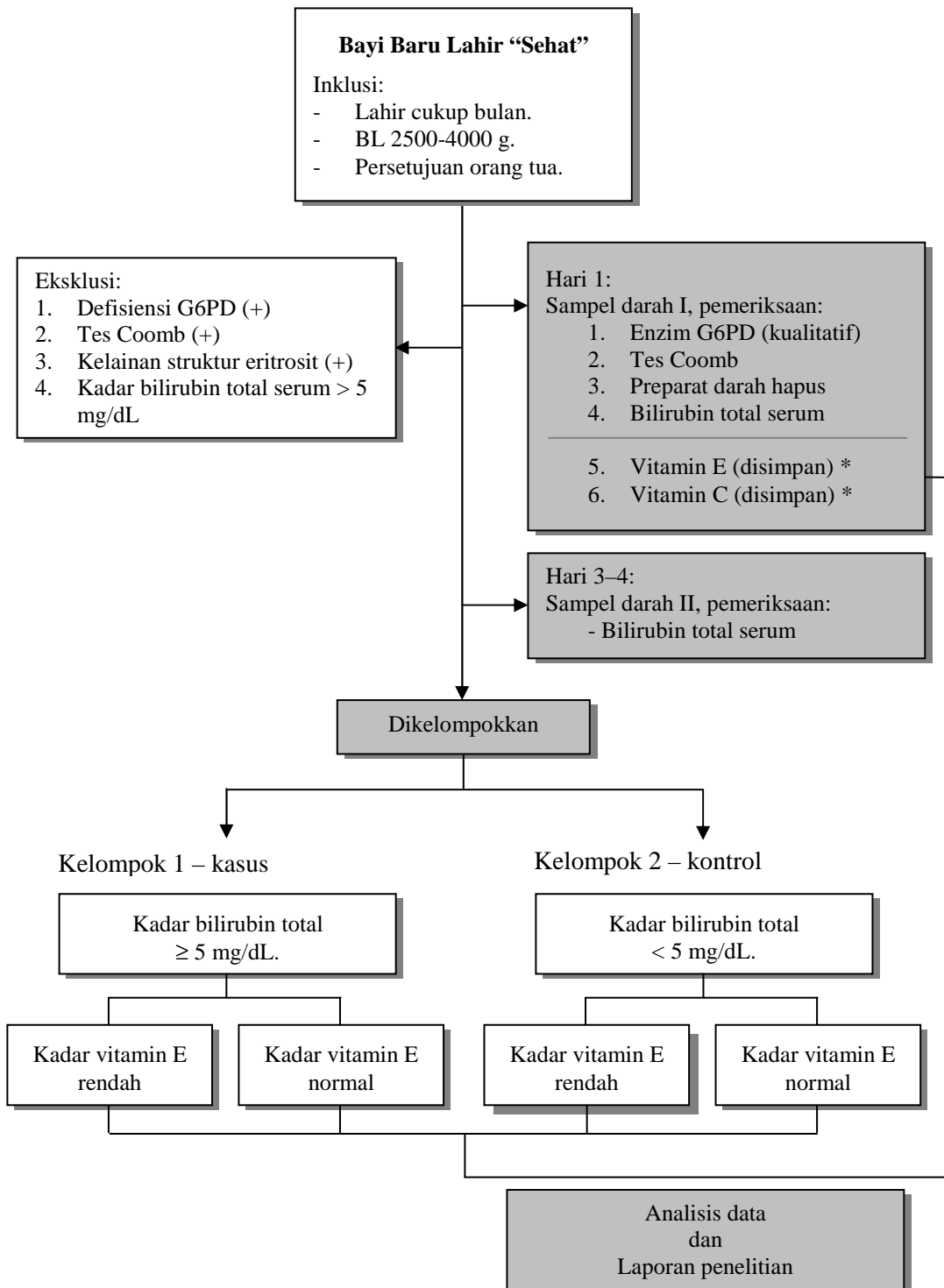
#### 4.8. Alur Penelitian

Tahapan penelitian dimulai dari bayi baru lahir masuk dirawat di ruang Rawat Gabung RSUP Dr. Kariadi. Pertama kali dilakukan pemeriksaan untuk menentukan subyek penelitian yaitu neonatus aterm sehat, lahir cukup bulan dengan kondisi aktif, gerakan simetris, tangis dan minum kuat, napas spontan dan teratur, berat lahir 2500-4000 gram, skor Apgar pada menit pertama  $> 7$ , tidak terdapat kelainan bawaan berat/mayor.<sup>62</sup> *Informed consent* dilakukan kemudian kepada orang tua/wali. Hanya neonatus yang mendapat persetujuan saja yang disertakan dalam penelitian.

Selanjutnya dilakukan pengambilan sampel darah I darah vena dalam rentang 24 jam pertama setelah lahir, untuk pemeriksaan-pemeriksaan: kadar Hb, Ht, jumlah lekosit, gambaran darah tepi untuk melihat adanya kelainan struktur eritrosit, bilirubin total (indirek), enzim G6PD, dan tes Coomb. Sebagian sampel darah disimpan untuk pemeriksaan kadar vitamin E dan vitamin C. Neonatus dengan kelainan struktur eritrosit, defisiensi enzim G6PD, atau tes Coomb (+) dieksklusi.

Perawatan hari ke 3-4, saat bayi biasanya dipulangkan, dilakukan pengambilan sampel darah II darah vena, untuk pemeriksaan bilirubin.

Sampel dikelompokkan berdasarkan kadar bilirubin pemeriksaan hari ke-3-4. Bila kadar bilirubin  $\geq 5$  mg/dL maka sampel dimasukkan kelompok kasus. Sampel dengan kadar bilirubin  $< 5$  mg/dL dimasukkan sebagai



\*) Diperiksa setelah didapatkan hasil kadar bilirubin hari ke-3 (sampel darah II).

Gambar 12. Alur penelitian

kelompok kontrol. Subyek (kelompok kasus dan kontrol) kemudian diperiksa kadar vitamin E dan vitamin C dari sampel darah I.

Pengelompokan berdasarkan kadar bilirubin 5 mg/dL dan sampel darah ke-2 diambil pada hari ke-3-4 dengan alasan bahwa kadar bilirubin secara fisiologis pada hari pertama adalah  $< 5$  mg/dL,<sup>5,7,12,13</sup> dan mencapai puncak pada kadar rata-rata 5 mg/dL pada hari ke-3-4 kehidupan dan kemudian menurun.<sup>6,7,11,12</sup>

Data-data yang didapat dilakukan analisa, untuk kemudian disusun dalam laporan penelitian ini.

#### **4.9. Analisis Data**

Data yang terkumpul melalui anamnesis, pemeriksaan fisik, dan pemeriksaan laboratorium dimasukkan ke dalam kuesioner dengan format khusus yang dibuat oleh peneliti, kemudian dilakukan data *cleaning* untuk memeriksa kesalahan yang mungkin terjadi. Segala kekurangan pada tahap editing dikoreksi dengan mengkonfirmasi dengan kuesioner dan bila perlu dengan orang tua responden kembali.

Setelah dilakukan data *cleaning* dilakukan pengkodean dan tabulasi, kemudian dimasukkan ke dalam komputer, selanjutnya data divalidasi untuk menjamin tidak ada kesalahan pemasukan data. Data *cleaning* dilakukan sekali lagi dengan mencetak data yang telah dimasukkan dan diperiksa konsistensinya.

Analisis data dilakukan setelahnya, meliputi analisis deskriptif dan uji

hipotesis.

### **1. Analisis deskriptif**

Data yang berskala numerik seperti umur ibu, usia kehamilan, lama partus, berat lahir, bilirubin total, indirek dan direk, vitamin E, dan vitamin C serum, dan sebagainya dideskripsikan sebagai rerata dan simpang baku (SB). Sedangkan data yang berskala kategorikal seperti pendidikan ibu, pekerjaan ibu, cara partus, dan jenis kelamin bayi, dan sebagainya dideskripsikan sebagai distribusi frekuensi (n) dan persen (%). Normalitas data diuji dengan uji Kolmogorov-Smirnov, distribusi data dikatakan normal jika  $p > 0,05$ .

Hubungan antara kadar vitamin E dengan bilirubin serum dianalisis dengan uji  $\chi^2$  karena merupakan variabel nominal dengan distribusi tidak normal.

### **2. Uji hipotesis**

Tahap ini dilakukan analisis inferensial untuk menguji hipotesis yang telah dibuat berdasarkan rumusan masalah.

Uji hipotesis (bivariat) menggunakan uji  $\chi^2$  dengan membuat tabel 2x2 dengan menempatkan variabel bebas (variabel paparan) pada lajur dan variabel terikat (variabel efek) pada kolom. Uji  $\chi^2$  digunakan oleh karena variabel bebas dan terikat berskala kategorikal.

Faktor risiko	Peningkatan bilirubin	
	(+)	(-)
Ada	a	b
Tidak ada	c	d

Besarnya risiko dinyatakan dengan nilai *crude* rasio odd (*odd ratio* = OR) yang dihitung dengan menggunakan rumus:

$$OR = \frac{ad}{bc}$$

Variabel dinyatakan sebagai faktor risiko apabila nilai  $OR > 1$ , dan dinyatakan sebagai faktor protektif apabila  $OR < 1$ . Penilaian faktor risiko juga berdasarkan rentang interval kepercayaan 95% (*95% confidence interval* = CI). Apabila rentang nilai 95% CI melingkupi angka 1 maka variabel tersebut belum dapat disimpulkan sebagai faktor risiko (*inconclusive*).

Uji multivariat dilakukan untuk mengetahui interaksi antar variabel bebas terhadap variabel terikat. Uji multivariat yang digunakan adalah uji regresi logistik oleh karena variabel terikat berskala kategorikal nominal dengan variabel bebas yang berskala kategorikal. Besarnya risiko untuk variabel bebas dengan terhadap kejadian hiperbilirubinemia dinyatakan sebagai nilai *adjusted odd ratio*.

Nilai p dianggap bermakna apabila  $p < 0,05$  dengan 95% interval kepercayaan. Analisis data menggunakan program SPSS *for Windows v.15* (SPSS Inc USA).

#### **4.10. Etika Penelitian**

Persetujuan untuk ikut serta dalam penelitian dimintakan dari orang tua/wali dalam bentuk tanda tangan pada lembar persetujuan (Informed consent). Orang tua/wali telah diberikan penjelasan secara lisan sebelumnya tentang tujuan, manfaat, dan prosedur penelitian, serta diberikan penghargaan kepada bayi yang telah menjadi sampel penelitian. Segala konsekuensi yang berhubungan dengan penelitian khususnya mengenai pembiayaan ditanggung oleh peneliti. Penderita dengan ikterus atau hiperbilirubinemia patologis tetap diberikan terapi sesuai dengan prosedur standar yang berlaku di bangsal terkait. Data pribadi penderita dijamin kerahasiaannya.

Penelitian telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr. Kariadi Semarang dengan nomor 42/EC/FK/RSDK/2009, Direktur Utama RSUP Dr. Kariadi melalui Direktur SDM dan Pendidikan RSUP Dr. Kariadi Semarang dengan surat ijin penelitian nomor DL.00.02.DIKLIT.011, Penanggung Jawab/Supervisor ruang Rawat Gabung, Kepala Bagian Ilmu Kesehatan Anak RSUP Dr. Kariadi, dan Kepala Bagian Obstetri & Ginekologi RSUP Dr. Kariadi.

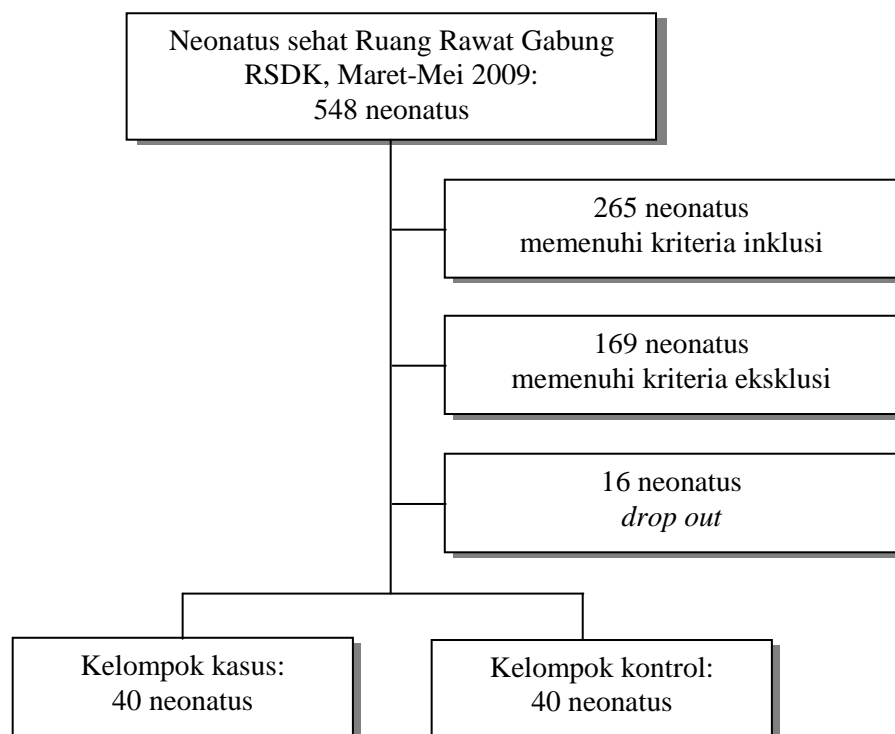


## BAB 5

### HASIL PENELITIAN

#### 5.1. Karakteristik Ibu dan Neonatus

Pengambilan sampel dilakukan pada bulan Maret sampai Mei 2009, didapatkan jumlah keseluruhan neonatus yang dirawat di ruang rawat gabung RSUP Dr. Kariadi sebanyak 548 bayi, 265 bayi memenuhi kriteria inklusi, lainnya tidak memenuhi kriteria inklusi karena berbagai alasan: lahir kurang bulan, berat lahir kurang dari 2500 gram atau lebih dari 4000 gram, atau orang tua/wali menolak mengikuti penelitian. Sebanyak 169 bayi dieksklusi karena bayi telah diberi minum selain ASI. Sembilan puluh enam bayi memenuhi kriteria inklusi,



Gambar 13. Sampel penelitian.

namun selama pengamatan terdapat 16 bayi mengalami ikterik dan dilakukan fototerapi sebelum pengambilan sampel darah ke-2 sehingga tidak dimasukkan ke dalam sampel penelitian.

Total subyek penelitian adalah 80 neonatus yang memenuhi kriteria penelitian sebagai sampel, terdiri atas 40 neonatus dengan kadar bilirubin  $\geq 5$  mg/dL sebagai kasus dan 40 neonatus dengan kadar bilirubin  $< 5$  mg/dL pada periode yang sama sebagai kontrol.

Tabel 3 menunjukkan karakteristik neonatus yang dibedakan menurut kelompok kadar bilirubin. Rerata usia ibu pada kedua kelompok hampir sama dan tidak ada perbedaan bermakna secara statistik pada keduanya.

Pendidikan ibu pada kedua kelompok penelitian sebagian besar adalah tamat SMU, tidak ada perbedaan yang bermakna secara statistik antara keduanya.

Pekerjaan ibu pada kedua kelompok penelitian menunjukkan lebih dari separuhnya adalah tidak bekerja, tidak ada perbedaan yang bermakna secara statistik pada kedua kelompok penelitian.

Rerata usia kehamilan ibu pada kedua kelompok penelitian menunjukkan nilai yang hampir sama, tidak ada perbedaan yang bermakna secara statistik pada kedua kelompok.

Cara partus pada kedua kelompok sebagian besar adalah partus secara spontan, tidak ada perbedaan yang bermakna secara statistik pada kedua kelompok penelitian.

Rerata lama partus pada kelompok kasus lebih kecil dibandingkan pada kelompok kontrol namun tidak ada perbedaan yang bermakna secara statistik pada

Tabel 3. Karakteristik ibu dan neonatus pada kelompok kasus dan kontrol

Variabel	Kelompok kadar bilirubin		p
	Kasus ( $\geq 5$ mg/dL) n = 40	Kontrol ( $< 5$ mg/dL) n = 40	
Umur ibu (tahun)	29,15 ( $\pm 6,50$ )	28,98 ( $\pm 7,95$ )	0,832*
Pendidikan ibu			0,913¥
• Tidak sekolah/tamat SD	2 (5%)	1 (2,5%)	
• Tamat SD	10 (25%)	6 (15%)	
• Tamat SMP	11 (27,5%)	12 (30%)	
• Tamat SMU	15 (37,5%)	19 (47,5%)	
• Tamat PT	2 (5%)	2 (5%)	
Pekerjaan ibu			0,073*
• Tidak bekerja	25 (62,5%)	32 (80%)	
• Buruh pabrik	5 (12,5%)	3 (7,5%)	
• Buruh tani	0 (0%)	1 (2,5%)	
• Pedagang	2 (5%)	1 (2,5%)	
• Swasta	8 (20%)	3 (7,5%)	
Usia kehamilan (minggu)	39,10 ( $\pm 1,34$ )	39,13 ( $\pm 1,38$ )	0,830*
Cara partus			0,125*
• Spontan	18 (45%)	20 (50%)	
• <i>Sectio caesaria</i>	13 (32,5%)	17 (42,5%)	
• Ekstraksi vakum	7 (17,5%)	3 (7,5%)	
• Ekstraksi bokong	2 (5%)	0 (0%)	
Lama partus (jam)	3,92 ( $\pm 3,54$ )	5,65 ( $\pm 9,57$ )	0,458*
Berat lahir (gram)	2900,00 ( $\pm 332,05$ )	2986,25 ( $\pm 394,02$ )	0,354*
Jenis kelamin bayi			0,502 £
• Laki-laki	23 (57,5%)	19 (47,5%)	
• Perempuan	17 (42,5%)	21 (52,5%)	
Kadar bilirubin total (mg/dL)	9,69 ( $\pm 2,41$ )	2,81 ( $\pm 1,21$ )	0,001 *
Kadar bilirubin indirek (mg/dL)	9,15 ( $\pm 2,29$ )	2,62 ( $\pm 1,17$ )	0,001 *
Kadar bilirubin direk (mg/dL)	0,52 ( $\pm 0,17$ )	0,19 ( $\pm 0,07$ )	0,001 *
Kadar vitamin E (mg/dL)	0,19 ( $\pm 0,03$ )	0,23 ( $\pm 0,02$ )	0,001 *
Kadar vitamin C ( $\mu\text{g/mL}$ )	6,90 ( $\pm 0,10$ )	7,18 ( $\pm 0,27$ )	0,001 *

\* Uji Mann-Whitney

£ Uji Fisher

¥ Uji Kolmogorov-Smirnov

Data dinyatakan sebagai rerata (simpang baku) atau n (%) sesuai dengan yang tercantum dalam kurung.

kedua kelompok penelitian.

Rerata berat lahir pada kelompok kasus hampir sama bila dibandingkan dengan kelompok kontrol, tidak ada perbedaan yang bermakna secara statistik pada kedua kelompok.

Jenis kelamin terbanyak pada kelompok kasus adalah laki-laki dan pada

kelompok kontrol adalah perempuan. Tidak ada perbedaan yang bermakna secara statistik pada kedua kelompok penelitian.

Rerata kadar bilirubin (total, indirek, dan direk) menunjukkan perbedaan yang bermakna secara statistik antara kedua kelompok penelitian.

Seluruh hasil pemeriksaan kadar bilirubin direk pada kedua kelompok penelitian menunjukkan kadar dalam batas normal sehingga kadar bilirubin total pada penelitian ini dapat menggambarkan kadar bilirubin indirek.

## 5.2. Rerata Kadar Bilirubin Total

Rerata bilirubin total (mg/dL) pada pemeriksaan hari ke 3-4 diperlihatkan pada tabel 4.

Tabel 4. Rerata kadar bilirubin total (mg/dL) pada kelompok kasus dan kontrol

<b>Kelompok Kadar Bilirubin</b>	<b>Rerata</b>	<b>Minimal</b>	<b>Maksimal</b>	<b>Simpang baku</b>	<b>p</b>
<b>Kasus (<math>\geq 5</math> mg/dL)</b>	9,69	6,14	16,3	2,41	0,001
<b>Kontrol (<math>&lt; 5</math> mg/dL)</b>	2,81	0,54	4,94	1,21	

## 5.3. Rerata Kadar Vitamin E

Rerata kadar vitamin E pada kelompok kasus lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol, dengan kadar kurang dari normal pada kelompok kasus dan kadar normal pada kelompok kontrol. Uji Mann-Whitney yang dilakukan menunjukkan kadar vitamin E dan kadar bilirubin memperlihatkan adanya perbedaan yang bermakna dengan  $p=0,001$  (tabel 5).

Tabel 5. Rerata kadar vitamin E (mg/dL) menurut kelompok kasus dan kontrol

<b>Kelompok Kadar Bilirubin</b>	<b>Rerata</b>	<b>Minimal</b>	<b>Maksimal</b>	<b>Simpang baku</b>	<b>p</b>
<b>Kasus (<math>\geq 5</math> mg/dL)</b>	0,19	0,16	0,28	0,03	0,001
<b>Kontrol (<math>&lt; 5</math> mg/dL)</b>	0,23	0,17	0,26	0,02	

#### **5.4. Hubungan Kadar Vitamin E dengan Bilirubin**

Hubungan antara kadar vitamin E dengan bilirubin total dianalisa dengan uji  $\chi^2$ , karena kedua variabel berskala nominal dan terdistribusi tidak normal. Hasil analisis didapatkan bahwa ada hubungan yang bermakna antara kelompok kadar vitamin E dengan kelompok kadar bilirubin, dimana pada kelompok kasus sebagian besar sampel mempunyai kadar vitamin E yang rendah dan sebaliknya pada kelompok kontrol. (tabel 6)

#### **5.5. Kadar Vitamin E sebagai Faktor Risiko Peningkatan Bilirubin**

Uji statistik bivariat kadar vitamin E dengan kadar bilirubin diperoleh hasil bahwa ada hubungan yang bermakna antara kadar vitamin E dengan kejadian peningkatan kadar bilirubin pada neonatus. Kadar vitamin E yang rendah mempunyai risiko terjadi peningkatan kadar bilirubin 23,727 kali lebih besar dibanding dengan kadar vitamin E yang normal. Sehingga dapat diartikan bahwa kadar vitamin E menjadi faktor risiko kejadian peningkatan kadar bilirubin. (tabel 6)

Tabel 6. Tabulasi silang antara kelompok kadar vitamin E terhadap kelompok kasus dan kontrol

Variabel	Kelompok kadar bilirubin		OR (95% CI)	p
	Kasus (≥ 5 mg/dL) n = 40	Kontrol (< 5 mg/dL) n = 40		
<b>Kelompok kadar vitamin E</b>				
• < 0,22 mg/dL	29 (72,5%)	4 (10,0%)	23,727 (6,836 s.d. 82,361)	0,001 §
• ≥ 0,22 mg/dL *	11 (27,5%)	36 (90,0%)		

\* Kadar vitamin E normal pada neonatus

§ Uji Chi Square

### 5.6. Kadar Vitamin E dan C sebagai Faktor Risiko Peningkatan Bilirubin

Analisis multivariat regresi logistik yang dilakukan menunjukkan bahwa kadar vitamin E yang rendah disertai dengan kadar vitamin C yang rendah mempunyai risiko untuk mengalami peningkatan kadar bilirubin sebesar 55,860 kali lebih besar dibandingkan dengan yang mempunyai kadar vitamin E dan vitamin C normal, dengan  $p=0,001$  yang artinya bermakna secara statistik. (tabel7)

Hal ini berarti bahwa kadar vitamin C yang rendah merupakan variabel perancu yang memperkuat besarnya risiko pada hubungan antara kadar vitamin E yang rendah dengan kejadian peningkatan kadar bilirubin pada neonatus.

Tabel 7. Hasil analisis multivariat regresi logistik

Faktor risiko	Kelompok bilirubin		Crude OR	Adjusted OR (95% CI)	p
	Kasus (≥ 5 mg/dL)	Kontrol (< 5 mg/dL)			
Vitamin E < 0,22 mg/dL	29	4	23,727	55,860 (6,672 s.d. 467,704)	0,001
≥ 0,22 mg/dL *	11	36	1	1	-
Vitamin C < 7 µg/mL	36	14	16,714	42,113 (4,800 s.d. 369,504)	0,001
≥ 7 µg/mL #	4	26	1	1	-

\* Kadar vitamin E normal pada neonatus

# Kadar vitamin C normal pada neonatus

## **BAB 6**

### **PEMBAHASAN**

#### **6.1. Pembahasan Hasil**

Beberapa karakteristik variabel pada penelitian ini seperti jenis kelamin bayi, usia ibu, pendidikan dan pekerjaan ibu, serta cara dan lama partus menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna terhadap peningkatan kadar bilirubin serum. Hal ini sesuai dengan pendapat para ahli selama ini dimana hal-hal tersebut di atas tidak pernah dikemukakan adanya hubungan dengan kadar bilirubin dan tidak ada perdebatan para ahli mengenai hal tersebut.<sup>4,7,15</sup>

Kadar bilirubin bayi baru lahir dipengaruhi oleh usia kehamilan, berat lahir dan asupan ASI, serta adanya inkompatibilitas golongan darah, abnormalitas struktur eritrosit, dan defisiensi enzim G6PD.<sup>4,12</sup> Sampel penelitian ini diambil dari neonatus dengan kondisi yang sama, yaitu masa kehamilan yang cukup bulan dan berat lahir yang normal sesuai masa kehamilan sehingga tidak terdapat perbedaan yang bermakna terhadap peningkatan kadar bilirubin. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Khalid K Abdul-Razzak dkk (2007) mengenai hubungan antara kadar vitamin E dan vitamin C plasma terhadap tingkat keparahan hiperbilirubinemia pada 130 neonatus sehat dari ibu sehat dimana dikatakan bahwa usia kehamilan yang cukup bulan dan berat lahir normal menunjukkan tidak adanya perbedaan yang bermakna terhadap peningkatan kadar bilirubin.<sup>30</sup>

Rerata kadar vitamin E dan vitamin C pada penelitian ini menunjukkan kelompok kasus mempunyai rerata yang lebih kecil dibandingkan dengan

kelompok kontrol. Penelitian Abdul-Razzak dkk mengemukakan hal yang sama pula dimana pada penelitian mereka didapatkan bahwa rerata kadar vitamin E dan vitamin C plasma di hari pertama kehidupan pada neonatus yang mengalami hiperbilirubinemia mempunyai kadar yang lebih rendah secara bermakna dibandingkan dengan neonatus yang tidak mengalami hiperbilirubinemia.<sup>30</sup> Demikian pula Surapeni K Mohan dkk (2008) mendapatkan temuan yang sama bahwa kadar vitamin E dan vitamin C pada neonatus yang mengalami ikterus mempunyai kadar yang lebih rendah dibandingkan neonatus yang tidak mengalami ikterus.<sup>31</sup> Penelitian tersebut menunjukkan bahwa antioksidan, dalam hal ini vitamin E dan vitamin C, mempunyai kadar yang rendah pada neonatus yang mengalami hiperbilirubinemia.

Ojo CO dkk (1986) juga mendapatkan hal yang sama. Kadar vitamin E plasma berhubungan bermakna dengan kadar bilirubin dan kejadian hemolisis pada neonatus, dimana pada neonatus dengan ikterus mengalami penurunan kadar vitamin E dan peningkatan kejadian hemolisis yang bermakna. Terdapat korelasi negatif bermakna antara kadar vitamin E dan kadar bilirubin serta kadar vitamin E dan hemolisis, yang berarti bahwa penurunan kadar vitamin E dapat meningkatkan kadar bilirubin dan kejadian hemolisis. Hasil ini menunjukkan bahwa hemolisis dan hiperbilirubinemia yang terjadi pada neonatus dengan ikterus dapat terjadi karena kekurangan vitamin E.<sup>25</sup>

Peningkatan kadar bilirubin pada neonatus sebagian besar merupakan akibat dari adanya hemolisis.<sup>9,68</sup> Oksidan kuat dapat mengganggu integritas sel, khususnya yang mengandung asam lemak tak jenuh dimana merupakan



komponen fosfolipid penyusun membran sel, DNA dan protein sel. Pembentukan oksidan/radikal bebas yang melebihi *antioxidant defense capacity* menyebabkan stres oksidatif atau peningkatan produksi SOR yang berdampak kerusakan organ yang rentan seperti lipid membran sel, asam amino penyusun protein enzim, dan DNA.<sup>20,22</sup> Stres oksidatif lebih mudah terjadi pada neonatus dibandingkan pada anak karena masih rendahnya kemampuan kapasitas eritrosit neonatus sebagai pertahanan antioksidan. Stres oksidatif yang mengenai eritrosit berdampak timbulnya peroksidasi lipid pada membran sel eritrosit mengakibatkan hemolisis, lebih banyak terjadi pada neonatus dibandingkan pada anak.<sup>20,24,69</sup> Eritrosit neonatus rentan terhadap stres oksidatif yang berdampak terjadinya peroksidasi lipid pada membran sel eritrosit yang menyebabkan hemolisis.<sup>24,69</sup>

Peningkatan petanda stres oksidatif dan penurunan pertahanan antioksidan dalam plasma berkaitan dengan tingginya hemolisis neonatus pada saat awal kelahiran terutama pada neonatus prematur.<sup>70,71</sup> Dani C dkk (2003) mengemukakan bahwa penurunan kadar bilirubin plasma sesuai dengan peningkatan kapasitas antioksidan dan penurunan stres oksidatif pada neonatus prematur.<sup>72</sup> Penelitian yang dilakukan oleh Surapaneni K Mohan dan Vishnu Priya (2008) disebutkan bahwa neonatus dengan ikterus mempunyai kadar MDA yang meningkat bermakna, terdapat aktifitas SOD dan GPx, kadar GSH, vitamin C, vitamin E plasma, dan aktivitas katalase yang menurun secara signifikan dibandingkan dengan neonatus yang tidak mengalami ikterus. Peningkatan aktifitas antioksidan enzim merupakan respon kompensasi terhadap peningkatan stres oksidatif. Penurunan kadar glutathion dan antioksidan vitamin menyokong

hipotesis bahwa ikterus pada neonatus merupakan faktor penyebab penting dalam patogenesis peroksidasi lipid, dan mekanisme pertahanan antioksidan dapat menurun pada neonatus dengan ikterus.<sup>31</sup> Hasil ini menunjukkan bahwa stres oksidatif lebih banyak terjadi pada neonatus yang mengalami ikterus. Vitamin E dan vitamin C merupakan antioksidan kuat pada tingkat seluler, memainkan peranan penting dalam perlindungan sel terhadap kerusakan oksidatif dan hemolisis, sehingga kadar vitamin E dan vitamin C berkaitan dengan hiperbilirubinemia pada neonatus yang cenderung patologis.<sup>24,72</sup>

Bracci dkk mendapatkan bahwa pada neonatus yang memiliki kadar bilirubin puncak melebihi 214  $\mu\text{mol/L}$  (12,5 mg/dL) mempunyai aktifitas antioksidan enzim (GPx dan SOD) yang rendah pada saat lahir dibandingkan neonatus dengan kadar bilirubin yang lebih rendah dari kadar tersebut. Kadar antioksidan tersebut berkorelasi negatif dengan kadar puncak bilirubin pada saat lahir. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa defisiensi antioksidan berperan terhadap terjadinya hemolisis dan ikterus pada neonatus.<sup>73</sup> Meskipun Bracci dkk tidak meneliti mengenai antioksidan vitamin (vitamin E maupun vitamin C) namun hasil yang didapatkan tersebut secara tidak langsung menggambarkan rendahnya antioksidan berhubungan dengan timbulnya ikterus pada neonatus.

Vitamin E merupakan antioksidan pemutus rantai peroksidasi lipid yang larut dalam lemak berada dalam membran sel eritrosit bekerja lebih efektif dalam menekan hemolisis dibandingkan dengan vitamin C. Vitamin C merupakan antioksidan yang efektif bekerja dalam plasma sel untuk menekan hemolisis karena sifatnya yang larut dalam air.<sup>51,74</sup>

Penelitian ini didapatkan bahwa peran antioksidan vitamin E juga dipengaruhi oleh vitamin C, risiko terjadi peningkatan kadar bilirubin menjadi lebih besar apabila kedua vitamin ini dalam kadar yang rendah, sehingga dapat dikatakan kedua vitamin ini bekerja bersama dalam mencegah terjadinya hemolisis dan peningkatan kadar bilirubin. Penelitian yang dilakukan oleh Niki dkk menunjukkan adanya efek sinergis antara vitamin E dan vitamin C dalam menghambat peroksidasi lipid. Vitamin C membantu dalam regenerasi vitamin E sebagaimana vitamin E teroksidasi oleh radikal bebas dalam membran lipid. Kesimpulan dari penelitian tersebut adalah kadar vitamin E dan vitamin C plasma yang rendah terkait secara signifikan dengan hiperbilirubinemia pada neonatus karena peningkatan stres oksidatif dan hemolisis.<sup>74</sup>

Hubungan yang sinergistik antara vitamin E dan vitamin C juga ditunjukkan oleh Strain dkk. Penelitian secara *in vitro* yang dilakukan mereka menunjukkan bahwa kedua vitamin tersebut dapat mencegah terjadinya peroksidasi lipid. Hal ini dapat terjadi karena adanya kemampuan vitamin C dalam bereaksi terhadap radikal tokoferoksil yang timbul, vitamin C dapat merubah radikal  $\alpha$ -tokoferoksil kembali menjadi  $\alpha$ -tokoferol yang aktif.<sup>54,75</sup>

Penelitian yang dilakukan oleh Niki dkk serta Strain dkk tersebut menunjukkan adanya efek sinergis antara vitamin E dan vitamin C dalam mencegah hemolisis yang pada akhirnya mencegah terjadinya hiperbilirubinemia. Vitamin C membantu dalam regenerasi vitamin E sebagaimana vitamin E teroksidasi oleh radikal bebas dalam lapisan lipid. Kedua hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa kadar vitamin E dan vitamin C yang rendah terkait

secara signifikan dengan hiperbilirubinemia pada neonatus karena peningkatan stres oksidatif dan hemolisis.<sup>74,75</sup>

## **6.2. Keterbatasan Penelitian**

Keterbatasan penelitian ini:

1. Tidak memperhitungkan variabel antioksidan dan oksidan/radikal bebas lain yang dapat mempengaruhi kejadian hemolisis atau peningkatan kadar bilirubin pada neonatus, misalnya SOD, katalase, glutathion peroksidase dan glutathion reduktase.
2. Tidak memperhitungkan variabel lain yang dapat mempengaruhi peningkatan kadar bilirubin serum, misalnya adanya kelainan transportasi bilirubin, gangguan ambilan hati, kelainan metabolik dan defek biokimia.

## **BAB 7**

### **SIMPULAN DAN SARAN**

#### **7.1. Simpulan**

Simpulan yang bisa didapat pada penelitian ini:

1. Rerata kadar bilirubin total serum hari ke 3-4 pada kelompok kasus sebesar 9,69 mg/dL ( $\pm 2,41$ ), dan kelompok kontrol sebesar 2,81 mg/dL ( $\pm 1,21$ ).
2. Rerata kadar vitamin E serum pada kelompok kadar bilirubin  $\geq 5$  mg/dL lebih rendah yaitu sebesar 0,19 mg/dL ( $\pm 0,03$ ) dibandingkan kelompok kadar bilirubin  $< 5$  mg/dL sebesar 0,23 mg/dL ( $\pm 0,02$ ).
3. Rerata kadar vitamin C serum pada kelompok kadar bilirubin  $\geq 5$  mg/dL lebih rendah yaitu sebesar 6,90  $\mu\text{g/mL}$  ( $\pm 0,10$ ) dibandingkan kelompok kadar bilirubin  $< 5$  mg/dL sebesar 7,18  $\mu\text{g/mL}$  ( $\pm 0,27$ ).
4. Terdapat hubungan yang signifikan antara kadar vitamin E serum yang rendah dengan kejadian peningkatan kadar bilirubin serum yang cenderung patologis pada neonatus dengan nilai p sebesar 0,001.
5. Kadar vitamin E serum yang rendah merupakan faktor risiko kejadian peningkatan kadar bilirubin dengan OR sebesar 23,727.
6. Kadar vitamin E serum yang rendah, dengan memperhitungkan kadar vitamin C serum yang rendah, merupakan faktor risiko kejadian peningkatan kadar bilirubin dengan OR sebesar 55,860.

## **7.2. Saran**

Perlu dilakukan penelitian terhadap:

1. Pengaruh pemberian vitamin E pada bayi baru lahir terhadap kejadian peningkatan kadar bilirubin.
2. Keterlibatan variabel antioksidan dan oksidan/radikal bebas lain yang mempengaruhi kejadian hemolisis seperti SOD, katalase, glutathion peroksidase, serta glutathion reduktase.
3. Keterlibatan variabel lain yang mempengaruhi peningkatan kadar bilirubin pada neonatus seperti kelainan transportasi bilirubin, gangguan ambilan hati, kelainan metabolik, dan defek biokimia.

## DAFTAR PUSTAKA

---

- 1 The United Nations Children's Fund, UNICEF. At a glance: Indonesia. Unicef [Online] 2006 [cited 2008 Aug 22];1:[17 screens] Available from: URL:[http://www.unicef.org/infobycountry/indonesia\\_statistics.html](http://www.unicef.org/infobycountry/indonesia_statistics.html).
- 2 World Health Organization. The world health report 2005, make every mother and child count. WHO 2005;1:1-243.
- 3 Lawn JE, Cousens S, Zupan J. Neonatal survival 1, 4 million neonatal deaths: when? where? why? *Lancet* 2005;365:891-900.
- 4 Sukadi A. Hiperbilirubinemia. Dalam: Kosim MS, Yunanto A, Dewi R, Sarosa GI, Usman A, penyunting. Buku ajar neonatologi edisi I. Jakarta: Badan Penerbit Ikatan Dokter Anak Indonesia; 2008. p. 147-69.
- 5 Unit Pengkajian Teknologi Kesehatan Direktorat Jenderal Pelayanan Medik Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Tatalaksana ikterus neonatorum. HTA Indonesia, Dirjen Yanmed Depkes RI 2004;1:1-22.
- 6 Gilmore MM. Hyperbilirubinemia, indirect (unconjugated hyperbilirubinemia). In: Gomella TL, Cunningham MD, Eyal FG, Zenk KE, editors. *Neonatology: management, procedures, on-call problems, diseases, and drugs*, 6<sup>th</sup> ed. New York: Lange Medical Book/McGraw-Hill; 2009. p. 293-301.
- 7 Martin CR, Cloherty JP. Neonatal hiperbilirubinemia. In: Cloherty JP, Eichenwald EC, Stark AR, editors. *Manual of neonatal care* 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 185-221.
- 8 Health Technology Assessment Unit Medical Development Division Ministry of Health Malaysia. Management of neonatal hyperbilirubinemia. Ministry of Health Malaysia 2002;1:1-37.
- 9 Dennery PA, Seidman DS, Stevenson DK. Neonatal hyperbilirubinemia. *N Engl J Med* 2001;344(8):581-90.
- 10 Connolly AM, Volpe JJ. Clinical features of bilirubin encephalopathy. *Clin Perinatol* 1990;17(2):371-9.

- 
- 11 Porter ML, Dennis BL. Hyperbilirubinemia in the term newborn. *Am Fam Phys* 2002;65:599-606.
  - 12 Uy CC. Hyperbilirubinemia, indirect (unconjugated hyperbilirubinemia). In: Gomella TL, Cunningham MD, Eyal FG, Zenk KE. *Neonatology: management, procedures, on-call problems, diseases, and drugs*, 6<sup>th</sup> ed. New York: Lange Medical Book/McGraw-Hill; 2009. p. 498-510.
  - 13 Oski FA. Other conjugated hyperbilirubinemias. In: Schafer and Avery, *disease of the newborn*. Philadelphia: WB Saunders Co; 1996. p. 772-5.
  - 14 Perales B, Hoyos M, Morales M, Carballo M, Fernandez U, Prieto P. Changes in erythrocytic deformability and plasma viscosity in neonatal ictericia. *Am J Perinatol* 1999;16(8):421-7.
  - 15 Maisels MJ. Jaundice. In: Avery GB, Fletcher MA, Mac Donald MG, editors. *Neonatology, pathophysiology & management of the newborn*, 5<sup>th</sup> ed. Baltimore: Lippincot Williams & Wilkins; 1999. p. 765-819.
  - 16 MacMahon JR, Stevensson DK, Oski FA. Bilirubin metabolism. In: Taeusch HW, Balard RA, editors. *Avery's diseases of the Newborn*, 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders; 1998. p. 995-1002.
  - 17 Halamek LP, Stevenson DK. Neonatal jaundice and liver disease. In: *Neonatal-perinatal medicine: diseases of the fetus and infant*, 6<sup>th</sup> ed. New York: Mosby-Year Book Inc; 1997. p. 1345-62.
  - 18 Gross RT, Bracci R, Rudolph N, Schroeder E, Kochen JA. Hydrogen peroxide toxicity and detoxification in the erythrocytes of newborn infants. *Blood* 1967;29(4):481-93.
  - 19 Kilic M, Turgut M, Taskin E, Cekmen M, Aygun AD. Nitric oxide levels and antioxidant enzyme activities in jaundices of premature infants. *Cell Biochem Funct* 2004;22(5):339-42.
  - 20 Langseth L. Oxidants and antioxidants: some basic concepts. In: Bracco U, Jardine NJ, editors. *Oxidants, antioxidants, and disease prevention*. Belgium: International Life Science Institute; 1994. p. 1-4.



- 
- 21 Suryohudoyo P. Oksidan, antioksidan dan radikal bebas. Dalam: Suryohudoyo P. Kapita selekta ilmu kedokteran molekuler. Jakarta: CV Sagung Seto; 2000. p. 31-47.
  - 22 Segel GB. Definitions and classification of hemolytic anemias. In: Behrman RF, Kliegman RM, Jenson HB, editors. Nelson textbook of pediatrics, 17<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 2004. p. 1617-9.
  - 23 Dani C, Cecchi A, Bertini G. Role of oxidative stress as physiopathologic factor in the preterm infant. *Minerva Pediatr* 2004;56(4):381-94.
  - 24 Vanderpas J, Vertongen F. Erythrocyte vitamin E is oxidized at a lower peroxide concentration in neonates than in adults. *Blood* 1985;66(6):1272-7.
  - 25 Ojo CO, Dawodu AH, Osifo BO. Vitamin E deficiency in the pathogenesis of haemolysis and hyperbilirubinaemia of neonatal jaundice. *J Trop Pediatr* 1986;32(5):251-4.
  - 26 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. *Am J Clin Nutr* 2003;22(1):18–35.
  - 27 Wen Y, Cooke T, Feely J. The effect of pharmacological supplementation with vitamin C on low-density lipoprotein oxidation. *Br J Clin Pharmacol* 1997;44:94-7.
  - 28 Gross SJ, Landaw SA, Oski FA. Vitamin E and neonatal hemolysis. *Pediatrics* 1977;59:995-7.
  - 29 Gross SJ. Vitamin E and neonatal bilirubinemia. *Pediatrics* 1979;64:321-3.
  - 30 Abdul-Razzak KK, Nusier MK, Obediat AD, Salim AM. Antioxidant vitamins and hyperbilirubinemia in neonates. *Ger Med Sci* 2007;5:1-7.
  - 31 Mohan SK, Priya V. Status of lipid peroxidation, glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant enzymes in neonatal jaundice patients. *J Clin Diag Res* 2008;3:827-32.
  - 32 Luzzatto L. G6PD deficiency and hemolytic anemia. In: Nathan DG, Oski FA, editors. *Hematology of infancy and childhood*, Vol 1, 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1993. p. 674-91.

- 
- 33 Higgins C. Preventing red cells from sickling. *Br J Haematol* 2005;128:552–61.
- 34 Ganong WF. Circulating body fluid. In: Ganong WF. *Review of medical physiology* 22<sup>nd</sup> ed. California: Lange Medical Publication; 2008. p. 515-46.
- 35 Bard H. Postnatal fetal and adult hemoglobin synthesis in early preterm newborn infants. *Clin Invest Jour* 1973;52:1789-95.
- 36 Metaxotou-Mavromati AD, Antonopoulou HK, Laskari SS, Tsiarta HK, Ladis VA, Kattamis CA. Developmental changes in hemoglobin F levels during the first two years of life in normal and heterozygous  $\beta$ -thalassemia infants. *Pediatrics* 1982;69:734-8.
- 37 Ganong WF. Circulation through special regions. In: Ganong WF. *Review of medical physiology* 22<sup>nd</sup> ed. California: Lange Medical Publication; 2008. p. 611-29.
- 38 American Academy of Pediatrics, Subcommittee on Hyperbilirubinemia. Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation. *Pediatrics* 2004;114:297-306.
- 39 Murray RK. Porphirin dan pigmen empedu. Dalam: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, editors. *Biokimia Harper* edisi 24. Jakarta: EGC; 1997. p. 352-66.
- 40 Sabardiman, Purwanto AP. Pendekatan laboratorik diagnosis ikterik. Dalam: *Penatalaksanaan terbaru ikterus*. Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro; 1998. p. 1-12.
- 41 Carter SM. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency [Online]. 2008 Nov 13 [cited 2008 Nov 28]; Available from: [URL:http://emedicine.medscape.com/article/200390-overview](http://emedicine.medscape.com/article/200390-overview).
- 42 Ratzinger G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency [Online]. 2005 Oct 12 [cited 2005 Oct 24]; Available from: [URL:http://www.med.edu/department/pathdept/web/lablines/vol813](http://www.med.edu/department/pathdept/web/lablines/vol813).
- 43 Srivastava SK, Beutler E. The transport of oxidized glutathione from human erythrocytes. *J Biol Chem* 1969;244(1):9-16.

- 
- 44 Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Glucose 6 phosphate dehydrogenase plays a key role in protection against reactive oxygen species. In: Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, editors. *Biochemistry* 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Freeman WH & Co; 2002. p.1-2.
- 45 Volpe JJ. Bilirubin and brain injury. In: Volpe JJ. *Neurology of the newborn*. Philadelphia: WB Saunders Company; 2001. p. 521-46.
- 46 Sellinger M, Haag K, Burckhardt G, Gerok W, Knauf H. Sulfated bile acids inhibit Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> antiport in human kidney brush-border membrane vesicles. *Am J Physiol* 1990;258:F986-91.
- 47 Levine RL, Fredericks WR, Rapoport SI. Clearance of bilirubin from rat brain after reversible osmotic opening of the blood-brain barrier. *Pediatr Res* 1985;19:1040-3.
- 48 Brodersen R, Stern L. Deposition of bilirubin acid in the central nervous system - a hypothesis for the development of kernicterus. *Acta Paediatr Scand* 1990;79:12-9.
- 49 Wennberg RP, Gospe SM Jr, Rhine WD, Seyal M, Saeed D, Sosa G. Brainstem bilirubin toxicity in the newborn primate may be promoted and reversed by modulating PCO<sub>2</sub>. *Pediatr Res* 1993;34:6-9.
- 50 Cochrane GC. Cellular injury by oxidants. *Am J Med* 1991; 91(3C):23S-30S.
- 51 Percival M. Antioxidants. *Clin Nutr Insights* 1998;Nut031 1/96 Rev 10/98:1-4.
- 52 Murray RK. *Harper's biochemistry*, 22<sup>nd</sup> ed. London: Prentice-Hall Int'l Inc; 1990. p. 142-3.
- 53 Combs GF. Vitamin E. In: Combs GF. *The vitamins, fundamental aspects in nutrition and health* 2<sup>nd</sup> ed. California: Academic Press; 1998. p. 189-223.
- 54 Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. Oxidants and antioxidants, state of art. *Am J Med* 1991;91(3C):2S-13S.
- 55 Oski FA, Naiman JL. Disorder of red cell metabolism. In: *Hematologic problems in the Newborn*, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 1972. p. 83-132.

- 
- 56 Segel GB. Enzymatic defect. In: Behrman RF, Kliegman RM, Jenson HB, editors. Nelson textbook of pediatrics, 17<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 2004. p. 1635-8.
- 57 Gallagher ML. Vitamins. In: Mahan LK, Escott-Stump S. Krause's food, nutrition, & diet therapy. Pennsylvania: Saunders; 2004. p. 75-119.
- 58 Mustacich DJ, Bruno RS, Traber MG. Vitamin E. In: Litwack G. Vitamin E, vitamins and hormones, advances in research and applications, volume 76. California: Elsevier; 2007. p. 1-21.
- 59 Combs GF. Chemical and physiological properties of vitamins. In: Combs GF. The vitamins, fundamental aspects in nutrition and health 2<sup>nd</sup> ed. California: Academic Press; 1998. p. 44-84.
- 60 Debier C. Vitamin E during pre- and postnatal periods. In: Litwack G. Vitamin E, vitamins and hormones, advances in research and applications, volume 76. California: Elsevier; 2007. p. 358-73.
- 61 Combs GF. Vitamin C. In: Combs GF. The vitamins, fundamental aspects in nutrition and health, 2<sup>nd</sup> ed. California: Academic Press; 1998. p. 245-75.
- 62 Sub Bagian Perinatologi RSUP Dr. Kariadi. Penatalaksanaan bayi normal. Dalam: Sub Bagian Perinatologi RSUP Dr. Kariadi. Prosedur tetap pelayanan perinatal risiko tinggi RSUP Dr. Kariadi Semarang, tingkat I-III. Semarang: RSUP Dr. Kariadi; 2005. p. 1-2.
- 63 Madiyono B, Moeslichan S, Sastroasmoro S, Budiman I, Purwanto SH. Perkiraan besar sampel. Dalam: Sastroasmoro S, Ismael S. Dasar-dasar metodologi penelitian klinis, edisi 2. Jakarta: CV Sagung Seto; 2002. p. 259-87.
- 64 Dade Behring Inc. Dimension® clinical chemistry system, flex® reagent cartridge. Newark: Dade Behring Inc; 2005. p. 1-2.
- 65 Biovision Research. Human vitamin E Elisa kit, catalog no. E0922h. California: Biovision Research Products; 2007. p. 1-3.
- 66 Biovision Research. Ascorbic acid assay kit, catalog #K661-100. California: Biovision Research Products; 2007. p. 1-2.

- 
- 67 Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III), 1988-94. CDC laboratory procedures used for NHANES III. *Nat Center for Health Stat* 1999 Jul;3A(11):1-50.
- 68 Necheles TF, Rai US, Valaes T. The role of haemolysis in neonatal hyperbilirubinaemia as reflected in carboxyhaemoglobin levels. *Acta Paediatr Scand* 1976;65(3):361-7.
- 69 Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, et al. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987;107(4):526-45.
- 70 Robles R, Palomino N, Robles A. Oxidative stress in the neonate. *Early Hum Dev* 2001;65 Suppl:S75-81.
- 71 Yigit S, Yurdakok M, Kilingç K, Oran O, Erdem G, Tekinalp G. Serum malondialdehyde concentration in babies with hyperbilirubinaemia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999;80(3):F235-7.
- 72 Dani C, Martelli E, Bertini G, Pezzati M, Filippi L, Rossetti M, et al. Plasma bilirubin level and oxidative stress in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88(2):F119-23.
- 73 Bracci R, Buonocore G, Talluri B, Berni S. Neonatal hyperbilirubinemia. Evidence for a role of the erythrocyte enzyme activities involved in the detoxification of oxygen radicals. *Acta Paediatr Scand* 1988;77(3):349-56.
- 74 Niki E, Yamamoto Y, Komuro E, Sato K. Membrane damage due to lipid oxidation. *Am J Clin Nutr* 1991;53(1 Suppl):201S-205S.
- 75 Strain JJ, Mulholland CW. Vitamin C and vitamin E - synergistic interactions in vivo? *EXS Journal* 1992;62:419-22.