



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH JUS BAYAM TERHADAP KADAR NO_x SERUM
DAN TEKANAN DARAH PADA LAKI-LAKI DEWASA MUDA**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister

I WAYAN GEDE SUTADARMA

0706171011

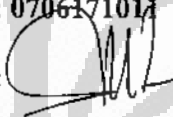
**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
PROGRAM PASCASARJANA PROGRAM STUDI ILMU GIZI
KEKHUSUSAN ILMU GIZI KLINIK
JAKARTA, JULI 2009**

LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun rujukan
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : I Wayan Gede Sutadarma

NPM : 0706171011

Tanda tangan: 

Tanggal : 9 Juli 2009

LEMBAR PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :

Nama : I Wayan Gede Sutadarma
NPM : 0706171011
Program Studi : Ilmu Gizi, Kekhususan Ilmu Gizi Klinik
Judul Tesis : Pengaruh Jus Bayam Terhadap Kadar NO_x Serum
Dan Tekanan Darah Pada Laki-laki Dewasa Muda

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister pada Kekhususan Ilmu Gizi Klinik, Program Studi Ilmu Gizi, Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I	: dr. Savitri Sayogo, SpGK	(.....)
Pembimbing II	: Dr. dr. Imam Effendi, SpPD-KGH	(.....)
Penguji	: Dr. dr. Parlindungan Siregar, SpPD-KGH	(.....)
Penguji	: Dr. dr. Ermita I. Ilyas, MS	(.....)
Penguji	: dr. Fikri Effendy, MOH, SpOk	(.....)
Penguji	: dr. Sri Sukmaniah, MSc, SpGK	(.....)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 9 Juli 2009

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadapan Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis ini.

Penelitian ini merupakan penelitian uji klinis mengenai pemberian jus bayam terhadap kadar NO_x serum dan tekanan darah pada laki-laki dewasa muda, yang dilakukan pada mahasiswa laki-laki semester dua Fakultas Kedokteran Universitas Udayana.

Selesainya tesis ini tidak lepas dari tuntunan dan bimbingan dari dosen pembimbing dan staf pengajar Departemen Ilmu Gizi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Untuk itu penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada dr. Savitri Sayogo, SpGK sebagai pembimbing I yang dengan kesabaran, ketekunan, dan ketelitian yang terus diberikan sejak seminar tinjauan pustaka hingga selesainya penyusunan tesis ini.

Kepada DR. dr. Imam Effendi, SpPD-KGH sebagai pembimbing II, penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya karena di sela-sela jadwal beliau yang padat, beliau masih meluangkan waktu untuk membimbing dan mengarahkan penulis dalam menyelesaikan tesis ini.

Ucapan terima kasih kepada dr. Victor Tambunan, MS, SpGK selaku Ketua Departemen Ilmu Gizi, dr. Lanny Lestiani, MSc, SpGK selaku Ketua Program Studi Ilmu Gizi, dan dr. Erwin Christianto, MGizi, SpGK selaku Ketua Kekhususan Ilmu Gizi Klinik beserta seluruh staf pengajar di Departemen Ilmu Gizi, atas bimbingan dan dukungan yang telah diberikan sejak awal menjalani pendidikan hingga saat ini.

Ucapan terima kasih kepada seluruh karyawan Departemen Ilmu Gizi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dan seluruh peserta program magister Kekhususan Ilmu Gizi Klinik, khususnya angkatan 2007 atas bantuan dan dukungannya.

Terima kasih yang tidak terhingga kepada seluruh subyek penelitian yang telah mengikuti seluruh rangkaian penelitian. Terima kasih kepada Rektor Universitas Udayana dan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Udayana yang telah mengijinkan penulis melanjutkan pendidikan dan memberikan bantuan dana

pendidikan. Terima kasih kepada seluruh staf pengajar, karyawan, petugas laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Udayana dan semua pihak yang telah membantu penulis selama proses pengambilan data.

Kepada Bapak I Nyoman Sugata dan keluarga, penulis mengucapkan terima kasih yang setinggi-tingginya atas bantuan dan kesediaannya menerima penulis selama tinggal di Jakarta untuk mengikuti pendidikan.

Seluruh sahabat dan semua pihak yang turut membantu walaupun tidak disebutkan satu per satu yang selalu mendukung dan memotivasi selama menjalankan pendidikan, penulis ucapkan terima kasih.

Penulis menghaturkan terima kasih yang setinggi-tingginya kepada kedua orang tua dan adik yang dengan tulus ikhlas memberikan dorongan, dukungan dan senantiasa berdoa untuk keberhasilan dalam pendidikan ini. Kepada istri tercinta, Ni Made Ayu Arisanthi, yang telah mendampingi dan memberikan doa serta motivasi sejak penulis memulai pendidikan hingga tesis ini diselesaikan. Kepada anakku, I Putu Gede Ranesa Arisuta, yang telah memberikan kebahagiaan baru dalam kehidupan penulis.

Akhir kata, penulis berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Jakarta, 9 Juli 2009

Penulis

**LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : I Wayan Gede Sutadarma

NPM : 0706171011

Program Studi : Ilmu Gizi

Fakultas : Kedokteran

Jenis Karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

**PENGARUH JUS BAYAM TERHADAP KADAR NO_x SERUM
DAN TEKANAN DARAH PADA LAKI-LAKI DEWASA MUDA**

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di Jakarta

Pada tanggal 9 Juli 2009

Yang menyatakan



(I Wayan Gede Sutadarma)

ABSTRAK

Nama : I Wayan Gede Sutadarma
Program studi : Ilmu Gizi, Kekhususan Ilmu Gizi Klinik
Judul : Pengaruh Jus Bayam Terhadap Kadar NO_x Serum
Dan Tekanan Darah Pada Laki-laki Dewasa Muda

Tujuan penelitian adalah diketahuinya pengaruh pemberian jus bayam 100 gram per hari selama empat minggu berturut-turut terhadap kadar NO_x serum dan tekanan darah pada laki-laki dewasa muda. Penelitian ini merupakan uji klinis paralel, membandingkan 17 orang kelompok yang mendapat jus bayam disertai penyuluhan gizi (P) dengan 17 orang kelompok yang hanya mendapat penyuluhan gizi saja (K). Sebanyak 34 mahasiswa laki-laki semester dua Fakultas Kedokteran Universitas Udayana yang memenuhi kriteria dibagi dalam dua kelompok secara randomisasi blok. Data yang diambil meliputi usia, aktivitas fisik, indeks massa tubuh, asupan energi, natrium, dan nitrat anorganik dengan *food recall* 2 x 24 jam dan *food record*. Pemeriksaan kadar nitrit, nitrat, dan NO_x serum serta tekanan darah dilakukan pada awal dan akhir perlakuan. Analisis data menggunakan uji t tidak berpasangan dan uji Mann Whitney dengan batas kemaknaan 5%. Sebanyak 17 orang kelompok P dan 16 orang kelompok K dengan median usia 18 (17-19) tahun yang mengikuti penelitian secara lengkap. Indeks aktivitas fisik subyek kedua kelompok termasuk rendah. Data awal tidak menunjukkan perbedaan bermakna ($p > 0,05$). Setelah empat minggu perlakuan, didapatkan persentase asupan energi dibandingkan kebutuhan energi total termasuk kategori cukup pada kedua kelompok ($84,93 \pm 10,60$ % vs $88,19 \pm 5,47$ %). Asupan natrium kedua kelompok selama perlakuan lebih rendah dibandingkan dengan angka kecukupan gizi 2004 (1083,00 (834,84-1797,50) mg/hari vs 923,95 (676,20-2494,05) mg/hari. Asupan nitrat anorganik lebih tinggi pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol (130,33 (107,28-195,85) mg/hari vs 30,79 (9,47-118,38) mg/hari. Pada kedua kelompok didapatkan peningkatan kadar nitrit, nitrat dan NO_x serum yang lebih tinggi pada kelompok perlakuan, namun secara statistik tidak bermakna ($p > 0,05$). Tidak didapatkan penurunan tekanan darah sistolik dan diastolik yang bermakna pada kelompok perlakuan ($p > 0,05$). Pemberian 100 gram jus bayam selama empat minggu berturut-turut tidak didapatkan peningkatan kadar nitrat, nitrit, dan NO_x serum serta penurunan tekanan darah sistolik dan diastolik pada kelompok perlakuan.

Kata kunci :

laki-laki dewasa muda, jus bayam, nitrat anorganik, kadar NO_x serum, tekanan darah

ABSTRACT

Name : I Wayan Gede Sutadarma
Study Program : Nutrition, Clinical Nutrition
Title : Effect of Spinach Juice on Serum NO_x Level
And Blood Pressure In Young Adult Male

The aims of this study were to investigate the effect of 100 gram per day spinach juice during four weeks on serum NO_x level and blood pressure in young adult male. The study was a parallel randomized clinical trial. Thirty four subjects of second semester male student Medical Faculty of Udayana University were selected using certain criteria. The randomly (block randomization) thirty four subject were divided into two group. The treatment group (n=17) received spinach juice and nutrition counseling; the control group (n=17) received nutrition counseling alone. Data collected included age, physical activity, body mass index, intake of energy, sodium, and inorganic nitrate using 2 x 24 hours food recall and food record. Laboratory findings (serum nitrite, nitrate, and NO_x levels) and blood pressure examination were done before and after intervention. For statistical analysis, unpaired t-test and Mann Whitney were used with the level of significance was 5%. Seventeen subjects in the treatment group and sixteen subjects in the control group completed the study and analyzed. Median of age were 18 (17-19) years old. The physical activity index in both groups were low. The characteristic of the two groups were closely matched at base line (p>0,05). After four weeks intervention, all subjects consumed energy achieved the recommended diet with an average of 84,93±10,60 % in the treatment group and 88,19±5,47 % in the control group. The average intake of sodium in both groups were lower than Indonesian recommended dietary allowance 2004 (1083,00 (834,84-1797,50) mg/day vs 923,95 (676,20-2494,05) mg/day). The average intake of inorganic nitrate in the treatment group increased significantly than in the control group (130,33 (107,28-195,85) mg/day vs 30,79 (9,47-118,38) mg/day). In conclusion, there were increase in serum nitrit, nitrat and NO_x levels which were higher in the treatment group, although not statistically significant (p>0,05). There were also no significant decrease in systolic and diastolic blood pressure in the treatment group (p>0,05). In conclusions, the effects of 100 gram per day spinach juice during four weeks did not increase serum nitrit, nitrat and NO_x level and also were not decrease systolic and diastolic blood pressure in the treatment group.

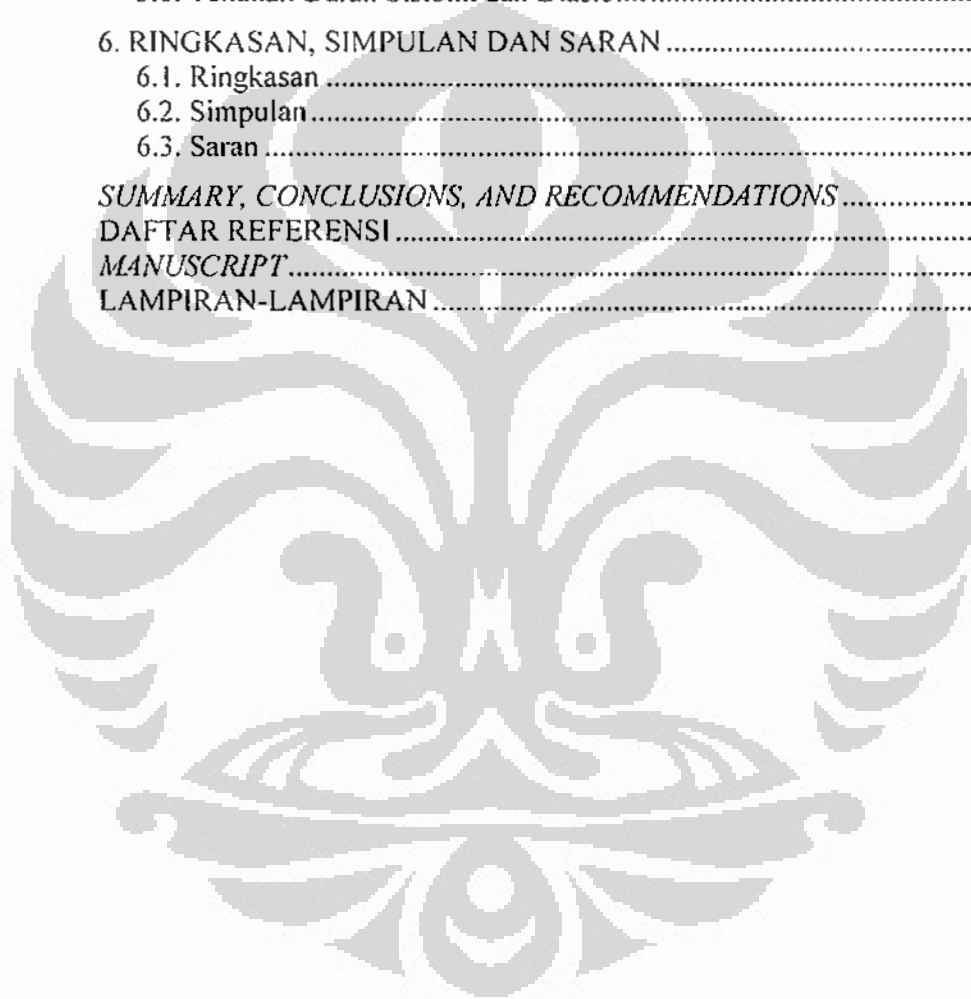
Keywords :

young adult male, spinach juice, inorganic nitrate, serum NO_x level, blood pressure.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vi
ABSTRAK.....	vii
<i>ABSTRACT</i>	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Permasalahan.....	3
1.2.1. Identifikasi Masalah.....	3
1.2.2. Perumusan Masalah.....	3
1.3. Hipotesis.....	3
1.4. Tujuan.....	3
1.4.1. Tujuan Umum.....	3
1.4.2. Tujuan Khusus.....	4
1.5. Manfaat.....	4
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Bayam.....	5
2.2. Nitrat Anorganik.....	6
2.3. Prahipertensi.....	10
2.4. Pengaruh Nitrat Anorganik Terhadap Kadar NO _x Serum dan Tekanan Darah Sistolik dan Diastolik.....	20
2.5. Kerangka Teori.....	24
2.6. Kerangka Konsep.....	25
3. METODE PENELITIAN.....	26
3.1. Rancangan Penelitian.....	26
3.2. Tempat dan Waktu Penelitian.....	26
3.3. Bahan Penelitian.....	26
3.4. Instrumen Pengumpulan Data.....	29
3.5. Cara Kerja.....	30
3.6. Identifikasi Variabel.....	35
3.7. Pengolahan, Analisis, Interpretasi, dan Penyajian Data.....	35
3.8. Batasan Operasional.....	36
3.9. Organisasi Penelitian.....	40
3.10. Kerangka Operasional.....	41
4. HASIL PENELITIAN.....	43
4.1. Seleksi Subyek Penelitian.....	43

4.2. Karakteristik Subyek Penelitian	44
4.3. Asupan Energi, Natrium, dan Nitrat Anorganik.....	45
4.4. Kadar Nitrit, Nitrat, dan NO _x Serum	47
4.5. Tekanan Darah Sistolik dan Diastolik.....	48
5. PEMBAHASAN.....	49
5.1. Keterbatasan Penelitian	49
5.2. Seleksi Subyek Penelitian.....	50
5.3. Karakteristik Data Dasar	52
5.4. Asupan Energi, Natrium, dan Nitrat Anorganik.....	55
5.5. Kadar Nitrat, Nitrit, dan NO _x Serum Setelah Perlakuan	59
5.6. Tekanan Darah Sistolik dan Diastolik	60
6. RINGKASAN, SIMPULAN DAN SARAN	62
6.1. Ringkasan	62
6.2. Simpulan.....	64
6.3. Saran	64
<i>SUMMARY, CONCLUSIONS, AND RECOMMENDATIONS</i>	66
DAFTAR REFERENSI	69
<i>MANUSCRIPT</i>	74
LAMPIRAN-LAMPIRAN	83

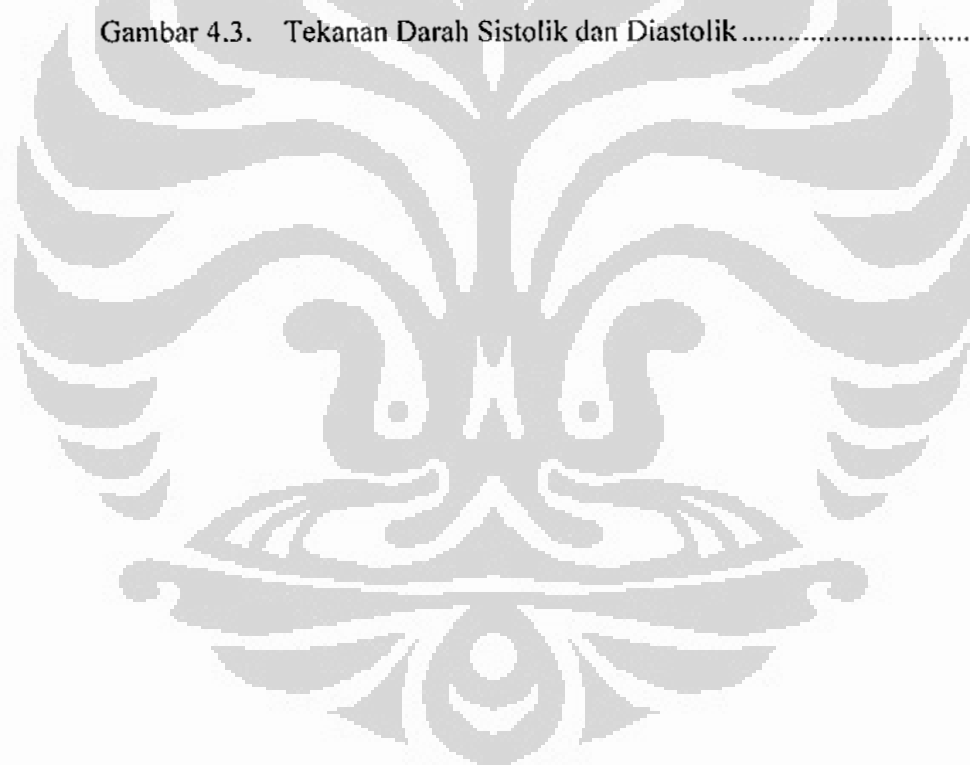


DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.	Kandungan Gizi Bayam Hijau Per 100 Gram	5
Tabel 2.2.	Kandungan Nitrat Dalam Bahan Makanan.....	9
Tabel 2.3.	Klasifikasi Tekanan Darah	10
Tabel 2.4.	Waktu Parun NO dan Produknya	14
Tabel 2.5.	Pedoman Penatalaksanaan Nutrisi Pada Prahipertensi.....	19
Tabel 2.6.	Ringkasan Beberapa Penelitian	23
Tabel 3.1.	Klasifikasi Status Gizi Dewasa Asia-Pasifik.....	37
Tabel 3.2.	Klasifikasi Status Gizi Usia < 18 Tahun	37
Tabel 3.3.	Interpretasi Persentase Asupan Energi	38
Tabel 3.4.	Interpretasi Asupan Natrium	38
Tabel 3.5.	Interpretasi Asupan Nitrat Anorganik	38
Tabel 3.6.	Interpretasi Indeks Aktivitas Fisik.....	39
Tabel 3.7.	Interpretasi Kadar NO _x Serum.....	39
Tabel 3.8.	Klasifikasi Tekanan Darah	40
Tabel 3.9.	Variabel Indikator Matriks	42
Tabel 4.1.	Sebaran Subyek Penelitian Berdasarkan Usia, Aktivitas Fisik, Indeks Massa Tubuh, Asupan Energi, Natrium, dan Nitrat Anorganik, Kadar Nitrit, Nitrat, dan NO _x Serum serta Tekanan Darah Sebelum Perlakuan	45
Tabel 4.2.	Asupan Energi, Natrium, dan Nitrat Anorganik Berdasarkan <i>Food Record</i> dan <i>Food Recall</i> 2 x 24 Jam Sebelum Perlakuan ..	45
Tabel 4.3.	Asupan Energi dan Persentase Terhadap Kebutuhan Energi Total.....	46
Tabel 4.4.	Asupan Natrium.....	46
Tabel 4.5.	Asupan Nitrat Anorganik.....	47

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Struktur Molekul Ion Nitrat.....	6
Gambar 2.2.	Pencernaan dan Ekskresi Nitrat Anorganik.....	7
Gambar 2.3.	Metabolisme Nitrat, Nitrit, dan NO.....	8
Gambar 2.4.	Pembentukan NO Dalam Darah dan Jaringan.....	15
Gambar 2.5.	Mekanisme Kerja NO Sebagai Vasodilator.....	16
Gambar 2.6.	Keseimbangan Pembentukan NO dan Radikal Peroksinitrit....	17
Gambar 2.7.	Bioavailabilitas NO dan Disfungsi Endotel.....	17
Gambar 2.8.	Disfungsi Endotel Pembuluh Darah	19
Gambar 4.1.	Alur Penelitian Yang Dilakukan.....	44
Gambar 4.2.	Kadar Nitrit, Nitrat, dan NO _x Serum	48
Gambar 4.3.	Tekanan Darah Sistolik dan Diastolik.....	48



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Kaji Etik Penelitian.....	83
Lampiran 2.	Lembar Informasi Penelitian	85
Lampiran 3.	Lembar Persetujuan	86
Lampiran 4.	Lembar Data Karakteristik Subyek	87
Lampiran 5.	Lembar Seleksi dan Riwayat Penyakit	88
Lampiran 6.	Lembar Catatan Asupan Makanan	90
Lampiran 7.	Lembar Asupan Makanan.....	92
Lampiran 8.	Lembar Keluhan Subyek	93
Lampiran 9.	Lembar Hasil Pemeriksaan Klinis	94
Lampiran 10.	Lembar Indeks Aktivitas Fisik	95
Lampiran 11.	Prosedur Pemeriksaan Laboratorium.....	98
Lampiran 12.	Prosedur Randomisasi Blok.....	101
Lampiran 13.	Prosedur Pembuatan Jus Jayam.....	102
Lampiran 14.	Contoh Menu Diet Seimbang Sehari.....	103

DAFTAR SINGKATAN



AF	: Aktivitas Fisik
IAF	: Indeks Aktivitas Fisik
AKG	: Angka Kecukupan Gizi
U	: Usia
BB	: Berat Badan
TB	: Tinggi Badan
IMT	: Indeks Massa Tubuh
URT	: Ukuran Rumah Tangga
SKRT	: Survei Kesehatan Rumah Tangga
Susenas	: Survei Sosial Ekonomi Nasional
KEB	: Kebutuhan Energi Basal
KET	: Kebutuhan Energi Total
DASH	: <i>Dietary Approaches to Stop Hypertension</i>
GTP	: <i>Guanosine Triphosphate</i>
JNC 7	: <i>The Seventh Report of the Joint National Committee</i>
NADPH	: <i>Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
eNOS	: <i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
NO _x	: Total Kadar Nitrat dan Nitrit
BH4	: <i>Tetrahydrobiopterin</i>
XO	: <i>Xanthine oxidase</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Prahipertensi merupakan keadaan yang ditandai meningkatnya tekanan darah sistolik antara 120-139 mm Hg atau diastolik antara 80-89 mm Hg dan merupakan gejala awal timbulnya hipertensi derajat satu.¹ Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) Indonesia 2004 menunjukkan rerata tekanan darah kelompok usia 15-24 tahun sebesar 119,8/76,5 mm Hg, dan selanjutnya meningkat sejalan dengan bertambahnya usia.² Prevalensi prahipertensi lebih banyak ditemukan pada laki-laki (40%) dibandingkan perempuan (23%).^{2,3}

Prahipertensi merupakan faktor risiko timbulnya berbagai penyakit kronis.⁴ Studi meta analisis memperlihatkan pada kelompok usia 40-80 tahun dengan tekanan darah di atas 115/75 mm Hg, apabila mengalami peningkatan tekanan darah sistolik sebesar 20 mm Hg atau tekanan darah diastolik sebesar 10 mm Hg akan meningkatkan risiko penyakit kardiovaskular menjadi dua kali lipat.⁵

Faktor risiko terjadinya prahipertensi terdiri dari faktor yang tidak dapat dimodifikasi yaitu genetik, usia, dan jenis kelamin; dan faktor yang dapat dimodifikasi meliputi obesitas, tingginya asupan energi, natrium, rendahnya asupan serat, kalium, kurang berolahraga, peminum alkohol dan perokok.⁵

Disfungsi endotel pembuluh darah merupakan salah satu penyebab timbulnya prahipertensi, dan keadaan tersebut menggambarkan perubahan fungsi sel endotel dalam mengatur tonus otot polos pembuluh darah akibat berkurangnya sekresi *nitric oxide* (NO) sebagai vasodilator dan bersifat reversibel.⁶ Berkurangnya sekresi NO salah satunya disebabkan karena berkurangnya sintesis NO endogen yang berasal dari arginin atau rendahnya asupan sumber nitrat anorganik yang terutama terdapat pada sayuran berwarna hijau seperti bayam.⁷

Data Survei Sosial Ekonomi Nasional (Susenas) 2004 menunjukkan hanya 60% dari populasi di Indonesia yang mengkonsumsi sayuran yang sesuai anjuran 4-5 kali sehari, sedangkan sisanya tingkat konsumsi sayuran tidak adekuat.⁸

Pedoman penatalaksanaan prahipertensi yang direkomendasikan oleh *The Seventh Report of the Joint National Committee (JNC 7)* menekankan pentingnya

modifikasi gaya hidup meliputi mempertahankan berat badan dalam batas-batas normal, membatasi asupan natrium, melakukan olahraga teratur, mengatur pola makan berdasarkan *Dietary Approaches to Stop Hypertension* (DASH), dan membatasi konsumsi alkohol.¹

Penelitian Plotnick dkk pada subyek dengan tekanan darah normal menunjukkan suplementasi kapsul ekstrak sayur dan buah selama empat minggu berhasil meningkatkan kadar nitrat dan nitrit serum secara bermakna.⁹ Penelitian Ohta dkk pada subyek dengan tekanan darah normal mendapatkan pemberian kombinasi penyuluhan gizi dan olahraga berjalan kaki dalam waktu satu jam per hari tiga kali per minggu, selama 12 minggu berhasil meningkatkan kadar nitrat dan nitrit serum serta menurunkan tekanan darah sistolik dan diastolik secara bermakna, walaupun penurunan tekanan darah tersebut tidak memiliki arti klinis.¹⁰ Penurunan tekanan darah sistolik sebesar 5,5 mm Hg dan diastolik sebesar 3 mm Hg pada prehipertensi sudah memiliki arti klinis.¹

Webb dkk melakukan penelitian pada subyek dengan tekanan darah normal yang diberikan nitrat anorganik ($34 \pm 0,1$ mmol/L) dalam jus bit 500 mL satu kali dalam 24 jam. Hasil penelitian menunjukkan terjadi peningkatan bermakna kadar nitrat dan nitrit serum serta penurunan bermakna tekanan darah sistolik dan diastolik. Setelah 24 jam, kadar nitrat dan nitrit serum serta tekanan darah kembali seperti sebelum perlakuan.¹¹ Namun sebaliknya, penelitian Larsen dkk menunjukkan pemberian suplementasi natrium nitrat (0,1 mmol/kg BB/hari) selama tiga hari didapatkan peningkatan kadar nitrat dan nitrit serum serta hanya menurunkan tekanan darah diastolik secara bermakna.¹²

Penelitian ini merupakan uji klinis fase II yang dilakukan pada mahasiswa laki-laki semester dua Fakultas Kedokteran Universitas Udayana dengan status gizi dan tekanan darah normal; membandingkan dua kelompok yaitu kelompok perlakuan mendapatkan 100 gram daun bayam hijau dalam bentuk jus bayam satu kali per hari selama empat minggu berturut-turut disertai penyuluhan gizi dan kelompok kontrol hanya mendapatkan penyuluhan gizi saja.

1.2. Permasalahan

1.2.1. Identifikasi Masalah

1. Tingginya rerata tekanan darah penduduk Indonesia sejalan dengan bertambahnya usia.
2. Prevalensi prahipertensi lebih banyak ditemukan pada laki-laki dibandingkan perempuan.
3. Rendahnya tingkat konsumsi sayuran penduduk Indonesia sesuai anjuran yang adekuat.

1.2.2. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka dapat ditetapkan perumusan masalah sebagai berikut :

Apakah pemberian jus bayam 100 gram satu kali per hari selama empat minggu berturut-turut disertai penyuluhan gizi pada mahasiswa laki-laki semester dua Fakultas Kedokteran Universitas Udayana dengan status gizi dan tekanan darah normal dapat meningkatkan kadar NO_x serum sebesar $25 \mu\text{mol/L}$ dan menurunkan tekanan darah sistolik sebesar $5,5 \text{ mm Hg}$ dan diastolik sebesar 3 mm Hg dibandingkan bila hanya mendapat penyuluhan gizi saja?

1.3. Hipotesis

Pada mahasiswa laki-laki semester dua Fakultas Kedokteran Universitas Udayana dengan status gizi dan tekanan darah normal, pemberian jus bayam 100 gram satu kali per hari selama empat minggu berturut-turut disertai penyuluhan gizi dapat

1. meningkatkan kadar NO_x serum sebesar $25 \mu\text{mol/L}$
2. menurunkan tekanan darah sistolik sebesar $5,5 \text{ mm Hg}$
3. menurunkan tekanan darah diastolik sebesar 3 mm Hg

dibandingkan bila hanya mendapat penyuluhan gizi saja.

1.4. Tujuan

1.4.1. Tujuan Umum

Untuk mengendalikan timbulnya prahipertensi dan hipertensi derajat satu.

1.4.2. Tujuan Khusus

1. Diketuainya karakteristik subyek penelitian menurut usia dan aktivitas fisik sebelum perlakuan.
2. Diketuainya asupan energi, natrium, dan nitrat anorganik pada dua hari sebelum perlakuan dengan metoda *food recall* 2 x 24 jam.
3. Diketuainya asupan energi, natrium, dan nitrat anorganik pada minggu 0, 2 dan 4 perlakuan dengan metoda *food record*.
4. Diketuainya kadar nitrit, nitrat, dan NO_x serum sebelum dan setelah perlakuan pada kedua kelompok.
5. Diketuainya tekanan darah sistolik dan diastolik sebelum dan setelah perlakuan pada kedua kelompok.

1.5. Manfaat

1. Untuk subyek penelitian
Diharapkan dapat menjadi sumber pengetahuan yang benar tentang pengaruh bahan makanan sumber nitrat anorganik terhadap tekanan darah sehingga dapat mencegah prahipertensi.
2. Untuk institusi
Diharapkan dapat memberikan konfirmasi terhadap hasil penelitian terdahulu dan dapat dipakai sebagai landasan penelitian selanjutnya.
3. Untuk masyarakat
Diharapkan dapat memberikan informasi yang benar mengenai manfaat nitrat anorganik terhadap tekanan darah dan berperan menurunkan risiko penyakit degeneratif.
4. Untuk peneliti
Diharapkan dapat menerapkan pengetahuan yang didapat selama kuliah dan melatih cara berpikir dan membuat penelitian dengan metodologi penelitian yang benar.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bayam

Bayam merupakan tanaman yang banyak terdapat di Asia, tersebar dari Asia tengah sampai Asia Tenggara. Tanaman bayam pertama kali ditemukan di daerah Persia (Iran), kemudian oleh bangsa Nepal dibawa ke Cina pada abad ke-7 dan dibawa ke Spanyol pada abad ke-11.¹³

2.1.1. Botani

Menurut taksonomi, bayam diklasifikasikan dalam kingdom Plantae, divisi Magnoliophyta, kelas Magnoliopsida, ordo Caryophyllales, famili Amaranthaceae, genus *Spinacia*, dan spesies *Spinacia oleracea*. Berdasarkan morfologinya, tanaman bayam terdiri dari akar, batang, daun, dan bunga. Akar tanaman bayam berbentuk serabut; batang tidak bercabang; daun berbentuk oval berwarna hijau atau merah; dan bunga berwarna hijau-kuning dengan diameter 3-4 mm.¹³

2.1.2. Kandungan Nutrisi

Kandungan zat gizi bayam bervariasi tergantung pada jenis, kematangan, kondisi lingkungan dimana bayam tersebut tumbuh, waktu panen, penyimpanan, dan pengolahan.¹⁵ Berikut tabel kandungan gizi bayam hijau mentah per 100 gram.

Tabel 2.1. Kandungan Gizi Bayam Hijau Per 100 Gram

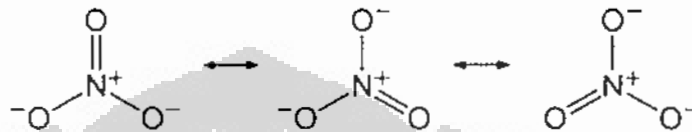
Komponen	Nilai Gizi
Energi (kkal)	20
Karbohidrat (g)	3,6
Protein (g)	2,2
Lemak (g)	0,4
Lutein (µg)	5626
Vitamin A (µg)	469
Serat (g)	2,2
Vitamin C (mg)	28
Vitamin E (mg)	2
Folat (µg)	194
Vitamin K (µg)	483
Nitrat anorganik (mg)	99
Kalsium (mg)	99
Besi (mg)	2,7

Sumber : telah diolah kembali dari USDA¹⁴

2.2. Nitrat Anorganik

2.2.1. Sifat Fisika dan Kimia

Struktur kimia ion nitrat (NO_3^-) terdiri dari atom nitrogen, dikelilingi tiga atom oksigen membentuk planar trigonal. Ion nitrat berkonjugasi dengan molekul lain seperti Na^+ , K^+ membentuk garam nitrat sehingga menjadi lebih stabil, dan bersifat larut air (polar).¹⁵



Gambar 2.1. Struktur Molekul Ion Nitrat

Sumber : Barnum¹⁵

2.2.2. Pencernaan dan Metabolisme Nitrat Anorganik

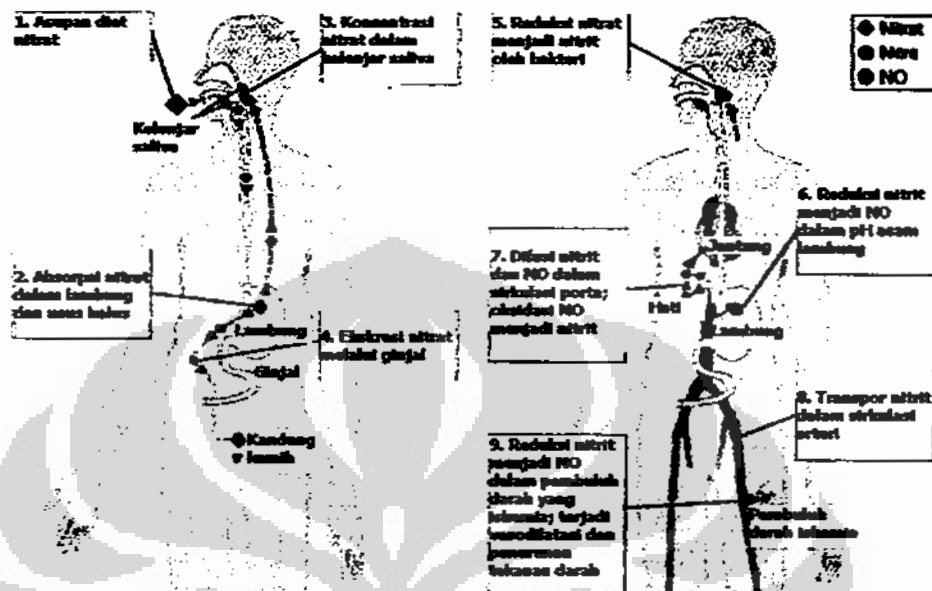
Absorpsi, Transpor dan Ekskresi

Nitrat anorganik diabsorpsi secara difusi tanpa dipengaruhi faktor apapun melalui lambung dan usus halus, selanjutnya masuk peredaran darah. Jumlah nitrat yang diabsorpsi antara 90-100%, selanjutnya 25% dibawa ke kelenjar air liur melalui siklus entero-saliva. Nitrat yang disekresi bersama air liur akan direduksi menjadi nitrit (NO_2^-) oleh bakteri komensal (*Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus intermedius*) yang terdapat di bagian belakang kelenjar air liur. Nitrit yang ditelan bersama air liur sebagian akan direduksi menjadi NO setelah sampai lambung akibat paparan pH asam.^{16,17}

Nitrit dan NO dapat langsung diabsorpsi secara difusi masuk peredaran darah, berikatan dengan hemoglobin eritrosit membentuk HbNO dan S-nitroso hemoglobin (SNO) selanjutnya beredar ke seluruh tubuh. Karena waktu paruh NO dalam darah sangat singkat, NO cepat dioksidasi kembali menjadi nitrat dan nitrit. Sebaliknya nitrat dan nitrit dapat direduksi kembali menjadi NO. Apabila terdapat peningkatan tahanan perifer pembuluh darah, maka nitrat akan direduksi menjadi nitrit selanjutnya nitrit direduksi menjadi NO.^{16,17}

Ekskresi nitrat sebagian besar (65-70%) melalui urin; ekskresi maksimal terjadi setelah lima jam mengkonsumsi nitrat dan kadar nitrat serum kembali

normal setelah 18 jam. Sebagian kecil (25%) nitrat disekresi melalui kelenjar air liur, dan sekresinya tersebut dipengaruhi oleh variasi diurnal.¹⁷



Gambar 2.2. Pencernaan dan Ekskresi Nitrat Anorganik

Sumber : telah diolah kembali dari Webb dkk¹¹

Metabolisme

Pada keadaan normal, nitrit serum bersama oksihemoglobin akan membentuk nitrat kembali dan selanjutnya nitrat dibawa kembali menuju kelenjar air liur melalui siklus entero-saliva. Pada keadaan hipoksia, nitrit bersama deoksihemoglobin akan direduksi menjadi NO. Hal tersebut menggambarkan nitrit merupakan cadangan untuk membentuk NO.^{7,17}

Di dalam jaringan, NO dibentuk dari arginin dengan kofaktor NADPH, oksigen (O_2), dan *tetrahydrobiopterin* (BH4) serta katalisis enzim *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS). NO yang tidak digunakan akan dioksidasi kembali menjadi nitrit. Apabila NO diperlukan kembali, nitrit dalam jaringan tersebut akan direduksi menjadi NO dengan katalisis enzim *xanthine oxidase* (XO).^{7,17}

Nitrat anorganik dari bahan makanan dapat direduksi menjadi nitrit, kemudian pada keadaan hipoksia jaringan, nitrit dapat langsung direduksi menjadi NO tanpa memerlukan enzim XO, ion H^+ , dan sitokrom mitokondria.⁷

50%. Disamping itu, nitrat dan nitrit juga dipakai sebagai bahan pengawet daging dan produk olahannya.¹⁸ Berdasarkan tabel 2.2, dapat dilihat bahan makanan sumber nitrat terutama berasal dari sayuran seperti seledri, selada, dan bayam, sebaliknya daging yang diawetkan dan produk olahannya mengandung nitrat dalam jumlah rendah.

Tabel 2.2. Kandungan Nitrat Dalam Bahan Makanan

Bahan Makanan	Rata-rata (mg/100 gr)	Rentangan (mg/100 gr)
Seledri	161	88-232
Selada	159	8,3-342
Bayam	99	10-156
Bit	76,3	26-222
Kubis	33,1	12-69
Brokoli	13,3	5,1-28
Kentang	12,9	4,8-24
Labu	6,5	<0,5-35
Wortel	5,8	<0,5-29
Hamburger	7,6	0,6-21,1
Salami	2,4	<0,5-5,6
Kornet	1,8	0,7-3,6
Ham	1,6	<0,5-8,1
Pizza	0,5	<0,5-1
Keju	0,2	<0,5-0,9

Sumber : telah diolah kembali dari Thomson¹⁸

2.2.5. Toksisitas

Toksisitas terjadi apabila masukan nitrat tinggi (> 330 mg/kg berat badan) dalam waktu lama. Gejala toksisitas berawal dari perubahan nitrat menjadi nitrosamin atau methemoglobin. Dalam lambung dengan pH asam, nitrat diubah menjadi nitrit selanjutnya nitrit bereaksi dengan asam amino seperti prolin menghasilkan nitrosamin yang bersifat karsinogenik. Nitrosamin langsung diserap secara difusi melalui pembuluh darah dan terakumulasi dalam sel yang mengakibatkan gangguan sintesis protein sel.¹⁹

Studi epidemiologi memperlihatkan tidak terdapat hubungan antara konsumsi nitrat dalam sayuran dengan kanker, hal tersebut disebabkan karena sayuran juga mengandung antioksidan sehingga pembentukan nitrosamin terhambat, sebaliknya terdapat hubungan antara konsumsi nitrit dalam daging

yang diawetkan terhadap kejadian kanker. Efek toksik nitrit 10 kali lebih berbahaya daripada nitrat karena nitrit lebih cepat diubah menjadi nitrosamin.¹⁹

Oksidasi nitrit dengan deoksihemoglobin pada keadaan hipoksia membentuk methemoglobin. Methemoglobin dapat bereaksi dengan radikal hidrogen peroksida sehingga menyebabkan destruksi eritrosit. Asupan tinggi nitrit akan mempercepat pembentukan methemoglobin, dibuktikan pada penelitian yang dilakukan pada orang sehat yang diberikan nitrit 460 mg/L, didapatkan efek samping berupa gejala mual, muntah, sakit kepala, dan kebiruan pada mukosa bibir.²⁰

2.3. Prahipertensi

2.3.1. Definisi

Prahipertensi merupakan keadaan yang ditandai meningkatnya tekanan darah sistolik antara 120-139 mm Hg atau tekanan darah diastolik antara 80-89 mm Hg, yang didapatkan dari perhitungan rerata tiga kali pengukuran tekanan darah.¹ Berdasarkan JNC 7, tekanan darah diklasifikasikan seperti pada tabel berikut ini.

Tabel 2.3. Klasifikasi Tekanan Darah

Klasifikasi	Sistolik (mm Hg)		Diastolik (mm Hg)
Normal	< 120	dan	< 80
Prahipertensi	120-139	atau	80-89
Hipertensi Derajat 1	140-159	atau	90-99
Hipertensi Derajat 2	≥ 160	atau	≥ 100

Sumber : telah diolah kembali dari Chobanian dkk¹

Prahipertensi terjadi apabila keadaan curah jantung dan atau tahanan perifer pembuluh darah meningkat. Curah jantung dipengaruhi oleh tekanan vena dan kontraksi otot jantung, sedangkan tahanan perifer pembuluh darah dipengaruhi oleh keseimbangan antara vasokonstriktor dan vasodilator.²¹

Apabila tekanan darah meningkat, saraf parasimpatis akan terangsang untuk mensekresi asetilkolin, yang kemudian ditangkap oleh reseptor asetilkolin pada permukaan sel endotel. Akibatnya sel endotel akan mensintesis dan mensekresi NO, suatu vasodilator kuat yang menyebabkan relaksasi otot polos pembuluh darah. Karenanya dapat dimengerti peningkatan tahanan pembuluh darah dapat terjadi antara lain pada keadaan disfungsi endotel pembuluh darah.

Salah satu teori mengenai mekanisme terjadinya prahipertensi berhubungan dengan disfungsi endotel pembuluh darah dan rendahnya bioavailabilitas NO.²¹

2.3.2. Faktor Risiko Prahipertensi

Faktor risiko prahipertensi terdiri dari faktor yang tidak dapat dimodifikasi yaitu genetik, usia, dan jenis kelamin; dan faktor yang dapat dimodifikasi meliputi obesitas, tingginya asupan energi, natrium, rendahnya asupan serat dan kalium, kurang berolahraga, perokok dan peminum alkohol.²²

Genetik

Peran faktor genetik dibuktikan melalui kejadian prahipertensi lebih banyaknya pada subyek yang orang tuanya menderita prahipertensi atau hipertensi.²²

Usia

Prahipertensi terjadi mulai rerata usia 25 tahun dan meningkat sejalan dengan bertambahnya usia. Proses penuaan menimbulkan perubahan anatomi dan fisiologi pembuluh darah yang dapat meningkatkan tekanan darah.^{2,22,49}

Jenis Kelamin

Prevalensi prahipertensi lebih banyak ditemukan pada laki-laki dibanding perempuan, hal ini berkaitan dengan hormon androgen yang dapat meningkatkan stres oksidatif dan vasokonstriksi ginjal sehingga meningkatkan tekanan darah.^{2,3,22}

Obesitas

Kelebihan berat badan $\geq 20\%$ dari berat badan ideal, meningkatkan risiko prahipertensi menjadi dua kali daripada non obes. Mekanisme yang diduga berperan adalah bahwa pada obesitas terjadi peningkatan katekolamin serum, aktifitas saraf simpatis dan sekresi insulin sehingga meningkatkan retensi natrium pada ginjal serta menstimulasi sistem renin-angiotensin-aldosteron, yang mengakibatkan peningkatan curah jantung, dan hal tersebut meningkatkan deiodinasi tiroksin menjadi triiodotironin yang dapat merangsang reseptor beta adrenergik, sehingga sensitif terhadap perubahan tekanan darah.^{22,48,49}

Asupan Tinggi Natrium

Asupan tinggi natrium dapat mengganggu kemampuan ginjal mengekskresikan kelebihan natrium, yang berakibat meningkatkan kadar natrium, klorida, air dalam

darah, sehingga mengakibatkan terjadinya peningkatan volume plasma dan curah jantung, yang mempengaruhi tekanan darah.^{22,48}

Kurang Berolahraga

Kurang berolahraga terutama jenis aerobik, berakibat penurunan aliran darah yang bersifat pulsatil, menurunkan produksi NO yang secara paralel menurunkan produksi *endothelial drive relaxing factor* (EDRF) sehingga menyebabkan peningkatan tekanan darah.^{22,47,49}

Perokok

Komponen yang terdapat dalam rokok seperti nikotin dan tar bersifat toksik dan reaktif. Tar mengandung 10^{14} radikal bebas dan komponen gas mengandung 10^{15} radikal bebas. Radikal bebas tersebut (superoksida, quinone, hidroksil, peroksil) mempunyai efek langsung meningkatkan pelepasan norepinefrin oleh sistem saraf simpatis, yang mengakibatkan peningkatan tekanan darah.^{22,49}

Peminum Alkohol

Konsumsi alkohol sebanyak 3 sloki (3 oz) per hari merupakan ambang bagi kenaikan tekanan darah dan dapat menyebabkan peningkatan tekanan darah 3 mm Hg. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pengurangan konsumsi alkohol dapat menurunkan tekanan darah sistolik dan diastolik. Mekanisme bagaimana alkohol dapat mempengaruhi tekanan darah belum dapat dipastikan. Diduga alkohol meningkatkan aktivitas sistem saraf simpatis yang akan mensekresikan norepinefrin, mengakibatkan peningkatan tekanan darah.^{22,48,49}

2.3.3. Mekanisme Pengendalian Tekanan Darah

Pengendalian tekanan darah pada dasarnya adalah pengendalian curah jantung dan pengendalian tahanan vaskular perifer. Terdapat dua mekanisme pengendalian tekanan darah, yaitu mekanisme neural dan mekanisme humoral. Mekanisme neural mempengaruhi kontraksi otot jantung dan tahanan vaskular sedangkan mekanisme humoral ditentukan oleh curah jantung maupun tahanan vaskular.²³

Mekanisme Neural

Mekanisme neural terjadi melalui sistem saraf otonom, apabila tekanan darah menurun, saraf simpatis akan terangsang, neuron pasca ganglion saraf simpatis akan mensekresi neurotransmitter norepinefrin, mengakibatkan vasokonstriksi dan

kontraksi otot jantung. Sebaliknya apabila tekanan darah meningkat, saraf parasimpatis akan terangsang, neuron pasca ganglion saraf parasimpatis akan mensekresi asetilkolin, kemudian ditangkap oleh reseptor asetilkolin pada sel endotel. Sebagai akibatnya, sel endotel akan mensintesis dan mensekresi NO, suatu vasodilator kuat yang menyebabkan relaksasi otot jantung.²³

Mekanisme Humoral

Titik berat pengendalian tekanan darah melalui mekanisme ini terjadi melalui arus balik vena. Arus balik vena dikendalikan oleh tiga aktivitas yang saling berkaitan sebagai berikut :

Aktivitas Sistem Renin-Angiotensin

Pada keadaan perfusi ginjal menurun, juxtaglomerular ginjal akan menghasilkan enzim renin, yang berperan menghidrolisis angiotensinogen menjadi angiotensin I. Selanjutnya angiotensin I akan diubah menjadi angiotensin II oleh *angiotensin converting enzyme* (ACE). Angiotensin II ditangkap oleh reseptor pembuluh darah (vaskular ATR-1), sehingga terjadi vasokonstriksi dan apabila ditangkap oleh reseptor sel korteks adrenal (adrenal ATR-1), akan mensekresi aldosteron.²³

Aktivitas Hormon Mineralokortikoid

Aldosteron dihasilkan dari progesteron oleh korteks adrenal. Angiotensin II merangsang sintesis enzim aldosteron sintase selanjutnya mengkatalisis kortikosteron menjadi aldosteron. Pengikatan aldosteron oleh reseptor aldosteron di ginjal akan membuka *epithelial Na channel* (EnaC) yang selanjutnya meningkatkan reabsorpsi ion natrium.²³

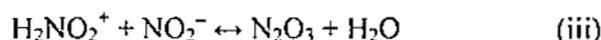
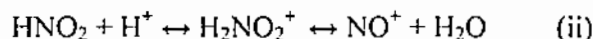
Reabsorpsi Natrium

Reabsorpsi natrium terjadi melalui beberapa saluran ion, salah satunya EnaC yang aktivitasnya dikendalikan oleh aldosteron. Reabsorpsi natrium akan disertai oleh reabsorpsi air dan hal tersebut akan meningkatkan volume plasma, yang mengakibatkan peningkatan aliran balik vena.²³

2.3.4. Bioavailabilitas NO Tubuh

NO dibentuk dari oksidasi arginin bersama kofaktor NADPH, oksigen, dan BH4 dengan katalisis enzim eNOS, dan menghasilkan nitrat dan nitrit sebagai metabolit

antara. Nitrit dapat direduksi menjadi NO dalam jaringan melalui katalisis enzim XO, penambahan proton (H^+), dan sitokrom mitokondria. Reaksi pembentukan NO berlangsung pada pH asam seperti berikut ini.²⁴



Selain berasal dari arginin, NO juga berasal dari nitrat organik (seperti *glyseril trinitrate*/GTN) maupun nitrat anorganik. Dalam peredaran darah, NO berikatan dengan hemoglobin dalam eritrosit membentuk HbNO dan S-nitrosohemoglobin (SNO-Hb). Hal ini menyebabkan peran vasodilator NO dapat terjadi sampai ke bagian distal.²⁴

Tabel 2.4. Waktu Paruh NO dan Produknya

NO dan Produknya	Kadar Serum (nmol/L)	Waktu Paruh ($T_{1/2}$)
Nitrat	20.000-50.000	5-8 jam
Nitrit	100-500	1-5 menit
NO	< 1	1-2 mili detik
HbNO	< 1-200	15 menit

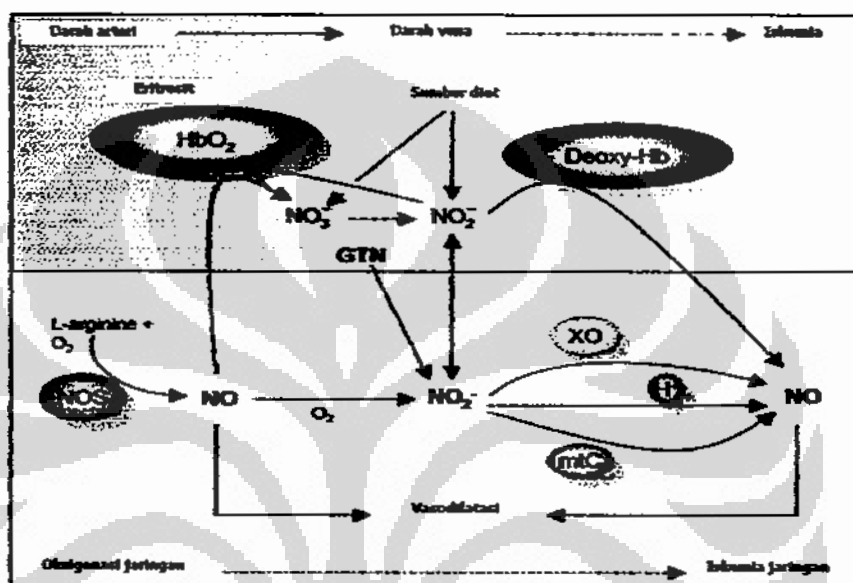
Sumber : telah diolah kembali dari Lundberg dan Weitzberg¹⁷

Dalam serum, waktu paruh NO sangat singkat karena cepat dipakai oleh sel endotel pembuluh darah sebagai vasodilator. Waktu paruh nitrit lebih pendek daripada nitrat karena nitrat dapat direduksi menjadi nitrit kemudian cepat direduksi menjadi NO pada keadaan hipoksia. Kadar nitrat, nitrit dan NO dalam serum berbanding lurus dengan waktu paruhnya.²⁴

NO yang disekresi oleh sel endotel dengan cepat akan dioksidasi membentuk nitrit, kemudian berikatan dengan hemoglobin membentuk nitrat. Kadar nitrat dan nitrit relatif stabil di dalam darah, sehingga total kadar nitrit dan nitrat serum (NO_x) dipakai sebagai indikator sintesis NO tubuh.¹⁷

Pemeriksaan kadar NO secara langsung sangat sulit dilakukan, karena senyawa NO berupa gas, bersifat polar, dan memiliki waktu paruh yang sangat singkat. Senyawa nitrat dan nitrit merupakan metabolit antara NO yang memiliki waktu paruh yang lebih lama sehingga relatif stabil.⁴¹ Beberapa metoda

pemeriksaan kadar NO yang sering dilakukan antara lain metoda oksidasi hemoglobin, *chemiluminescent*, reaksi Griess, dan konversi arginin-sitrulin. Metoda pemeriksaan tersebut hanya menggambarkan bioavailabilitas NO tubuh, sedangkan bioaktivitas NO dapat diketahui dari perubahan ekspresi gen enzim eNOS yang mengkatalisis arginin menjadi NO.⁴¹

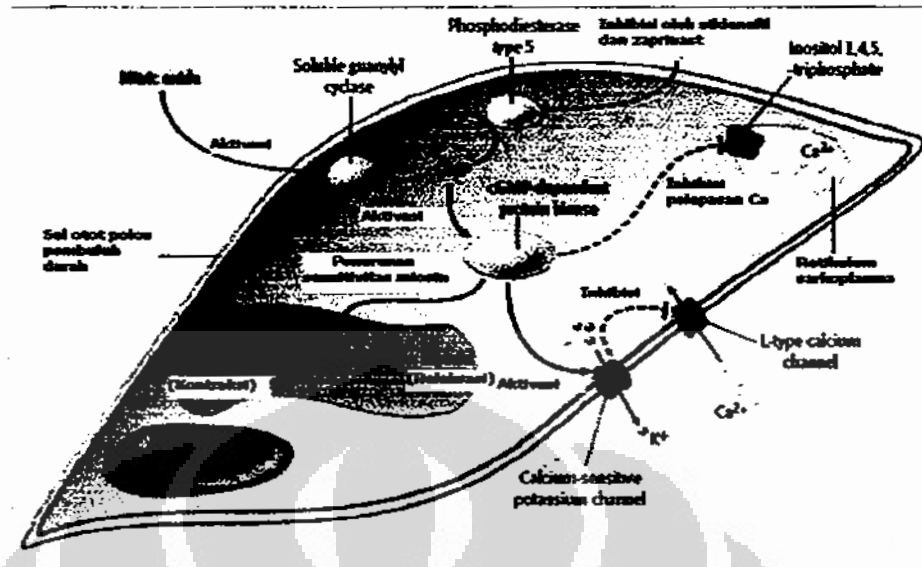


Gambar 2.4. Pembentukan NO Dalam Darah dan Jaringan

Sumber : telah diolah kembali dari Lundberg dan Weitzberg¹⁷

2.3.5. NO Sebagai Vasodilator

NO yang terbentuk diambil oleh jaringan untuk menjalankan fungsinya sebagai vasodilator melalui aktivasi enzim *guanylyl cyclase* (GC) yang mengubah *guanosine triphosphate* (GTP) menjadi *cyclic guanosine monophosphate* (cGMP). Selanjutnya cGMP mengaktifkan *cGMP dependent-protein kinase* (cGKI) yang berperan menurunkan sensitivitas miosin dan menurunkan kadar kalsium intrasel melalui aktivasi *calcium sensitive potassium channel* dan menghambat pelepasan kalsium dari retikulum endoplasma. cGMP didegradasi oleh *phosphodiesterase* (PDE) sebagai umpan balik negatif untuk mengatur keseimbangan vasodilatasi dan vasokonstriksi.²⁸



Gambar 2.5. Mekanisme Kerja NO Sebagai Vasodilator

Sumber : telah diolah kembali dari Griffiths dan Evans²⁸

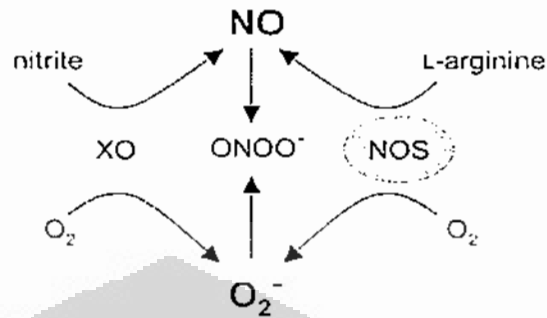
2.3.6. Disfungsi Endotel Pembuluh Darah

Sel endotel pembuluh darah berperan mengatur homeostasis peredaran darah secara dinamis dengan mengatur volume lumen dan tonus sel-sel otot polos pembuluh darah. Salah satu mekanisme tubuh mempertahankan tekanan darah adalah dengan mensekresi NO sebagai respon apabila terjadi peningkatan tekanan darah. NO disintesis dan disekresi oleh sel endotel pembuluh darah untuk mengatur tonus sel-sel otot pembuluh darah apabila pembuluh darah mengalami kontraksi. Selain itu, NO juga berperan menghambat aktivasi, adhesi, agregasi platelet, dan proliferasi sel-sel otot polos pembuluh darah.¹⁷

Apabila bioaktivitas NO dalam sel endotel pembuluh darah menurun akibat rendahnya bioavailabilitas NO, hal tersebut akan menimbulkan *gangguan endothelium dependent vasorelaxation* sebagai disfungsi endotel. Rendahnya bioavailabilitas NO disebabkan oleh berkurangnya pembentukan enzim eNOS, XO dan oksigen serta rendahnya asupan nitrat anorganik.

Rendahnya bioavailabilitas NO jaringan akibat menurunnya sumber NO endogen dan eksogen atau berkurangnya bioaktivitas NO, dapat menimbulkan prahipertensi serta progresivitas penyakit kardiovaskular. Walaupun sintesis NO normal, namun bioaktivitasnya dapat berkurang akibat tingginya oksidasi NO oleh

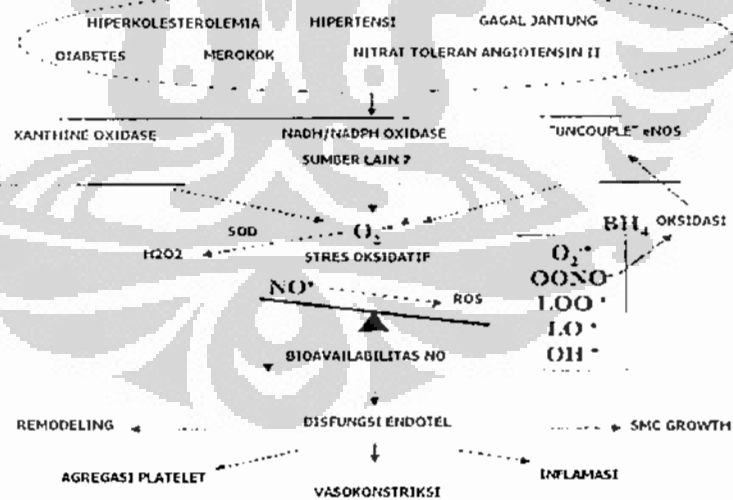
radikal superoksida yang berakibat menurunnya efek vasodilator endogen sehingga penurunan tekanan darah terhambat.²⁵



Gambar 2.6. Keseimbangan Pembentukan NO dan Radikal Peroksinitrit

Sumber : Lundberg dan Weitzberg¹⁷

Ketidakseimbangan substrat untuk sintesis NO menyebabkan terbentuknya radikal peroksinitrit. Radikal superoksida akan terbentuk apabila kadar arginin rendah maupun pada keadaan pasca perfusi setelah iskemia. Ketidakseimbangan jumlah radikal superoksida dan NO menyebabkan terbentuknya radikal peroksinitrit.¹⁰ Peningkatan jumlah radikal bebas dan penurunan bioavailabilitas NO memperberat disfungsi endotel.¹⁷



Gambar 2.7. Bioavailabilitas NO dan Disfungsi Endotel

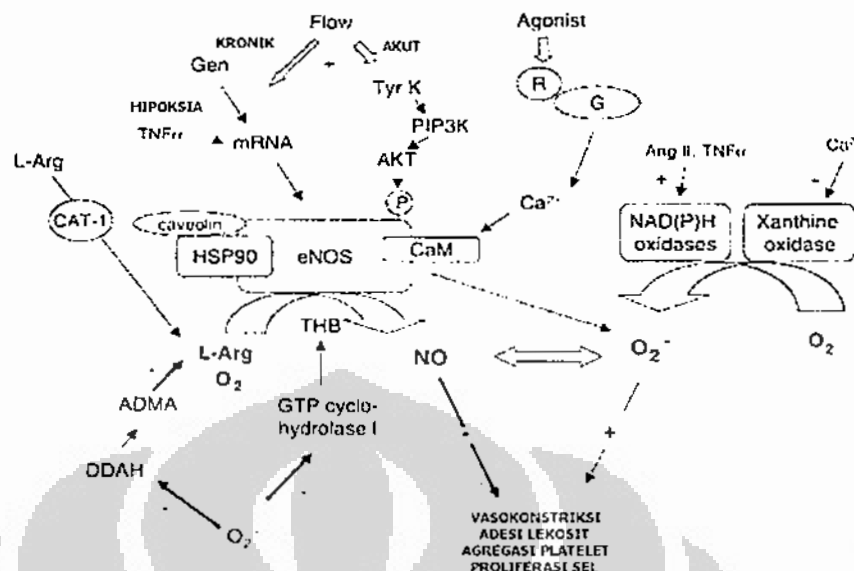
Sumber : telah diolah kembali dari Cai dan Harrison²⁶

Selain itu, menurunnya pembentukan NO dalam tubuh berhubungan dengan rendahnya asupan bahan makanan sumber NO. Bahan makanan sumber NO terutama berasal dari sayuran berwarna hijau seperti bayam, selada dan seledri. Bahan makanan tersebut mengandung nitrat anorganik yang apabila dikonsumsi dalam jumlah yang cukup (4-5 porsi per hari) akan meningkatkan bioavailabilitas NO dalam tubuh. Selain mengandung nitrat anorganik, sayuran juga mengandung vitamin, mineral dan antioksidan yang dapat meredam efek radikal bebas, sehingga bioavailabilitas NO dapat dipertahankan.¹⁷

Walaupun eNOS diekspresikan secara terus-menerus, namun ekspresinya juga dapat dimodulasi oleh aliran darah, toksin, dan sitokin. Perubahan ekspresi eNOS dapat mengakibatkan gangguan sintesis NO. Sejumlah jalur mengatur fungsi eNOS pada tingkat pasca translasi. Sebagai contoh, eNOS pasca translasi terhambat oleh karena adanya interaksi dengan *caveolin*, suatu protein utama yang berupa vesikel berukuran 50-100 nm dari membran serum yang disebut sebagai *caveolae*. Prahipertensi dapat mengakibatkan penurunan produksi NO melalui interaksi eNOS dan *caveolin*, sehingga fungsi eNOS terhambat.²⁷

Aktivasi eNOS tergantung dari protein kinase Akt pada residu serin 1177 dan defosforilasi treonin 495. Beberapa inhibitor eNOS endogen, seperti *asymmetric dimethyl arginine* (ADMA), *L-mono methyl arginine* (LNMA), dan defisiensi kofaktor *tetrahydrobiopterin* (BH4) dapat mengubah aktifitas eNOS pasca translasi. Apabila tidak tersedia baik arginin atau BH4, eNOS dapat menjadi *uncoupled* dan menghasilkan superoksida dan radikal hidrogen peroksida. Dalam keadaan defisiensi BH4, eNOS dapat meningkatkan stres oksidatif dan disfungsi endotel. Peroksintrit yang dihasilkan oleh reaksi antara NO dan superoksida, dapat mengoksidasi BH4 sehingga BH4 menurun.²⁷

Sintesis NO yang kompleks sangat rentan terhadap kejadian gangguan pembuluh darah, dan dapat dipengaruhi oleh banyak faktor, dan pada akhirnya menyebabkan disfungsi endotel. Bilamana efek vasodilatasi yang disebabkan oleh NO tidak sanggup mengatasi dampak vasokonstriksi yang dihasilkan oleh berbagai mediator, sehingga terjadi gangguan vasodilatasi yang tergantung pada endotelium, maka gambaran ini merupakan ciri dari disfungsi endotel.²⁷



Gambar 2.8. Disfungsi Endotel Pembuluh Darah

Sumber : telah diolah kembali dari Endemann²⁷

2.3.7. Pedoman Penatalaksanaan Nutrisi Pada Prahipertensi

Pedoman penatalaksanaan prahipertensi menurut JNC 7 menekankan bahwa modifikasi gaya hidup penting untuk mengontrol tekanan darah seperti terlihat pada tabel 2.5 di bawah.^{1,49}

Tabel 2.5. Pedoman Penatalaksanaan Nutrisi Pada Prahipertensi

Metoda	Rekomendasi	Penurunan Sistolik	Keterangan
Pola makan menurut DASH	4-5 buah/hari 4-5 sayur/hari 2-3 produk rendah lemak/hari	3,5 mm Hg	Menurun 62% (prevalensi)
Menjaga berat badan normal	Mencapai berat badan normal	1 mm Hg	Menurun 42% (insiden)
Membatasi asupan garam	≤ 2400 mg/hari	2 mm Hg	Menurun 38% (insiden)
Meningkatkan aktivitas fisik	Olahraga ≥ 30 menit/hari	3-4 mm Hg	-
Membatasi minum alkohol	≤ 1 oz/hari	3,5 mm Hg	-

Sumber : telah diolah kembali dari Chobanian dkk¹

2.4. Pengaruh Nitrat Anorganik Terhadap Kadar NO_x Serum dan Tekanan Darah Sistolik dan Diastolik

Lyamina dkk melakukan studi korelasi kadar NO_x serum dan tekanan darah pada 181 orang subyek laki-laki usia 18-45 tahun. Subyek dibagi menjadi empat kelompok berdasarkan tekanan darah yaitu normotensi (n=32 orang, rerata usia 31±2,5 tahun), prahipertensi (n=52 orang, rerata usia 32,57±2,24 tahun), hipertensi derajat satu (n=63 orang, rerata usia 32,7±2,8 tahun), dan hipertensi derajat dua (n=34 orang, rerata usia 33,2±0,97 tahun).²⁹

Kadar NO_x serum dan NO_x urin kelompok prahipertensi lebih tinggi dibanding normotensi (p<0,01), sebaliknya kadar NO_x serum dan NO_x urin kelompok hipertensi derajat satu dan dua lebih rendah dibanding normotensi (p<0,01). Terdapat korelasi positif bermakna antara kadar NO_x serum dan tekanan darah sistolik (r = 0,5 dan p<0,05) dan korelasi positif bermakna antara kadar NO_x urin dan tekanan darah diastolik (r = 0,46 dan p<0,05) pada kelompok normotensi dan prahipertensi. Sebaliknya terdapat korelasi negatif bermakna antara kadar NO_x serum dan tekanan darah sistolik (r = -0,6 pada hipertensi derajat satu dan r = -0,7 pada hipertensi derajat dua; p<0,05), dan korelasi negatif bermakna antara kadar NO_x serum dan tekanan darah diastolik (r = -0,5 pada hipertensi derajat satu dan r = -0,6 pada hipertensi derajat dua, p<0,05).

Para peneliti menyimpulkan, pada prahipertensi peningkatan kadar NO_x serum berkorelasi positif dengan peningkatan tekanan darah, sedangkan pada hipertensi penurunan kadar NO_x serum berkorelasi negatif dengan peningkatan tekanan darah. Pada prahipertensi, tingginya kadar NO_x serum akibat peningkatan sintesis NO sebagai respon terhadap disfungsi endotel, sedangkan pada hipertensi, substrat untuk sintesis NO mulai berkurang akibat bertambah beratnya disfungsi endotel.²⁷

Uji klinik tersamar ganda dengan plasebo oleh Plotnick dkk pada 38 orang sehat, dan aktif berolahraga (14 orang laki-laki dan 24 orang perempuan) dengan rerata usia 36,4±10,1 tahun, menilai pemberian suplementasi kapsul ekstrak bubuk sayur dan buah terhadap kadar NO_x serum, diameter arteri dan tekanan darah. Subyek dibagi menjadi tiga kelompok yaitu kelompok perlakuan I (n=14) mendapat suplementasi kapsul ekstrak bubuk sayur dan buah, kelompok

perlakuan II (n=12) mendapat suplementasi kapsul yang sama ditambah antioksidan, dan kelompok kontrol (kelompok III, n=10) mendapat plasebo; masing-masing diberikan dua kali per hari selama empat minggu. Pengukuran diameter arteri (berdasarkan *flow mediated vasodilatation*/FMV) dilakukan saat sebelum dan tiga jam setelah subjek diberikan diet 900 kalori dan 50 gram lemak.⁹

Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan bermakna peningkatan kadar NO_x serum kelompok perlakuan I dan II pada minggu keempat dibanding minggu awal (p<0,02), sebaliknya pada kontrol tidak berbeda bermakna. Tidak terdapat perbedaan bermakna perubahan diameter arteri dan tekanan darah sistolik dan diastolik pada kedua kelompok perlakuan dan kelompok kontrol (p>0,05). Juga tidak didapatkan korelasi bermakna antara peningkatan kadar NO_x serum dengan perubahan diameter arteri pada kedua kelompok. Para peneliti menyimpulkan, suplementasi ekstrak sayur dan buah setiap hari baik ditambah antioksidan ataupun tidak, dapat meningkatkan kadar NO_x serum. Selain itu diet tinggi kalori dan lemak secara parsial menurunkan efek vasodilator NO yang diduga terjadi akibat peningkatan stres oksidatif sel endotel oleh radikal bebas.²⁶

Penelitian *pre* dan *post test* oleh Ohta dkk pada 132 orang subyek (sehat dan prahipertensi) dengan rerata usia 52,2±9,8 tahun, menilai dampak pemberian kombinasi penyuluhan gizi sebanyak sekali seminggu (pembatasan konsumsi makanan tinggi kalori dan lemak, alkohol, dan garam) serta olahraga berjalan kaki dalam waktu satu jam tiga kali seminggu selama 12 minggu terhadap kadar NO_x serum dan tekanan darah.¹⁰

Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan bermakna peningkatan kadar NO_x serum (p<0,04), dan penurunan tekanan darah sistolik 3,8 mm Hg lebih rendah dan diastolik 2,3 mm Hg lebih rendah (p<0,001) pada minggu ke-12 dibanding minggu awal. Para peneliti menyimpulkan, olahraga aerobik dan diet yang sehat mampu meningkatkan kadar NO_x serum dan berperan menurunkan tekanan darah pada orang sehat dan prahipertensi.

Uji klinik tersamar ganda dengan plasebo oleh Larsen dkk¹² pada 17 orang sehat, aktif berolahraga dan tidak merokok (15 orang laki-laki dan 2 orang perempuan) dengan rerata usia 24 tahun, menilai pemberian suplementasi kapsul natrium nitrat (0,1 mmol/kg BB/hari) pada kelompok perlakuan dan kapsul

natrium klorida (0,1 mmol/kg BB/hari) pada kelompok kontrol selama tiga hari terhadap kadar NO_x serum dan tekanan darah. Selanjutnya dilakukan periode *wash out* selama 10 hari, kemudian secara *cross over* suplementasi ditukar pada kedua kelompok selama tiga hari.

Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan bermakna penurunan tekanan darah diastolik 3,7 mm Hg lebih rendah ($p < 0,02$) dan penurunan tekanan arteri rata-rata 3,2 mm Hg lebih rendah ($p < 0,03$) pada kelompok perlakuan dibanding kontrol. Terdapat perbedaan bermakna peningkatan kadar nitrat serum pada kelompok perlakuan dibandingkan kontrol (berturut-turut $178 \pm 51 \mu\text{M}$ dan $26 \pm 11 \mu\text{M}$; $p < 0,001$), dan peningkatan kadar nitrit serum (berturut-turut $219 \pm 105 \text{ nM}$ dan $138 \pm 38 \text{ nM}$; $p < 0,01$). Tidak terdapat perbedaan bermakna tekanan darah sistolik dan tekanan nadi pada kedua kelompok. Para peneliti menyimpulkan, suplementasi nitrat anorganik jangka pendek berperan menurunkan tekanan darah diastolik pada orang sehat.

Uji klinik dengan plasebo oleh Webb dkk pada 14 orang sehat (9 orang laki-laki dan 5 orang perempuan) dengan rerata usia 18-45 tahun, menilai pemberian nitrat anorganik ($34 \pm 0,1 \text{ mmol/L}$) dalam 500 mL jus bit pada kelompok perlakuan dan air putih pada kelompok kontrol dalam waktu 30 menit terhadap kadar NO_x serum dan tekanan darah selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan periode *wash out* selama tujuh hari, kemudian secara *cross over* perlakuan ditukar pada kedua kelompok. Tekanan darah diukur secara simultan tiap 15 menit selama tiga jam pertama, selanjutnya tiap satu jam selama tiga jam berikutnya dan terakhir 24 jam.¹¹

Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan bermakna peningkatan kadar nitrat serum setelah 1,5 jam ($p < 0,001$) dan peningkatan kadar nitrit serum ($p < 0,01$) setelah tiga jam pada kelompok perlakuan dibanding kontrol. Terdapat perbedaan bermakna penurunan tekanan darah sistolik $10,4 \pm 3,0 \text{ mm Hg}$ lebih rendah, penurunan tekanan darah diastolik $8,1 \pm 2,1 \text{ mm Hg}$ lebih rendah, dan penurunan tekanan arteri rata-rata $8,0 \pm 2,1 \text{ mm Hg}$ lebih rendah pada kelompok perlakuan dibandingkan kontrol ($p < 0,01$).

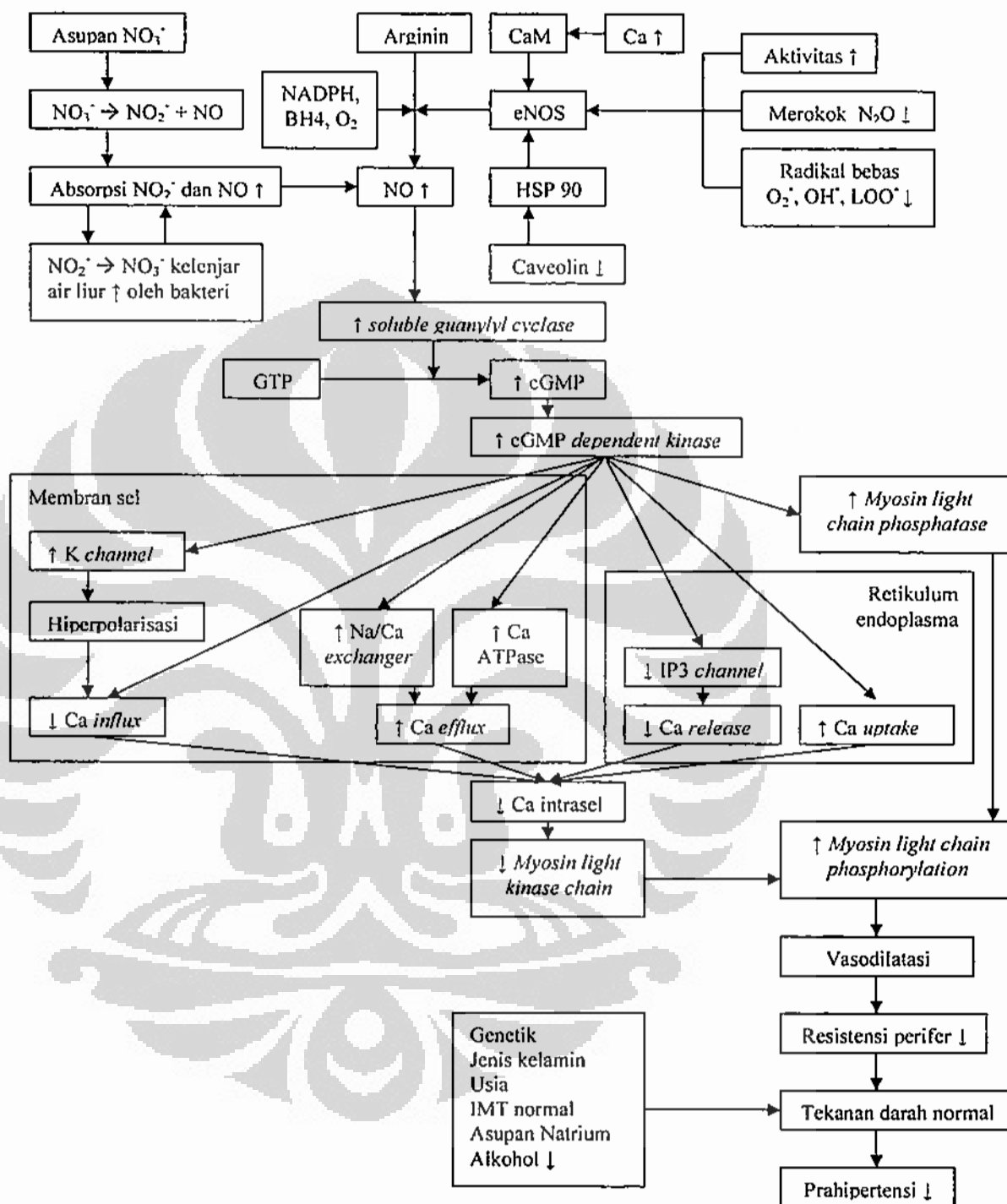
Terdapat korelasi negatif bermakna antara kadar nitrit serum dan tekanan darah sistolik ($r = -0,26$ dan $p = 0,008$), dan korelasi negatif tidak bermakna antara

kadar nitrat serum dan tekanan darah sistolik ($r = -0,17$ dan $p > 0,05$). Para peneliti menyimpulkan, diet nitrat anorganik dari sayuran jangka pendek berperan menurunkan tekanan darah diastolik pada orang normotensi yang diduga akibat peningkatan kadar nitrit dan nitrat serum. Ringkasan penelitian di atas dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 2.6. Ringkasan Beberapa Penelitian

Peneliti	Subyek	Intervensi	NO _x serum	Sistolik	Diastolik
Lyamina dkk (2003) Potong lintang	Subyek laki-laki usia 18-45 tahun, n = 84 orang	-	Kadar NO _x serum dan tekanan darah pada normotensi berkorelasi positif, sedangkan pada hipertensi berkorelasi negatif.		
Plotnick dkk (2003) Uji klinik selama 4 minggu	Subyek orang sehat rerata usia 36,4±10,1 tahun n = 38 orang	Suplementasi ekstrak sayur dan buah	↑	TS	TS
Ohta dkk (2005) Pre dan post test selama 12 minggu	Subyek orang sehat dan prahipertensi rerata usia 52,2±9,8 tahun n = 132 orang	Kombinasi penyuluhan gizi dan olahraga aerobik	↑	↓ Δ 3,8 mm Hg	↓ Δ 2,3 mm Hg
Larsen dkk (2006) Uji klinik selama 3 hari	Subyek orang sehat rerata usia 24 tahun n = 24 orang	Suplementasi natrium nitrat (0,1 mmol/kg BB/hari)	↑	TS	↓ Δ 3,7 mm Hg
Webb dkk (2008) Uji klinik selama 24 jam	Subyek orang sehat rerata usia 18-45 tahun n = 14 orang	Nitrat anorganik dalam jus bit (500 mL)	↑	↓ Δ 10,4 mm Hg	↓ Δ 8,1 mm Hg

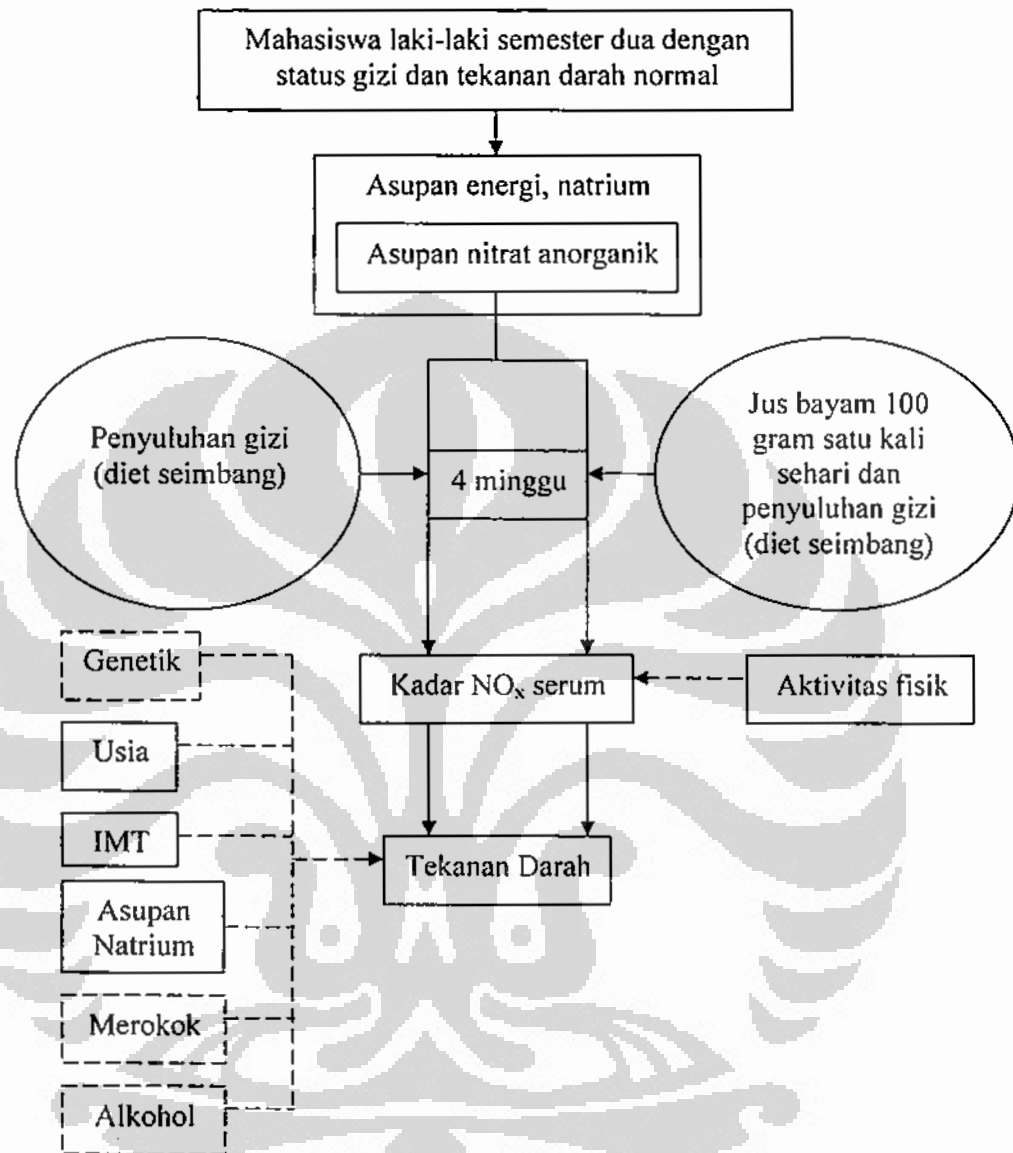
2.5. Kerangka Teori



Keterangan

NO : Nitric Oxide; eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase; NADPH : Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate; GTP : Guanosine Triphosphate; cGMP : cyclic Guanosine Triphosphate; CaM : Calmodulin; BH4 : Tetrahydrobiopterine; HSP : Heat Shock Protein; IP3 : Inositol 1,4,5-Tri Phosphate; NO_2^- : Nitrit; NO_3^- : Nitrat;

2.6. Kerangka Konsep



Keterangan :

- : hubungan yang diteliti
- - -→ : hubungan yang tidak diteliti
- : variabel yang diamati
- [- - -] : variabel yang tidak diamati

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian uji klinis paralel, membandingkan kelompok yang mendapat jus bayam disertai penyuluhan gizi (P) dengan kelompok yang hanya mendapat penyuluhan gizi saja (K).

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Pengumpulan data dilakukan di Fakultas Kedokteran Universitas Udayana, mulai bulan April sampai dengan Mei 2009. Penelitian berlangsung dari bulan Januari sampai dengan Juli 2009.

3.3. Bahan Penelitian

A. Populasi Target

Populasi target adalah seluruh mahasiswa laki-laki semester dua dengan status gizi dan tekanan darah normal.

B. Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau adalah seluruh mahasiswa laki-laki semester dua Fakultas Kedokteran Universitas Udayana, Denpasar dengan status gizi dan tekanan darah normal pada bulan Pebruari 2009.

C. Subyek Penelitian

Subyek penelitian adalah bagian dari populasi terjangkau yang memenuhi kriteria penelitian, dipilih secara randomisasi blok, dan secara tertulis menyatakan bersedia ikut serta dalam penelitian.

Kriteria Penerimaan

- a. Indeks massa tubuh normal untuk dewasa ($18,5-22,9 \text{ kg/m}^2$)³⁰ dan untuk usia < 18 tahun (persentil 5th-85th).³¹
- b. Tekanan darah normal (sistolik antara 100-119 mm Hg dan diastolik antara 60-79 mm Hg)¹
- c. Secara tertulis bersedia mengikuti penelitian dan memenuhi prosedur yang telah ditentukan serta menandatangani lembar persetujuan.

Kriteria Penolakan

- Subyek penelitian memiliki riwayat penyakit hipertensi yang diketahui dari anamnesis.
- Subyek penelitian adalah perokok.⁶
- Subyek penelitian memiliki kebiasaan mengkonsumsi alkohol.⁶

Kriteria Pengeluaran

- Subyek penelitian tidak teratur melakukan diet selama tiga hari berturut-turut.
- Subyek penelitian menolak melanjutkan penelitian.
- Selama periode penelitian subyek menderita sakit yang memerlukan perawatan di rumah sakit.
- Subyek penelitian mengkonsumsi jus bayam < 80% dari jumlah yang ditetapkan berdasarkan daftar hadir.

D. Besar Sampel

Besar sampel yang diperlukan untuk masing-masing kelompok dihitung berdasarkan rumus di bawah ini.³²

$$n_1 = n_2 = 2 \left[\frac{(Z_\alpha + Z_\beta) s}{d} \right]^2$$

Keterangan :

$n_1 = n_2$: besar sampel minimal untuk masing-masing kelompok.

Z_α : deviasi relatif yang menggambarkan derajat kepercayaan dalam pengambilan kesimpulan statistik sebesar 1,96 untuk $\alpha = 0,05$

Z_β : deviasi relatif yang menggambarkan tingkat kekuatan uji statistik dalam menetapkan batas kemaknaan, ditetapkan 0,842 untuk $\beta = 0,20$

s : simpang baku kedua kelompok

d : perbedaan klinis yang diharapkan (dapat ditetapkan oleh peneliti)

Besar sampel berdasarkan tekanan darah sistolik :

s : simpang baku penurunan tekanan darah sistolik yaitu 3,0 mm Hg.¹¹

d : perbedaan penurunan tekanan darah sistolik yaitu 5,5 mm Hg.³³

Maka besar sampel :

$$n_1 = n_2 = 2 \left[\frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta}) s}{d} \right]^2$$

$$n_1 = n_2 = 4,671$$

Besar sampel berdasarkan tekanan darah diastolik :

s : simpang baku penurunan tekanan darah diastolik yaitu 2,1 mm Hg.¹¹

d : perbedaan penurunan tekanan darah diastolik yaitu 3,0 mm Hg.³³

Maka besar sampel :

$$n_1 = n_2 = 2 \left[\frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta}) s}{d} \right]^2$$

$$n_1 = n_2 = 7,694$$

Besar sampel berdasarkan kadar NO_x serum :

s : simpang baku peningkatan kadar NO_x serum yaitu 26 μmol/L.¹¹

d : perbedaan peningkatan kadar NO_x serum yaitu 25 μmol/L.

Maka besar sampel :

$$n_1 = n_2 = 2 \left[\frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta}) s}{d} \right]^2$$

$$n_1 = n_2 = 16,983$$

Perhitungan besar sampel berdasarkan kadar NO_x serum lebih besar daripada tekanan darah sistolik dan diastolik maka perhitungan berdasarkan kadar NO_x serum yang dipakai sebagai dasar pengambilan sampel yaitu 17 orang untuk masing-masing kelompok.

E. Asupan Makanan Yang Diberikan

Kelompok Perlakuan (P) dan Kontrol (K)

Pada seluruh subyek penelitian diberikan penyuluhan gizi yang berisikan diet seimbang yang dihitung berdasarkan kebutuhan energi total dengan persamaan Harris-Benedict.³⁴ Komposisi makronutrien yang diberikan adalah karbohidrat 60%, lemak 25%, dan protein 15% dari kebutuhan kalori total dan mikronutrien

natrium ≤ 2400 mg/hari.³⁵ Penyuluhan gizi dilakukan sekali seminggu selama periode perlakuan.

Kelompok P

Selain mendapat penyuluhan gizi, kelompok P juga mendapat 100 gram daun bayam hijau dalam bentuk jus bayam satu kali per hari (kandungan nitrat anorganik 99 mg) dan lama perlakuan selama empat minggu berturut-turut (H1-H28). Pemberian jus bayam dilakukan secara tidak tersamar. Jumlah jus bayam yang diberikan selama perlakuan didasarkan pada *The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)*³⁶ menyatakan *Acceptable Daily Intake (ADI)* nitrat anorganik sekitar 2 mg/kg BB/hari (0,1-3,7 mg/kg BB/hari). Rerata berat badan mahasiswa 50 kg sehingga jumlah nitrat anorganik yang diberikan sebesar ± 100 mg/hari. Rerata bayam mengandung nitrat anorganik 990 mg/kg bayam sehingga diperlukan bayam 100 gram/hari/orang.¹⁴ Lamanya perlakuan ditetapkan selama empat minggu didasarkan pada penelitian Appel dkk yang memberikan diet sayuran dan buah berdasarkan DASH, dan didapatkan penurunan tekanan darah bermakna mulai minggu kedua³⁷, sedangkan Ohta dkk yang memberikan kombinasi konseling gizi dan olahraga berjalan kaki dalam waktu satu jam tiga kali seminggu, didapatkan penurunan tekanan darah bermakna setelah 12 minggu.¹⁰

3.4. Instrumen Pengumpulan Data

A. Lampiran

- Lampiran 1. : kaji etik penelitian
- Lampiran 2. : lembar informasi penelitian
- Lampiran 3. : lembar persetujuan
- Lampiran 4. : lembar data karakteristik subyek
- Lampiran 5. : lembar seleksi dan riwayat penyakit
- Lampiran 6. : lembar catatan asupan makanan
- Lampiran 7. : lembar asupan makanan
- Lampiran 8. : lembar keluhan subyek
- Lampiran 9. : lembar hasil pemeriksaan klinis
- Lampiran 10. : lembar indeks aktivitas fisik

- Lampiran 11. : prosedur pemeriksaan laboratorium
 Lampiran 12. : prosedur randomisasi blok
 Lampiran 13. : prosedur pembuatan jus bayam
 Lampiran 14. : contoh menu diet seimbang sehari

B. Peralatan

- *Dysposable syringe needle* 3 mL.
- *Vacutainer*.
- *Torniquet* dan kapas alkohol 70%.
- Sentrifugator dan tabung sentrifugator.
- Micropipet 10-200 μ L.
- Timbangan berat badan *Seca* dengan ketelitian 0,1 kg.
- Alat ukur tinggi badan *microtoise stature meter* 2 m dengan ketelitian 0,1 cm
- *Food models*.
- Alat timbangan bahan makanan merk Lion Star dengan ketelitian 10 gram.
- Sfigmomanometer air raksa dengan manset merk Riester.
- Stetoskop merk Littmann.
- *Elisa reader* merk Star.
- Blender 35.000 rpm merk Madato.

C. Spesimen

- Reagen kit pemeriksaan *Colorimetric Griess* merk Assaysdesign.
- Darah vena kubiti sebanyak 3 mL dalam *vacutainer*.

3.5. Cara Kerja

A. Cara Memperoleh Subyek Penelitian

Setelah mendapat persetujuan penelitian dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dan Fakultas Kedokteran Universitas Udayana serta ijin penelitian dari Fakultas Kedokteran Universitas Udayana maka dilakukan penyebaran informasi penelitian pada seluruh mahasiswa laki-laki semester dua.

Mahasiswa yang bersedia ikut serta dalam penelitian, diberikan lembar informasi dan dijelaskan mengenai tujuan penelitian, pemeriksaan yang dilakukan, serta manfaat penelitian. Mahasiswa yang menyatakan bersedia ikut serta diminta untuk mengisi dan menandatangani lembar persetujuan yang

dikembalikan sebagai bukti turut serta dalam penelitian, selanjutnya dilakukan seleksi. Randomisasi menjadi dua kelompok yaitu kelompok perlakuan (P) dan kontrol (K) dilakukan dengan cara randomisasi blok.

B. Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian dibagi dalam tiga periode yaitu periode sebelum perlakuan, periode perlakuan, dan periode setelah perlakuan

Periode Sebelum Perlakuan (H-6 sampai H0)

Pada H-6, dilakukan wawancara untuk memperoleh subyek penelitian yang memenuhi kriteria penelitian, dan data karakteristik subyek. Selanjutnya dilakukan pengukuran antropometri (meliputi BB dan TB), tekanan darah sistolik dan diastolik. Subyek yang memenuhi kriteria penelitian dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok perlakuan (P) dan kelompok kontrol (K) dengan randomisasi blok (lampiran 12).

Pada H0, subyek penelitian menjalani wawancara untuk mendapatkan data asupan energi, natrium, dan nitrat anorganik dengan metoda *food recall* 2 x 24 jam (H-1 dan H0). Selanjutnya dilakukan pengukuran tekanan darah sistolik dan diastolik, dan pemeriksaan kadar nitrit, nitrat, dan NO_x serum, setelah malamnya berpuasa selama 10-12 jam, karena asupan makanan dapat mempengaruhi kadar NO_x serum. Hasil pemeriksaan dicatat dalam lampiran 9. Kelompok P diberikan penjelasan tentang cara minum jus bayam dan pada seluruh subyek diberikan penyuluhan gizi mengenai diet seimbang.

Periode Perlakuan (H1 sampai H28)

Kelompok P dan K

Seluruh subyek menerima lembar catatan asupan makanan untuk mencatat asupan makanan sebagai *food record* pada minggu 0, 2, dan 4, selanjutnya dibawa setiap hari senin untuk dievaluasi dan dianalisis. Analisis data asupan energi, dan natrium menggunakan daftar analisis bahan makanan³⁸ dan program *nutrisurvey* 2005. Data asupan nitrat anorganik dianalisis secara manual menggunakan daftar bahan makanan sumber nitrat anorganik³⁹.

Pengukuran tekanan darah sistolik dan diastolik dilakukan seminggu sekali, selanjutnya hasil dicatat dalam lampiran 9.

Pada pelaksanaan penyuluhan gizi, subyek penelitian diberikan informasi mengenai diet seimbang berdasarkan kebutuhan energi total dengan bahasa sederhana dan contoh menu makanan sehari-hari. Apabila ada keterangan yang masih belum jelas, subyek diberikan kesempatan untuk mengajukan pertanyaan mengenai diet seimbang selama penyuluhan tersebut. Pada akhir penyuluhan, subyek penelitian dimotivasi untuk menjalankan diet seimbang selama masa perlakuan.

Kelompok P

Setiap pagi hari selama periode perlakuan, subyek penelitian mengonsumsi jus bayam 100 gram satu kali per hari yang telah disediakan di hadapan peneliti, dan juga ditanyakan mengenai keluhan atau gangguan yang dirasakan selama minum jus bayam, baik keluhan umum maupun gangguan pencernaan. Keluhan tersebut dicatat dan ditanggapi agar subyek tidak mengalami gangguan kesehatan.

Periode Setelah Perlakuan (H29)

Pada H29, dilakukan pengukuran tekanan darah sistolik dan diastolik, dilanjutkan dengan pengambilan darah untuk pemeriksaan kadar nitrit, nitrat, dan NO_x serum setelah malamnya berpuasa selama 10-12 jam. Hasil pemeriksaan dicatat dalam lampiran 9.

C. Prosedur Pengumpulan Data

Wawancara

Pada saat seleksi, wawancara dilakukan dengan menggunakan kuesioner untuk mendapatkan data karakteristik subyek dan data asupan makanan dengan metoda *food recall* 2 x 24 jam.

Pengukuran Antropometri

Pengukuran antropometri dilakukan pada pra perlakuan (H0) meliputi tinggi badan (TB), dan berat badan (BB). Pengukuran antropometri dilakukan seorang tenaga yang terampil dan terlatih. Setiap pengukuran dilakukan sebanyak dua kali dan data yang diambil adalah rata-rata dari hasil pengukuran tersebut. Hasil pengukuran digunakan untuk menentukan indeks massa tubuh (IMT).⁴⁰

Pengukuran TB

Menggunakan *microtoise stature* 2 m dengan ketelitian 0,1 cm yang digantungkan pada dinding setinggi dua meter dari lantai dengan satuan sentimeter tepat pada posisi nol. Pada waktu pengukuran, subyek tanpa alas kaki berdiri pada permukaan datar dan tumit rapat, kepala tegak menempel pada dinding sehingga pandangan tegak lurus dengan sumbu tubuh (*Frankfurt plane*). Bahu relaks, kedua lengan tergantung bebas di sisi tubuh, punggung, bokong, dan tumit menempel pada dinding. Kedua kaki lurus dan kedua lutut rapat. Papan *microtoise* diturunkan sampai menyentuh bagian paling atas kepala dan rambut tertekan. Pengukuran tinggi badan dilakukan saat subyek inspirasi maksimum.⁴⁰ Hasil pengukuran dicatat dalam lampiran 9.

Pengukuran BB

Menggunakan alat timbangan berat badan *Seca* dengan ketelitian 0,1 kg yang ditempatkan di tempat yang keras, permukaan yang rata dan bandul timbangan menunjukkan angka nol. Alat timbangan terlebih dahulu ditera. Subyek ditimbang dalam keadaan kandung kencing kosong dan sebelum makan. Subyek berdiri di tengah permukaan timbangan dan melihat lurus ke depan, berdiri tegak tanpa dibantu, tenang, memakai baju seringan mungkin dan tanpa alas kaki atau kaus kaki.⁴⁰ Hasil pengukuran dicatat dalam lampiran 9.

Pengukuran Tekanan Darah

Pengukuran tekanan darah dilakukan oleh seorang tenaga yang terampil dan sudah dilatih sebelumnya. Alat-alat yang digunakan yaitu stetoskop merk Littmann dan sfigmomanometer air raksa merk Riester yang diletakkan di atas permukaan datar. Subyek penelitian istirahat minimal 30 menit, selama itu subyek tidak makan, minum, dan menghindari latihan fisik sebelum pemeriksaan. Subyek penelitian dalam posisi duduk tenang di kursi, dengan kaki menapak pada lantai, dan lengan kanan diletakkan di meja dalam keadaan relaks berada pada posisi setinggi jantung. Manset dipasang melingkar pada lengan kanan sesuai dengan ukuran lengan subyek, dengan bagian bawah manset 2-3 cm di atas fossa kubiti dan bagian selang karet yang menekan tepat di atas arteri brakialis. Denyut arteri brakialis pada fossa kubiti dan arteri radialis pada pergelangan tangan kanan diraba dengan jari telunjuk dan jari tengah serta pastikan pandangan pemeriksa

harus sejajar dengan permukaan air raksa. Katup pengontrol manset ditutup kemudian manset dipompa sampai denyut arteri radialis tak teraba lagi. Stetoskop dipakai tepat ke dalam telinga pemeriksa, dan kepala stetoskop diletakkan di atas fossa kubiti. Manset kembali dipompa sampai 20-30 mm Hg, kemudian katup pengontrol dilepaskan secara pelan-pelan sehingga air raksa turun dengan kecepatan 2-3 mm Hg per detik antara dua bunyi pembuluh berurutan. Pastikan tinggi air raksa saat terdengar detakan pertama (Korotkoff I), ini adalah tekanan darah sistolik. Pastikan tinggi air raksa saat terjadi perubahan suara yang tiba-tiba melemah (Korotkoff V), ini adalah tekanan darah diastolik. Pengukuran diulang sebanyak tiga kali dengan selang waktu lima menit untuk mendapatkan nilai rata-rata dari ketiga pengukuran. Bila tiga kali pengukuran terdapat beda > 5 mm Hg, dilakukan pengukuran sekali lagi dan dihitung rata-rata dari pengukuran.¹ Hasil pengukuran dicatat dalam lampiran 9.

Pemeriksaan Laboratorium

Pemeriksaan kadar nitrit, nitrat, dan NO_x serum dilakukan di Laboratorium Biologi Molekular Fakultas Kedokteran Universitas Udayana. Setelah subyek penelitian berpuasa 10-12 jam semalam, pada pagi hari dilakukan pengambilan darah vena kubiti sebanyak 3 mL. Selanjutnya darah ditampung dalam *vacutainer*, disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit, dan didapatkan sebanyak 1 mL serum selanjutnya dimasukkan dalam tabung untuk segera diperiksa. Prosedur pemeriksaan laboratorium menggunakan kit pemeriksaan *Colorimetric Griess* dan pembacaan *absorbance* 520-560 nm menggunakan *Elisa reader*.⁴¹ Hasil pemeriksaan dicatat dalam lampiran 9.

Penilaian Asupan Zat Gizi

Penilaian asupan zat gizi dilakukan oleh seorang tenaga yang sudah dilatih sebelumnya. Data asupan makanan diperoleh dengan metode *food recall* 2 x 24 jam dan *food record*, melalui wawancara dan pencatatan.⁴⁰ Data asupan energi, dan natrium dalam URT dikonversikan ke dalam ukuran gram menggunakan daftar analisis bahan makanan³⁸ dan dianalisis dengan program *nutrisurvey* 2005

dan data asupan nitrat anorganik dianalisis secara manual menggunakan daftar bahan makanan sumber nitrat anorganik.³⁹

Metode *Food Recall* 2 x 24 Jam

Subyek diminta mengingat makanan yang telah dikonsumsi selama 2 x 24 jam (H-1 dan H0) berturut-turut sebelum perlakuan dengan menanyakan jenis dan perkiraan jumlah makanan yang dikonsumsi dengan menggunakan ukuran rumah tangga (URT) dan bantuan contoh porsi makanan (*food models*) sebagai panduan untuk membantu ingatan subyek. Data semua makanan yang dikonsumsi termasuk cara memasaknya dicatat dengan teliti.⁴⁰

Metode *Food Record*

Subyek diminta mencatat makanan yang dikonsumsi selama 24 jam (pada minggu 0, 2, dan 4) dalam lembar catatan asupan makanan meliputi jenis dan jumlah makanan (langsung dicatat saat makan). Jumlah makanan diukur menggunakan ukuran standar seperti sendok, gelas, dan lain-lain.⁴⁰

3.6. Identifikasi Variabel

A. Variabel Bebas

- Asupan nitrat anorganik
- Asupan natrium
- Kadar NO_x serum

B. Variabel Tergantung

- Kadar NO_x serum
- Tekanan darah sistolik
- Tekanan darah diastolik

3.7. Pengolahan, Analisis, Interpretasi, dan Penyajian Data

A. Pengolahan Data

Data yang diperoleh dari seluruh pemeriksaan (wawancara, antropometri, pengukuran tekanan darah, dan pemeriksaan kadar NO_x serum) dikumpulkan, kemudian dilakukan pengolahan data meliputi *editing*, *coding*, *entry* dan *cleaning* data menggunakan mesin hitung dan komputer.

B. Analisis dan Interpretasi Data

Data dianalisis dengan menggunakan program *Statistical Package for Social Science* (SPSS versi 11.5). Analisis data asupan energi dan natrium menggunakan program *nutrisurvey* 2005 dan analisis data asupan nitrat anorganik menggunakan daftar bahan makanan sumber nitrat anorganik.³⁹ Uji statistik yang digunakan sebagai berikut :

- Data mengenai karakteristik usia dan aktivitas fisik disajikan dalam bentuk deskriptif.
- Untuk mengetahui data mempunyai distribusi normal atau tidak normal secara analitik digunakan uji Kolmogorov-Smirnov. Bila didapat nilai $p > 0,05$ maka data berdistribusi normal dan sebaliknya.
- Bila data berdistribusi normal digunakan nilai rerata dan simpang baku; sedangkan bila data berdistribusi tidak normal digunakan nilai median dan minimum-maksimum.
- Untuk menganalisis data perbedaan hasil perlakuan kedua kelompok dilakukan sebagai berikut; bila kedua data berdistribusi normal digunakan uji t-tes tidak berpasangan; atau bila salah satu atau kedua data berdistribusi tidak normal digunakan uji Mann-Whitney.
- Batas kemaknaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebesar 5% dengan ketentuan :

Bermakna : bila $p < 0,05$

Tidak bermakna : bila $p \geq 0,05$

C. Penyajian Data

Data disajikan dalam bentuk tekstular, tabular, dan grafik, serta disajikan dalam bentuk tesis selanjutnya diuji di hadapan penguji.

3.8. Batasan Operasional

1. Subyek Penelitian

Subyek penelitian adalah mahasiswa laki-laki semester dua Fakultas Kedokteran Universitas Udayana, Denpasar dengan status gizi dan tekanan darah normal serta memenuhi kriteria penelitian.

2. Usia

Usia ditentukan berdasarkan hari ulang tahun terakhir, dan dikelompokkan menjadi usia 15-18 tahun dan 19-21 tahun.

3. Status Gizi

Kriteria status gizi ditentukan dengan perhitungan indeks massa tubuh (IMT). Klasifikasi status gizi untuk orang dewasa berdasarkan kriteria Asia-Pasifik sedangkan pada subyek dengan usia < 18 tahun ditentukan berdasarkan kriteria CDC-WHO.

Tabel 3.1. Klasifikasi Status Gizi Dewasa Asia-Pasifik

Klasifikasi	IMT (kg/m^2)
Berat badan kurang	< 18,5
Berat badan normal	18,5-22,9
Berat badan lebih	≥ 23
Berisiko	23-24,9
Obes I	25-29,9
Obes II	≥ 30

Sumber : WHO-WRPO³⁰

Klasifikasi status gizi usia < 18 tahun digunakan persentil indeks massa tubuh.

Tabel 3.2. Klasifikasi Status Gizi Usia < 18 Tahun

Klasifikasi	Persentil	IMT (kg/m^2)
Berat badan kurang	< 5 th	< 18,2
Berat badan normal	5 th -85 th	18,2-25,5
Berat badan lebih	$\geq 85^{\text{th}}$ - <95 th	25,6-28,9
Obes	$\geq 95^{\text{th}}$	≥ 29

Sumber : Kuczmarski dkk³¹

4. Asupan Energi, Natrium, dan Nitrat Anorganik

Asupan energi, natrium, dan nitrat anorganik diperoleh dengan metoda *food recall* 2 x 24 jam (H-1 dan H0) dan metoda *food record* (minggu 0, 2, dan 4) menggunakan lembar catatan asupan makanan. Data asupan energi, dan natrium dianalisis dengan menggunakan program *nutrisurvey* 2005 dan data asupan nitrat anorganik dianalisis secara manual menggunakan daftar bahan makanan sumber nitrat anorganik.³⁹

A. Asupan Energi

Asupan energi adalah besarnya jumlah kalori yang dikonsumsi per orang per hari dibandingkan dengan kebutuhan energi total (KET) per individu. KET adalah jumlah kebutuhan energi basal (KEB) dan aktivitas fisik (AF).

KEB dihitung dengan menggunakan persamaan Harris-Benedict.³⁴

$$\text{KEB laki-laki (kkal/hari)} = 66 + (13,7 \times \text{BB}) + (5 \times \text{TB}) - (6,8 \times \text{U})$$

Keterangan :

BB = berat badan (kg), TB = tinggi badan (cm), U = usia (tahun)

Aktivitas fisik sehari-hari mahasiswa ditentukan berdasarkan indeks aktivitas fisik (IAF), kemudian ditentukan penambahan kalori dari KEB.⁴²

Penilaian asupan energi dapat dilihat pada tabel 3.3.

Tabel 3.3. Interpretasi Persentase Asupan Energi

Asupan	Hasil penilaian	Interpretasi
Energi (kkal/hari)	<80% dari KET	Kurang
	80-120% dari KET	Cukup
	>120% dari KET	Lebih

Sumber : WNPG⁴³

B. Asupan Natrium

Asupan natrium adalah banyaknya natrium yang dikonsumsi dalam makanan per hari. Untuk menilai asupan natrium, rerata asupan natrium dibandingkan dengan anjuran asupan natrium menurut angka kecukupan gizi 2004 (AKG) yaitu 1500-2400 mg/hari (tabel 3.4).

Tabel 3.4. Interpretasi Asupan Natrium

Asupan	Hasil penilaian	Interpretasi
Natrium (mg/hari)	<1500	Kurang
	1500-2400	Cukup
	>2400	Lebih

Sumber : WNPG⁴³

C. Asupan Nitrat Anorganik

Asupan nitrat anorganik adalah banyaknya nitrat anorganik yang dikonsumsi dalam makanan per hari. Untuk menilai asupan nitrat anorganik, rerata asupan nitrat anorganik dibandingkan dengan batasan asupan nitrat anorganik menurut *acceptable daily intake* (ADI) yaitu 0,1-3,7 mg/kg BB/hari (tabel 3.5).

Tabel 3.5. Interpretasi Asupan Nitrat Anorganik

Asupan	Hasil penilaian	Interpretasi
Nitrat anorganik (mg/kg BB/hari)	<0,1	Kurang
	0,1-3,7	Cukup
	>3,7	Lebih

Sumber : Alexander dkk³⁹

5. Aktivitas Fisik

Aktivitas fisik adalah segala bentuk kegiatan subyek yang biasa dilakukan sehari-hari. Penilaian indeks aktivitas fisik dilakukan dengan wawancara menggunakan kuesioner indeks aktivitas fisik, dikelompokkan berdasarkan nilai frekuensi (F), durasi (D) dan intensitas (I).

Indeks aktivitas fisik dihitung berdasarkan persamaan berikut⁴⁵ :

$$\text{Indeks Aktivitas Fisik (IAF)} = I \times D \times F$$

Tabel 3.6. Interpretasi Indeks Aktivitas Fisik

Nilai Total	Indeks Aktivitas Fisik
1 - 20	E = Rendah
21 - 40	D = Cukup
41 - 60	C = Rata-rata
61 - 80	B = Baik
81 - 100	A = Sangat baik

Sumber : Montoye dkk⁴⁵

6. Penyuluhan Gizi

Penyuluhan gizi adalah kegiatan memberikan informasi pada subyek penelitian agar mengikuti asupan diet seimbang, yaitu diet dengan komposisi makronutrien karbohidrat 60%, lemak 25%, dan protein 15% dari kebutuhan kalori total serta mikronutrien natrium ≤ 2400 mg/hari.³⁵

7. Jus Bayam

Jus bayam adalah jus yang diolah dari 100 gram daun bayam organik yang berwarna hijau (mengandung 99 mg nitrat anorganik) yang didapatkan dari *Bali Organic Assosiation*.

8. Kadar NO_x Serum

Kadar NO_x serum adalah total kadar nitrat dan nitrit serum yang diukur dengan menggunakan kit pemeriksaan metoda *Colorimetric Griess* merk Assaysdesign dan pembacaan hasil dengan menggunakan *Elisa reader*.⁴¹

Tabel 3.7. Interpretasi Kadar NO_x Serum

Kadar	Nilai normal	Interpretasi
NO _x serum	< 30	Rendah
($\mu\text{mol/L}$)	≥ 30	Normal

Sumber : telah diolah kembali dari Roosevelt⁴⁶

9. Tekanan Darah

Tekanan darah adalah nilai rerata tiga kali hasil pengukuran tekanan darah sistolik dan diastolik subyek menggunakan stetoskop dan sfigmomanometer air raksa. Klasifikasi tekanan darah mengacu pada klasifikasi menurut JNC 7.

Tabel 3.8. Klasifikasi Tekanan Darah

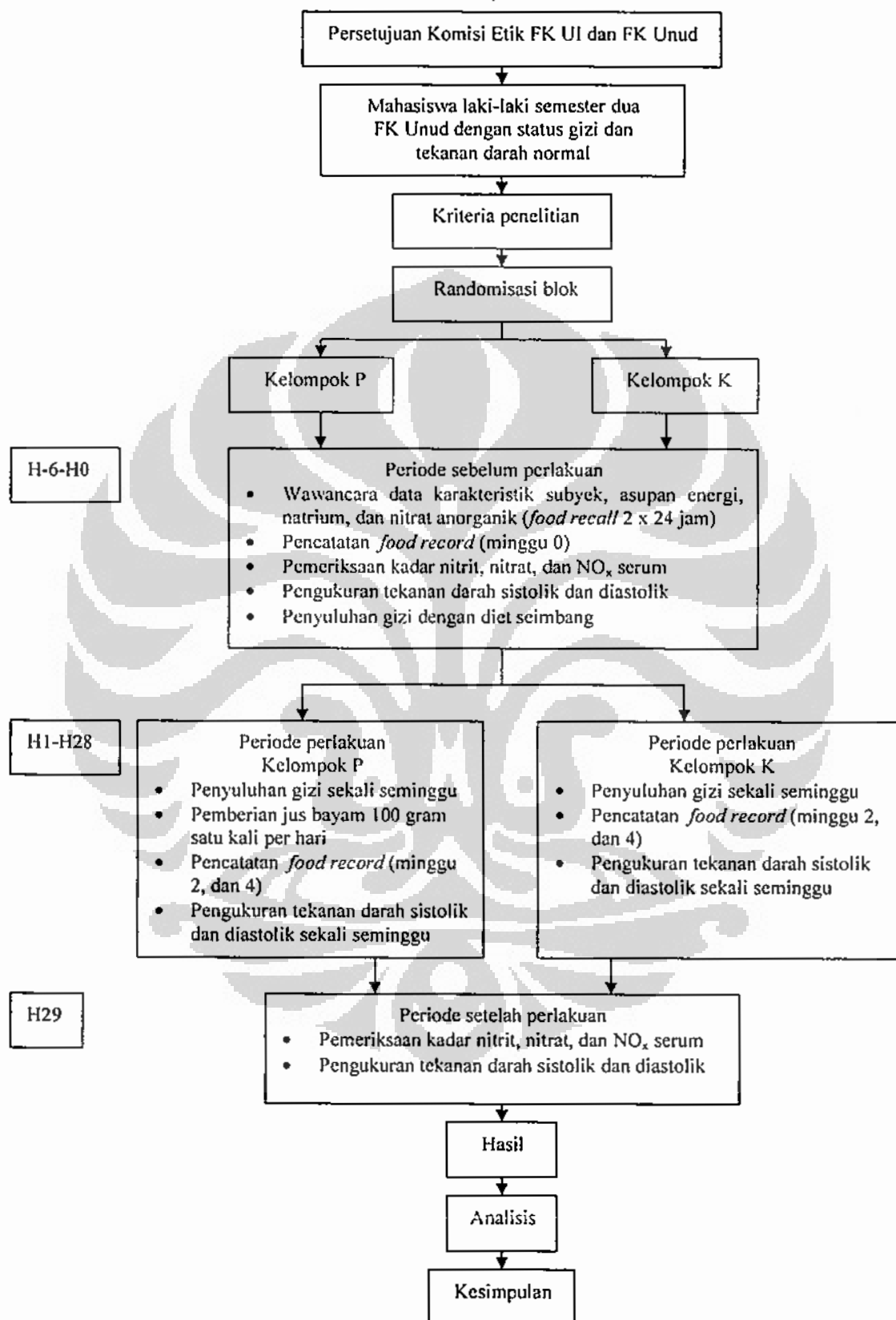
Klasifikasi	Sistolik (mm Hg)		Diastolik (mm Hg)
Normal	< 120	dan	< 80
Prahipertensi	120-139	atau	80-89
Hipertensi Derajat 1	140-159	atau	90-99
Hipertensi Derajat 2	≥ 160	atau	≥ 100

Sumber : telah diolah kembali dari Chobanian dkk¹

3.9. Organisasi Penelitian

Peneliti utama : dr. I Wayan Gede Sutadarma
 Pembimbing I : dr. Savitri Sayogo, SpGK
 Pembimbing II : Dr. dr. Imam Effendi, SpPD-KGH

3.10. Kerangka Operasional



Tabel 3.9. Variabel Indikator Matriks

Variabel	Indikator	Skala	Metode	Referensi
Karakteristik	Usia	Rasio	Wawancara	
	Aktivitas fisik	Rasio		
Status Gizi	IMT = BB/TB^2 (kg/m^2) Persentil	Rasio	Antropometri	WHO-WRPO, 2000 Kuczmarski et al, 2000 Gibson, 2005
Asupan zat gizi	Energi Natrium Nitrat anorganik	Rasio	<i>Food record</i> dan <i>food recall</i> 2 x 24 jam	
NO _x serum	Kadar nitrat serum Kadar nitrit serum Kadar NO _x serum	Rasio	Pemeriksaan <i>Colorimetric</i> <i>Griess</i>	Tarpey et al, 2001
Tekanan darah	Tekanan darah sistolik Tekanan darah diastolik	Rasio	Pengukuran tekanan darah	Chobanian et al, 2003

BAB 4 HASIL PENELITIAN

4.1. Seleksi Subyek Penelitian

Seleksi subyek penelitian dilakukan pada minggu pertama April 2009, diawali dengan memberikan informasi mengenai penelitian yang dijalankan kepada seluruh mahasiswa laki-laki semester dua Fakultas Kedokteran Universitas Udayana yang berjumlah 110 orang. Sebanyak 43 orang menyatakan kesediaan untuk ikut serta dalam penelitian, dan setelah menandatangani lembar persetujuan penelitian, selanjutnya dilakukan penapisan dengan menilai IMT, tekanan darah sistolik dan diastolik.

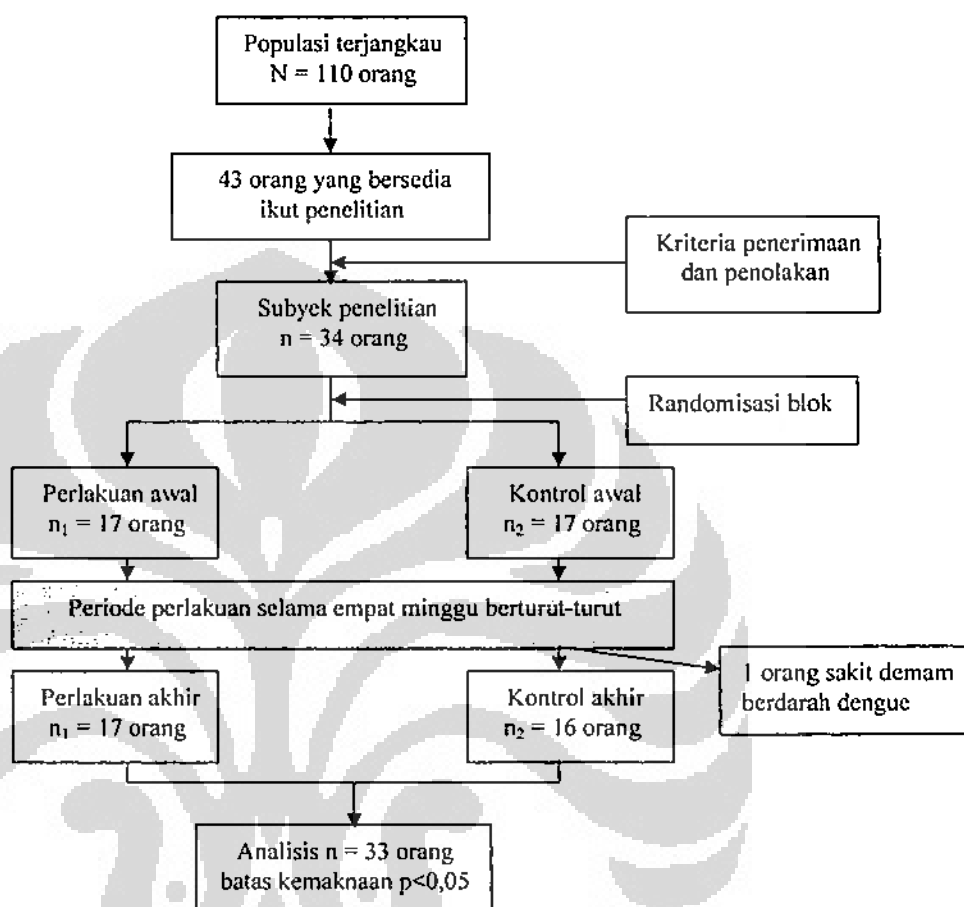
Berdasarkan kriteria penelitian, didapatkan sejumlah 34 orang mahasiswa yang memenuhi kriteria dan sesuai dengan besar sampel minimal yang diperlukan; sembilan orang yang tidak memenuhi kriteria yaitu enam orang (13,95%) memiliki IMT lebih dari normal, dua orang (4,65%) memiliki IMT kurang dari normal, dan satu orang (2,33%) memiliki IMT dan tekanan darah lebih tinggi dari normal.

Penentuan alokasi subyek penelitian dilakukan dengan cara randomisasi blok, didapatkan 17 orang subyek masuk ke dalam kelompok perlakuan dan 17 orang subyek sebagai kelompok kontrol. Selanjutnya, dilakukan penilaian asupan energi, natrium, dan nitrat anorganik serta dilakukan pemeriksaan kadar nitrat, nitrit, dan NO_x serum sebelum perlakuan.

Periode perlakuan dimulai pada awal minggu kedua April 2009, selama empat minggu berturut-turut. Tingkat kehadiran berdasarkan daftar absensi selama empat minggu berturut-turut pada kelompok perlakuan mencapai 97,8%, sedangkan tingkat kehadiran kelompok kontrol mencapai 85%, sehingga keseluruhan subyek penelitian sudah memenuhi syarat minimal 80%.

Penyuluhan gizi mengenai diet seimbang dilakukan sebanyak tiga kali dari empat kali yang direncanakan, hal tersebut disebabkan subyek penelitian harus mempersiapkan diri untuk mengikuti ujian. Pada akhir periode perlakuan, satu orang dari kelompok kontrol tidak dapat melanjutkan penelitian karena menderita sakit demam berdarah dengue dan dirawat di rumah sakit.

Pemeriksaan kadar nitrat, nitrit, dan NO_x serum serta pengukuran tekanan darah setelah perlakuan dilakukan pada 17 orang kelompok perlakuan dan 16 orang kelompok kontrol.



Gambar 4.1. Alur Penelitian Yang Dilakukan

4.2. Karakteristik Subyek Penelitian

4.2.1. Karakteristik Usia dan Aktivitas Fisik

Median dan minimum-maksimum usia subyek penelitian adalah 18 (17-19) tahun, dengan rincian sebagai berikut 2 orang (5,88%) usia 17 tahun, 15 orang (44,12%) usia 18 tahun dan sisanya 17 orang (50%) usia 19 tahun.

Sebanyak 14 orang subyek (41,18%) memiliki indeks aktivitas fisik cukup, dan 10 orang diantaranya adalah kelompok kontrol. Sebanyak 20 orang subyek (58,82%) memiliki tingkat indeks aktivitas fisik rendah, dan 13 orang diantaranya adalah kelompok perlakuan.

4.2.2. Karakteristik Data Dasar

Tabel 4.1 memperlihatkan sebaran subyek penelitian berdasarkan usia, aktivitas fisik, indeks massa tubuh, asupan energi, natrium dan nitrat anorganik, kadar nitrit, nitrat, dan NO_x serum, tekanan darah sistolik dan diastolik kedua kelompok.

Tabel 4.1. Sebaran Subyek Penelitian Berdasarkan Usia, Aktivitas Fisik, Indeks Massa Tubuh, Asupan Energi, Natrium dan Nitrat Anorganik, Kadar Nitrit, Nitrat, dan NO_x Serum, serta Tekanan Darah Sebelum Perlakuan

Variabel	Perlakuan	Kontrol	p
Usia (tahun)	18 (17-19) [#]	19 (17-19) [#]	0,352 ^m
Aktivitas fisik	6 (1-32) [#]	24 (1-32) [#]	0,088 ^m
IMT (kg/m ²)	21,31 (18,62-22,95) [#]	20,59 (18,53-22,99) [#]	0,380 ^m
Energi (kkal)	1505,65±341,79	1522,61±248,65	0,870 ^t
Natrium (mg)	1212,67±332,20	1180,81±334,27	0,782 ^t
Nitrat anorganik (mg)	37,16±26,22	31,40±23,85	0,508 ^t
Nitrit serum (μmol/L)	100,37±37,13	84,99±27,54	0,180 ^t
Nitrat serum (μmol/L)	39,84 (23,10-100,00) [#]	42,18 (33,19-88,18) [#]	0,705 ^m
NO _x serum (μmol/L)	149,65 (59,50-264,09) [#]	115,26 (84,84-212,19) [#]	0,153 ^m
Sistolik (mm Hg)	108,94±3,37	106,29±5,42	0,096 ^t
Diastolik (mm Hg)	72,04±2,54	70,71±4,85	0,322 ^t

* = tidak bermakna; t = t-tes tidak berpasangan; m = mann whitney;

= median (minimum-maksimum)

Tidak didapatkan perbedaan bermakna pada variabel-variabel yang diteliti pada kedua kelompok pada awal penelitian. Hal ini menggambarkan kedua kelompok pada awal penelitian dalam keadaan homogen.

4.3. Asupan Energi, Natrium, dan Nitrat Anorganik

4.3.1. Penilaian Asupan Berdasarkan *Food Record* dan *Food Recall 2 x 24 Jam* Sebelum Perlakuan.

Tabel 4.2 memperlihatkan asupan energi, natrium, dan nitrat anorganik kedua kelompok berdasarkan *food record* dan *food recall 2 x 24 jam* sebelum perlakuan.

Tabel 4.2. Asupan Energi, Natrium, dan Nitrat Anorganik Berdasarkan *Food Record* dan *Food Recall 2 x 24 Jam* Sebelum Perlakuan

Variabel	<i>Food Record</i>		<i>Food Recall 2 x 24 jam</i>	
	Perlakuan	Kontrol	Perlakuan	Kontrol
Energi (kkal)	1505,65±341,79	1522,61±248,65	1374,11±277,49	1400,34±155,81
Natrium (mg)	1212,67±332,20	1180,81±334,27	994,00 (444,80-2201,65) [#]	813,70 (383,00-1453,70) [#]
Nitrat anorganik (mg)	37,16±26,22	31,40±23,85	29,85 (16,55-125,79) [#]	24,83 (14,08-63,82) [#]

= median (minimum-maksimum)

Penilaian asupan zat gizi dengan kedua metoda tersebut memperlihatkan asupan energi dan natrium berdasarkan *food record* lebih tinggi dibandingkan asupan berdasarkan *food recall* 2 x 24 jam, sedangkan asupan nitrat anorganik tidak berbeda. Selanjutnya digunakan penilaian asupan energi, natrium dan nitrat anorganik dengan metoda *food record* untuk meminimalkan bias.⁴⁰

4.3.2. Asupan Energi

Tabel 4.3 memperlihatkan nilai asupan energi dan persentase asupan energi dibandingkan dengan kebutuhan energi total pada kedua kelompok.

Tabel 4.3. Asupan Energi dan Persentase Terhadap Kebutuhan Energi Total

Variabel	Perlakuan	Kontrol	p
Energi (kkal)			
Minggu 0	1505,65±341,79	1522,61±248,65	0,870 ^t
Minggu 2	1606,01±251,64	1582,71±195,59	0,765 ^t
Minggu 4	1580,00±186,29	1641,48±142,14 ^S	0,297 ^t
Persentase asupan (%) ^a	84,93±10,60	88,19±5,47	0,268 ^t

§ = 16 orang subyek; * = tidak bermakna; t = t-tes tidak berpasangan;

a = persentase asupan energi dibandingkan dengan kebutuhan energi total

Asupan energi kedua kelompok pada minggu 0, 2 dan 4 tidak memperlihatkan perbedaan bermakna. Persentase asupan energi dibandingkan dengan kebutuhan energi total kedua kelompok memperlihatkan tergolong kategori cukup (80-120% terhadap kebutuhan energi total).

4.3.3. Asupan Natrium

Tabel 4.4 memperlihatkan nilai asupan natrium pada kedua kelompok.

Tabel 4.4. Asupan Natrium

Variabel	Perlakuan	Kontrol	p
Natrium (mg)			
Minggu 0	1212,67±332,20	1180,81±334,27	0,782 ^t
Minggu 2	1080,10 (763,80-2048,60) [#]	1081,60 (616,50-1737,30) [#]	0,593 ^{*m}
Minggu 4	1083,00 (834,84-1797,50) [#]	923,95 (676,20-2494,05) ^{#S}	0,150 ^{*m}

§ = 16 orang subyek; * = tidak bermakna; t = t-tes tidak berpasangan; m = mann whitney;

= median (minimum-maksimum)

Asupan natrium tidak memperlihatkan perbedaan bermakna pada kedua kelompok, baik pada minggu 0, 2, dan 4. Asupan natrium pada kedua kelompok lebih rendah dibandingkan dengan AKG Indonesia 2004 (1500-2400 mg/hari).⁴¹

4.3.4. Asupan Nitrat Anorganik

Selama empat minggu berturut-turut, kelompok perlakuan mendapat jus bayam 100 gram per hari. Sebanyak 14 orang (82,32%) kelompok perlakuan mengeluh mual pada minggu pertama dan satu orang (5,88%) mengalami muntah pada hari ke-20, sedangkan dua orang lainnya (11,76%) tidak merasakan keluhan apapun selama perlakuan, namun demikian subyek dengan keluhan mual dan mengalami muntah tetap melanjutkan penelitian sampai selesai. Tabel 4.5 memperlihatkan nilai asupan nitrat anorganik kedua kelompok.

Tabel 4.5. Asupan Nitrat Anorganik

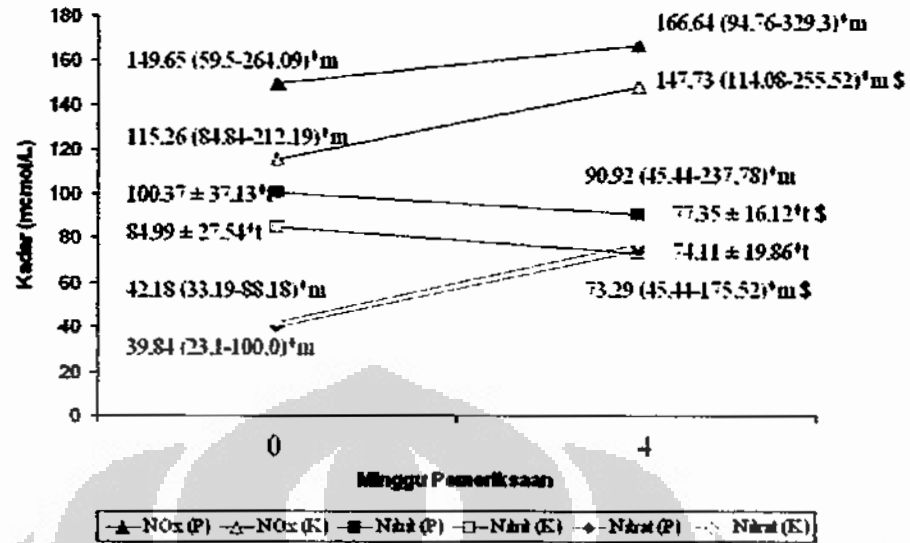
Variabel	Perlakuan	Kontrol	p
Nitrat anorganik (mg)			
Minggu 0	37,16±26,22	31,40±23,85	0,508 ^t
Minggu 2	130,91±19,49	33,69±15,50	0,000 ^{**t}
Minggu 4	130,33 (107,28-195,85) [#]	30,79 (9,47-118,38) ^{#s}	0,000 ^{**m}

S = 16 orang subyek; ** = bermakna; t = t-tes tidak berpasangan; m = mann whitney; # = median (minimum-maksimum)

Pada minggu 0, asupan nitrat anorganik tidak didapatkan perbedaan yang bermakna pada kedua kelompok, sedangkan pada minggu 2 dan 4 asupan nitrat anorganik pada kelompok perlakuan didapatkan lebih tinggi bermakna dibandingkan kelompok kontrol.

4.4. Kadar Nitrit, Nitrat dan NO_x Serum

Pemeriksaan kadar nitrit, nitrat, dan NO_x serum dilakukan sebelum dan setelah perlakuan. Gambar 4.2 memperlihatkan nilai kadar nitrit, nitrat, dan NO_x serum sebelum dan setelah perlakuan. Setelah perlakuan, pada kedua kelompok didapatkan peningkatan kadar nitrit, nitrat dan NO_x serum yang lebih tinggi pada kelompok perlakuan, namun secara statistik tidak bermakna.

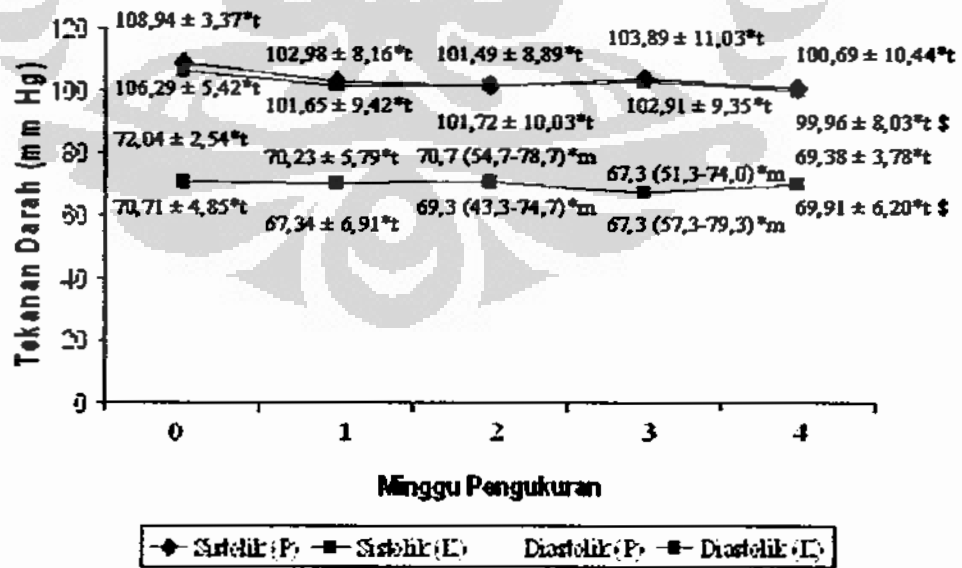


\$ = 16 orang subyek; * = tidak bermakna; t = t-tes tidak berpasangan; m = mann whitney; P = perlakuan; K = kontrol

Gambar 4.2. Kadar Nitrit, Nitrat, dan NO_x Serum

4.5. Tekanan Darah Sistolik dan Diastolik

Pengukuran tekanan darah dilakukan sekali seminggu. Gambar 4.3 memperlihatkan nilai tekanan darah sistolik dan diastolik. Tidak didapatkan penurunan tekanan darah sistolik dan diastolik yang bermakna selama dan setelah perlakuan pada kedua kelompok.



\$ = 16 orang subyek; * = tidak bermakna; t = t-tes tidak berpasangan; m = mann whitney; P = perlakuan; K = kontrol

Gambar 4.3. Tekanan Darah Sistolik dan Diastolik

BAB 5

PEMBAHASAN

Telah dilakukan penelitian dengan desain uji klinis paralel, membandingkan kelompok yang mendapat jus bayam 100 gram per hari selama empat minggu berturut-turut disertai penyuluhan gizi dengan kelompok yang hanya mendapat penyuluhan gizi saja pada mahasiswa laki-laki semester dua Fakultas Kedokteran Universitas Udayana.

5.1. Keterbatasan Penelitian

Metoda Penelitian

Pada penelitian ini kelompok kontrol tidak mendapatkan plasebo karena kesulitan dalam membuat produk plasebo. Dari kepustakaan diketahui penggunaan plasebo merupakan salah satu teknik ketersamaran dalam uji klinis.^{44,50}

Jumlah nitrat anorganik dalam jus bayam ditentukan hanya berdasarkan daftar bahan makanan sumber nitrat anorganik dalam tabel, dan tidak dilakukan pengukuran jumlah nitrat anorganik secara langsung karena kesulitan dalam melakukan metoda pengukuran secara langsung.

Penilaian Asupan Zat Gizi

Keterbatasan penilaian asupan zat gizi dengan metoda *food record* dalam pelaksanaannya subyek penelitian cenderung tidak mencatat secara langsung makanan yang dikonsumsi. Sekitar 5 orang (14,7%) subyek malah baru mencatat makanan pada saat lembar catatan asupan makanan akan dikumpulkan pada minggu pertama, sehingga hasilnya cenderung tidak lengkap. Hal ini menyebabkan hasil perhitungan asupan makanan kemungkinan menjadi bias.⁴⁰

Penilaian asupan dengan metoda *food recall* 2 x 24 jam, walaupun mudah dan murah serta tidak terlalu membebani subyek penelitian, metoda ini memiliki keterbatasan meliputi (1) *recall bias*, subyek lupa atau tidak melaporkan hal yang sebenarnya. Subyek cenderung lupa dengan makanan yang dimakan terutama untuk 24 jam pertama, sehingga subyek terlihat tidak yakin melaporkan jenis dan jumlah makanan yang dimakan. Kemungkinan bias ini dapat diperkecil dengan pencatatan asupan zat gizi subyek dalam lembar catatan asupan makanan.

(2) *interviewer bias*, karena terjadi perbedaan persepsi antara subyek dengan pewawancara, namun kemungkinan bias ini dapat diperkecil dengan menyamakan persepsi antara keduanya, misalnya mengenai porsi makanan yaitu dengan menunjukkan contoh porsi makanan (*food models*).⁴⁰

Analisis asupan energi dan natrium menggunakan program *nutrisurvey* 2005 dan analisis asupan nitrat anorganik secara manual menggunakan daftar bahan makanan sumber nitrat anorganik. Dalam pelaksanaannya ditemukan kesulitan untuk beberapa makanan lokal yang tidak tercantum pada program tersebut (biasanya jenis makanan olahan), namun tercantum komposisinya. Analisis dilakukan dengan memperkirakan jumlah dari masing-masing komposisi makanan, sehingga hal ini dapat mempengaruhi hasil perhitungan jumlah asupan makanan subyek menjadi *underestimate* atau bahkan *overestimate*. Contoh makanan yang termasuk golongan ini, yaitu gado-gado dan lawar (makanan khas Bali). Kesulitan menentukan analisis asupan natrium dikarenakan mahasiswa tidak memasak sendiri sehingga tidak diketahui jumlah garam yang digunakan, dan penambahan garam dalam masakan yang dihidangkan.

Pemeriksaan Laboratorium

Pemeriksaan kadar nitrat, nitrit, dan NO_x serum dilakukan dengan metoda *Colorimetric Griess*. Keterbatasan metoda ini yaitu tidak dapat memeriksa kadar NO yang sebenarnya, oleh karena NO berbentuk gas dan memiliki waktu paruh yang sangat singkat sehingga bersifat tidak stabil. Kadar NO_x serum yang diukur adalah total kadar nitrat dan nitrit serum, sebagai metabolit antara sintesis NO. Kadar NO_x serum hanya memberikan gambaran bioavailabilitas NO dan tidak memberikan gambaran aktivitas NO.⁴¹

5.2. Seleksi Subyek Penelitian

Sebanyak 43 orang mahasiswa laki-laki semester dua Fakultas Kedokteran Universitas Udayana menyatakan bersedia mengikuti penelitian setelah menandatangani lembar persetujuan penelitian. Pemilihan jenis kelamin subyek penelitian dibatasi hanya laki-laki, dikarenakan laki-laki memiliki risiko lebih tinggi untuk menderita prahipertensi dibandingkan perempuan. Prevalensi prahipertensi pada laki-laki (40%) lebih tinggi dibandingkan perempuan (23%).

Keadaan ini berkaitan dengan tingginya kebiasaan merokok, minum alkohol dan faktor stres pada laki-laki dibandingkan perempuan.³

Setelah dilakukan penapisan dengan menilai IMT dan tekanan darah, didapatkan sejumlah 34 orang mahasiswa yang memenuhi kriteria penerimaan sebagai subyek penelitian. Kriteria penerimaan penelitian meliputi IMT normal untuk dewasa ($18,5-22,9 \text{ kg/m}^2$)³⁰ dan untuk usia < 18 tahun (persentil 5th-85th)³¹, dan tekanan darah normal (sistolik antara 100-119 mm Hg, diastolik antara 60-79 mm Hg)¹. Sebanyak sembilan orang yang tidak memenuhi kriteria penerimaan yaitu enam orang (13,95%) mahasiswa memiliki IMT lebih dari normal, dua orang (4,65%) memiliki IMT kurang dari normal, dan satu orang (2,33%) memiliki IMT dan tekanan darah lebih tinggi dari normal.

Berdasarkan kriteria penolakan, tidak didapatkan subyek yang memiliki riwayat hipertensi, memiliki kebiasaan mengkonsumsi alkohol dan atau sebagai perokok aktif.

Subyek dengan IMT lebih tidak dimasukkan dalam penelitian, karena peningkatan IMT berhubungan dengan peningkatan tekanan darah. Risiko peningkatan tekanan darah sebesar dua sampai enam kali pada subyek dengan IMT lebih dibandingkan subyek dengan IMT normal.^{22,49}

Subyek dengan riwayat tekanan darah tinggi tidak dimasukkan dalam penelitian, karena bioavailabilitas NO yang rendah merupakan faktor risiko peningkatan tekanan darah.²⁶ Hal ini terlihat pada penelitian Lyamina dkk yang mendapatkan korelasi negatif bermakna pada hipertensi antara kadar NO_x serum dan tekanan darah sistolik maupun diastolik.²⁹

Subyek perokok tidak dimasukkan dalam penelitian. Komponen yang terdapat dalam rokok seperti nikotin dan tar bersifat toksik dan reaktif sehingga mudah menghasilkan radikal bebas yang mempunyai efek langsung meningkatkan penglepasan katekolamin oleh sistem saraf otonom.^{22,48}

Subyek peminum alkohol juga tidak dimasukkan dalam penelitian, oleh karena alkohol dapat mempengaruhi tekanan darah walaupun mekanismenya belum jelas. Alkohol diduga dapat merangsang hipotalamus untuk mensekresi hormon kortisol dan kortikotropin yang berperan meningkatkan aktivitas sistem

saraf simpatis. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pengurangan konsumsi alkohol dapat menurunkan tekanan darah sistolik dan diastolik.^{22,49}

Pada penelitian ini variabel-variabel yang mempengaruhi kadar NO_x serum dan tekanan darah (*confounding variables*) meliputi usia, jenis kelamin, IMT, merokok, alkohol, asupan natrium, dan aktivitas fisik merupakan variabel yang dikontrol, sehingga hasil penelitian tidak menjadi bias, dan adanya perbedaan hasil merupakan akibat perlakuan yang diberikan.²²

5.3. Karakteristik Data Dasar

Tidak didapatkan perbedaan yang bermakna mengenai karakteristik data dasar sebelum penelitian dimulai (tabel 4.1), hal tersebut menggambarkan kedua kelompok dalam keadaan homogen. Karakteristik kedua kelompok homogen merupakan salah satu syarat dalam uji klinis untuk mendapatkan hasil yang sah. Salah satu cara yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan melakukan randomisasi blok, dengan demikian perbedaan yang bermakna pada akhir penelitian merupakan akibat perlakuan yang diberikan.³²

5.3.1. Usia

Median dan minimum-maksimum usia subyek penelitian kedua kelompok adalah 18 (17-19) tahun dan tidak didapatkan perbedaan yang bermakna pada kedua kelompok. Berdasarkan data SKRT Indonesia 2004 menunjukkan rerata tekanan darah kelompok usia 15-24 tahun adalah normal yaitu sebesar 119,8/76,5 mm Hg.² Penapisan pada penelitian ini didapatkan satu orang mahasiswa dengan tekanan darah tinggi.

Usia merupakan salah satu faktor risiko peningkatan tekanan darah, data SKRT 2004 juga memperlihatkan tekanan darah meningkat sejalan dengan bertambahnya usia yang dimulai pada kelompok usia 25-34 tahun dan pada kelompok usia 45-54 tahun sebesar 137,9/84,8 mm Hg.² Bertambahnya usia secara fisiologis menyebabkan perubahan elastisitas struktur dinding pembuluh darah sehingga menyebabkan peningkatan resistensi perifer.¹

5.3.2. IMT

Median IMT pada kedua kelompok adalah normal (nilai rentang 18,5-22,9 kg/m²). Indeks massa tubuh dua orang subyek usia 17 tahun termasuk kategori normal yaitu satu orang kelompok perlakuan persentil 68th dan satu orang kelompok kontrol persentil 53th. Konversi nilai IMT subyek usia 17 tahun berdasarkan tabel persentil berat terhadap tinggi.²⁹ Tidak didapatkan perbedaan yang bermakna pada IMT kedua kelompok.

Data SKRT Indonesia 2004 menunjukkan rerata IMT kelompok usia 18-24 tahun adalah normal yaitu sebesar 20,6±0,059 kg/m². Penapisan pada penelitian ini didapatkan tujuh orang mahasiswa dengan IMT lebih. Indeks massa tubuh tinggi merupakan salah satu faktor risiko peningkatan tekanan darah. Risiko terjadinya peningkatan tekanan darah pada orang yang mempunyai berat badan lebih adalah dua sampai enam kali lebih tinggi daripada orang dengan berat badan normal. Kelebihan berat badan ≥ 20% dari berat badan ideal, meningkatkan risiko prahipertensi dua kali daripada non obes.²²

Mekanisme kenaikan tekanan darah pada subyek dengan IMT berlebih diduga karena hipervolemia dan peningkatan curah jantung tanpa pengurangan tahanan perifer yang sesuai, juga adanya peningkatan aktivitas sistem saraf simpatis dan resistensi insulin.^{22,49}

5.3.3. Aktivitas Fisik

Pada penelitian ini aktivitas fisik merupakan variabel perancu yang dikontrol, dalam hal subyek dianjurkan untuk tetap melakukan aktivitas fisik seperti biasa. Sebanyak 14 orang subyek (41,18%) memiliki indeks aktivitas fisik cukup dan 20 orang (58,82%) memiliki indeks aktivitas fisik rendah. Sebagian besar subyek penelitian (58,82%) tidak melakukan olahraga secara teratur, sehingga saat dikalikan dengan faktor durasi dan intensitas, didapatkan indeks aktivitas fisik tergolong kategori rendah, di bawah nilai rata-rata (nilai rentang 41-60).⁴⁵

Aktivitas fisik dinilai berdasarkan indeks aktivitas fisik meliputi jenis olahraga, frekuensi, intensitas, dan durasi. Rendahnya indeks aktivitas subyek penelitian berkaitan erat dengan aktivitas mahasiswa yang cenderung lebih banyak melakukan aktivitas statis (seperti duduk, belajar). Indeks aktivitas fisik yang

rendah akan mempengaruhi perhitungan kebutuhan energi total, oleh karena penambahan faktor aktivitas fisik hanya 10%.³⁴

Pada penelitian ini kebutuhan energi total subyek menjadi lebih rendah dibandingkan dengan AKG Indonesia 2004 kelompok usia 16-19 tahun (2500 kkal). Hal tersebut dikarenakan perhitungan AKG menggunakan batasan ± 2 SD dari estimasi kebutuhan rata-rata, sehingga nilai AKG menjadi lebih tinggi.⁴³

Aktivitas fisik yang rendah, dapat menurunkan produksi NO yang secara paralel menurunkan produksi *endothelial drive relaxing factor* (EDRF) sehingga menyebabkan peningkatan tekanan darah. Pada penelitian sebelumnya didapatkan 30-50% subyek dengan aktivitas fisik yang rendah akan menjadi prahipertensi.²²

5.3.4. Kadar Nitrit, Nitrat, dan NO_x Serum Sebelum Perlakuan

Kadar nitrit, nitrat, dan NO_x serum sebelum perlakuan pada kedua kelompok tidak memperlihatkan perbedaan yang bermakna. Kadar nitrat pada penelitian ini didapatkan dalam batas normal ($> 30 \mu\text{mol/L}$).³⁹ Nitrat berasal dari oksidasi NO menjadi nitrit terlebih dahulu, kemudian nitrit mengalami oksidasi menjadi nitrat. Kadar nitrat serum meningkat dengan cepat setelah diet tinggi nitrat dapat mencapai 16 kali lebih tinggi setelah 1,5 jam.¹¹

Kadar nitrit serum pada penelitian ini didapatkan dalam batas normal ($> 1,0 \mu\text{mol/L}$).³⁹ Nitrit juga berasal dari oksidasi NO disamping proses reduksi nitrat menjadi nitrit kembali. Asupan nitrat anorganik juga dapat mempengaruhi kadar nitrit serum oleh karena proses reduksi nitrat menjadi nitrit. Kadar nitrit serum meningkat dengan cepat setelah diet tinggi nitrit dapat mencapai dua kali lebih tinggi setelah tiga jam.¹¹

Senyawa nitrat dan nitrit serum merupakan metabolit antara yang dapat membentuk NO kembali. Kadar NO_x serum hanya menggambarkan keadaan bioavailabilitas NO namun tidak menggambarkan tingkat aktivitas NO. Pada penelitian ini didapatkan kadar NO_x serum subyek penelitian adalah normal, hal ini sesuai dengan penelitian oleh Lyamina dkk, yang mendapatkan kadar NO_x serum pada subyek dengan tekanan darah normal lebih tinggi dibandingkan subyek dengan hipertensi.²⁹ Pada hipertensi, substrat arginin untuk sintesis NO mulai berkurang akibat bertambah beratnya disfungsi endotel.²⁷

5.4. Asupan Energi, Natrium, dan Nitrat Anorganik

5.4.1. Penilaian Berdasarkan *Food Record* dan *Food Recall* 2 x 24 Jam Sebelum Perlakuan

Penilaian asupan dengan kedua metoda tersebut memperlihatkan nilai rerata asupan energi, natrium, dan nitrat anorganik berdasarkan *food record* lebih tinggi dibandingkan rerata asupan berdasarkan *food recall* 2 x 24 jam. Keterbatasan metoda *food recall* meliputi *recall bias* dan *interviewer bias* menyebabkan hasil penilaian asupan menjadi lebih rendah. Selanjutnya analisis asupan energi, natrium, dan nitrat anorganik menggunakan metoda *food record* untuk meminimalkan bias.

5.4.2. Asupan Energi

Tidak didapatkan perbedaan yang bermakna asupan energi pada kedua kelompok sebelum perlakuan, demikian juga pada minggu 2 dan 4 tidak memperlihatkan perbedaan yang bermakna. Hal tersebut berkaitan dengan penyuluhan gizi yang dilakukan menunjukkan ketaatan subyek mengikuti diet gizi seimbang. Rerata asupan energi kedua kelompok masih di bawah AKG Indonesia 2004 (2500 kkal).⁴³ Asupan energi ini berkaitan dengan rendahnya indeks aktivitas fisik sehari-hari, subyek lebih banyak melakukan kegiatan statis yang sedikit memerlukan energi.

Walaupun rerata asupan energi kedua kelompok di bawah AKG Indonesia 2004, namun dilihat dari persentase asupan energi dibandingkan dengan kebutuhan energi total masing-masing subyek tergolong dalam kategori cukup (80-120% terhadap kebutuhan energi total). Namun demikian, IMT subyek dalam batas normal, disebabkan dalam perhitungan AKG dipergunakan batasan ± 2 SD dari estimasi kebutuhan rata-rata, sehingga nilai AKG menjadi lebih tinggi.⁴³ Di samping itu indeks aktivitas fisik subyek tergolong rendah sehingga penambahan faktor aktivitas fisik untuk menghitung kebutuhan energi total hanya 10%.³⁴

Asupan energi yang cukup akan memenuhi kebutuhan energi total sehari-hari, sehingga dapat menjaga berat badan dalam batas normal dan hal tersebut tercermin pada tekanan darah subyek termasuk kategori normal. Hal ini sesuai

dengan rekomendasi JNC 7 yang menyatakan bahwa asupan energi yang sesuai dengan kebutuhan dapat menjaga berat badan dalam batas normal.¹

5.4.3. Asupan Natrium

Jumlah asupan natrium dinilai secara khusus karena berdasarkan kepustakaan natrium diketahui memiliki peran penting dalam patofisiologi peningkatan tekanan darah.¹ Penilaian jumlah asupan natrium meliputi penggunaan garam dan bahan makanan sumber natrium lainnya, seperti kecap asin dalam makanan sehari-hari serta kebiasaan mengonsumsi makanan ringan dan makanan yang diasinkan.

Tidak didapatkan perbedaan yang bermakna asupan natrium pada minggu 0, 2 dan 4 pada kedua kelompok. Rerata asupan natrium kedua kelompok justru sedikit lebih rendah dibandingkan dengan AKG Indonesia 2004 (1500-2400 mg/hari).⁴³ Rendahnya rerata asupan natrium diduga karena keterbatasan penilaian dan analisis asupan natrium sehingga kemungkinan memperlihatkan hasil yang *underestimate*. Dalam penilaian jumlah asupan natrium, terdapat kesulitan menghitung jumlah penggunaan garam dalam makanan olahan, karena mahasiswa tidak memasak makanan sendiri.

Membatasi asupan natrium sesuai angka kecukupan gizi diketahui bermanfaat mengurangi risiko peningkatan tekanan darah. Asupan natrium tersebut mempengaruhi kemampuan ginjal mengekskresikan natrium, sehingga dapat mengakibatkan terjadinya penurunan kadar natrium dan air dalam darah. Perubahan ini mengakibatkan terjadinya penurunan volume plasma dan curah jantung yang berperan dalam menurunkan tekanan darah. Natrium juga berperan mempengaruhi reaktivitas pembuluh darah terhadap hormon norepinefrin dan transpor aktif ion Na^+ melalui membran sel otot polos pembuluh darah sehingga berperan merangsang atau menghambat kontraksi pembuluh darah.²²

Pada subyek dengan tekanan darah normal, asupan natrium yang rendah tidak akan menyebabkan penurunan tekanan darah, oleh karena adanya mekanisme regulasi tekanan darah melalui reabsorpsi natrium dalam ginjal. Reabsorpsi natrium yang berarti ekskresi natrium melalui urin akan berkurang, akan disertai oleh reabsorpsi air sehingga volume plasma tetap dipertahankan

untuk menjaga tekanan darah tetap normal.²² Tidak didapatkan keluhan pada subyek dengan jumlah asupan natrium yang rendah selama pengamatan, hal ini mendukung perkiraan bahwa penilaian asupan natrium subyek penelitian kemungkinan *underestimate*.

5.4.4. Asupan Nitrat Anorganik

Penilaian jumlah asupan nitrat anorganik dilakukan secara manual dengan cara menghitung komposisi bahan makanan yang mengandung nitrat anorganik kemudian dikonversikan berdasarkan tabel daftar bahan makanan sumber nitrat anorganik.³⁹ Metoda penilaian ini memiliki keterbatasan kesulitan dalam menentukan jumlah nitrat anorganik yang terkandung dalam makanan olahan (seperti sayur urap, sup). Hal tersebut juga dapat menimbulkan penilaian yang tidak tepat sehingga terjadi *underestimate* atau bahkan *overestimate*. Catatan asupan makanan subyek juga memiliki keterbatasan seperti yang telah diuraikan di atas.

Tidak didapatkan perbedaan yang bermakna asupan nitrat anorganik pada kedua kelompok sebelum perlakuan. Berdasarkan catatan asupan makanan, hanya sedikit bahan makanan sumber nitrat anorganik yang dikonsumsi; namun rerata asupan nitrat anorganik kedua kelompok masih dalam batas yang dianjurkan yaitu antara 0,1-3,7 mg/kg BB/hari.³⁶

Pada minggu 2 dan 4 asupan nitrat anorganik memperlihatkan perbedaan yang bermakna pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol. Jumlah jus bayam sebanyak 100 gram per hari diperhitungkan berdasarkan batasan asupan nitrat anorganik per hari yang dianjurkan antara 0,1-3,7 mg/kg BB/hari. Jumlah nitrat anorganik yang digunakan untuk menentukan jumlah bayam yang diberikan adalah sebanyak 2 mg/kg BB/hari. Diperkirakan asupan nitrat anorganik subyek juga diperoleh dari sumber bahan makanan lainnya, sehingga tidak menggunakan batas maksimal, namun hasil analisis asupan nitrat anorganik selama perlakuan didapatkan asupan dari sumber bahan makanan lain lebih rendah.

Kandungan nitrat anorganik dalam bahan makanan sangat bervariasi, proses penyimpanan, persiapan dan pengolahan makanan mempengaruhi

kandungan nitrat anorganik. Kandungan nitrat anorganik dalam bahan makanan tiap daerah tergantung dari kesuburan tanah dan tingkat penggunaan pupuk nitrogen. Proses penyimpanan dalam lemari pendingin dapat menurunkan kadar nitrat anorganik sampai 30% dan proses pengolahan bahan makanan dengan pemanasan dapat menurunkan kadar nitrat anorganik sampai 50%, dikarenakan sifat nitrat yang lebih mudah larut dalam air.¹⁸

Pemilihan bayam hijau sebagai sumber nitrat anorganik berdasarkan fakta bayam hijau mengandung nitrat anorganik tertinggi ketiga (99 mg/100 gram bayam hijau mentah) setelah seledri dan selada.¹⁸ Bayam hijau sangat familiar digunakan sebagai bahan makanan sehari-hari dengan harga relatif murah dibandingkan seledri dan selada.

Jenis bayam yang digunakan adalah bayam hijau lokal organik yang ditanam di daerah dataran tinggi Pancasari, Bali. Bayam ini memiliki daun yang lebar dan batang yang besar. Kandungan nitrat anorganik lebih banyak terdapat pada daun daripada batang bayam. Di samping itu kandungan nitrat anorganik dalam bayam juga tergantung pada lingkungan tempat ditanam, dimana kandungannya akan meningkat jika ditanam di daerah bersuhu dingin dan pajanan sinar matahari yang rendah.¹⁸ Hal ini sesuai dengan jenis bayam yang dipilih dari daerah dataran tinggi di Bali. Bayam yang digunakan pada masa perlakuan juga diambil dari satu tempat sehingga diharapkan tidak ada perbedaan kualitas.

Efek samping yang terjadi selama pemberian jus bayam adalah sebanyak 14 orang (82,32%) mengeluh mual dan satu orang (5,88%) mengalami muntah. Keluhan ini terjadi karena aroma jus bayam seperti aroma rumput yang dapat merangsang rasa mual dan muntah. Untuk mengurangi efek samping tersebut, subyek minum jus bayam setelah satu jam makan pagi. Bolus yang terdapat dalam lambung akan bercampur dengan jus bayam sehingga mengurangi efek mual akibat aroma jus bayam.

5.5. Kadar Nitrit, Nitrat dan NO_x Serum Setelah Perlakuan

Setelah perlakuan, pada kedua kelompok didapatkan peningkatan kadar nitrit, nitrat dan NO_x serum yang lebih tinggi pada kelompok perlakuan, namun secara statistik tidak berbeda bermakna. Hasil tersebut berbeda dengan hasil penelitian

Larsen dkk sebelumnya yang menunjukkan pemberian suplementasi natrium nitrat selama tiga hari memperlihatkan peningkatan bermakna kadar nitrat dan nitrit serum.¹² Webb dkk melakukan penelitian pada subyek dengan tekanan darah normal yang diberikan nitrat anorganik dalam jus bit 500 mL satu kali dalam 24 jam; didapatkan peningkatan bermakna kadar nitrit, nitrat dan NO_x serum setelah tiga jam perlakuan, dan setelah 24 jam kadarnya menurun seperti sebelum perlakuan.¹¹

Peningkatan kadar nitrat, dan nitrit serum berasal dari asupan nitrat anorganik; setelah mengkonsumsi nitrat anorganik, di dalam lambung sebagian nitrat akan direduksi menjadi nitrit dan NO . NO yang dihasilkan dapat berperan melindungi mukosa lambung. Selanjutnya nitrat, dan nitrit akan diabsorpsi dalam usus halus ke dalam pembuluh darah. Dalam pembuluh darah, sebagian nitrat akan direduksi kembali menjadi nitrit dan sebagian melalui masuk ke siklus enterosaliva untuk direduksi menjadi nitrit dalam kelenjar air liur oleh bakteri komensal dalam rongga mulut.¹⁶ Nitrat dan nitrit serum merupakan metabolit antara yang dapat membentuk NO kembali. Batasan asupan nitrat anorganik antara 0,1-3,7 mg/kg BB/hari; pada penelitian ini, jumlah nitrat anorganik dalam bayam hanya 2 mg/kg BB/hari, sehingga diduga belum mempengaruhi perubahan kadar NO_x serum. Keadaan ini kemungkinan dipengaruhi oleh mekanisme ekskresi nitrat yang sebagian besar (65-70%) melalui urin; ekskresi maksimal terjadi setelah lima jam mengkonsumsi nitrat dan kadar nitrat serum kembali normal setelah 18 jam.¹⁷

Aktivitas fisik juga diketahui dapat meningkatkan kadar NO_x serum, terutama jenis aerobik karena adanya peningkatan aliran darah yang bersifat pulsatif sehingga meningkatkan produksi NO . Penelitian in vitro menunjukkan bahwa peningkatan aliran darah 4 ml/menit sudah dapat meningkatkan NO . Peningkatan denyut jantung 10 kali per menit mengakibatkan aliran darah koroner meningkat sampai 224 ml/menit (meningkat 24 ml/menit dibandingkan saat istirahat 200 ml/menit) sehingga produksi NO meningkat.⁴⁷

Indeks aktivitas fisik subyek tergolong kategori rendah, sedangkan perbedaan indeks aktivitas fisik dapat mempengaruhi kadar NO_x serum. Adanya kenaikan kadar NO_x serum pada kelompok kontrol kemungkinan disebabkan 10

orang subyek memiliki indeks aktivitas fisik cukup. Hal ini sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa aktivitas fisik dapat meningkatkan kadar NO tubuh.⁴⁷

5.6. Tekanan Darah Sistolik dan Diastolik

Hasil penelitian memperlihatkan tidak didapatkan perbedaan yang bermakna tekanan darah sistolik maupun diastolik pada kedua kelompok setelah perlakuan selama empat minggu berturut-turut. Hal tersebut sesuai dengan perubahan kadar NO_x serum yang tidak bermakna sehingga tidak menyebabkan perubahan tekanan darah sistolik dan diastolik.

Hasil tersebut berbeda dengan hasil penelitian oleh Webb dkk sebelumnya pada subyek dengan tekanan darah normal yang diberikan nitrat anorganik dalam jus bit 500 mL satu kali dalam 24 jam, hasilnya menunjukkan adanya penurunan bermakna tekanan darah sistolik dan diastolik.¹¹ Uji klinik Larsen dkk menunjukkan pemberian suplementasi natrium nitrat pada subyek dengan tekanan darah normal selama tiga hari memperlihatkan penurunan bermakna tekanan darah diastolik, sedangkan penurunan tekanan darah sistolik tidak bermakna.¹²

Perbedaan hasil penelitian ini disebabkan usia subyek penelitian tergolong kelompok usia dewasa muda, sedangkan usia subyek penelitian Webb dkk dan Larsen dkk bervariasi antara 18-52 tahun. Perbedaan kelompok usia ini mempengaruhi kemampuan tubuh dalam mekanisme pengaturan tekanan darah. Bertambahnya usia akan menimbulkan perubahan anatomi dan fisiologi pembuluh darah yang dapat mempengaruhi tekanan darah.^{1,22}

Pada penelitian ini dilihat juga pengaruh asupan energi, natrium, dan nitrat anorganik terhadap perubahan tekanan darah. Persentase asupan energi kedua kelompok terhadap kebutuhan energi total dalam penelitian ini tergolong kategori cukup dan tidak didapatkan perbedaan yang bermakna, dapat diperkirakan karenanya asupan energi tidak mempengaruhi perubahan tekanan darah.

Asupan natrium selama perlakuan pada kedua kelompok tidak memperlihatkan perbedaan yang bermakna. Asupan natrium kedua kelompok lebih rendah dibandingkan AKG Indonesia 2004. Hasil penilaian asupan natrium tidak menggambarkan keadaan yang sebenarnya karena keterbatasan metode

penilaian dan analisis asupan natrium. Karenanya dapat diperkirakan asupan natrium yang rendah tidak mempengaruhi perubahan tekanan darah.

Asupan nitrat anorganik juga diketahui berperan mempengaruhi tekanan darah melalui peningkatan kadar NO sebagai vasodilator. Asupan nitrat anorganik yang lebih tinggi pada kelompok perlakuan menyebabkan kadar nitrit, nitrat dan NO_x serum pada kelompok perlakuan lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol namun tidak berbeda secara statistik. Ada kemungkinan hal tersebut yang menyebabkan tidak didapatkan penurunan tekanan darah sistolik dan diastolik yang bermakna pada kelompok perlakuan.

Pengukuran jumlah nitrat anorganik dalam daun bayam tidak dilakukan secara langsung, hanya berdasarkan tabel daftar bahan makanan sumber nitrat anorganik. Kemungkinan hal tersebut menyebabkan perbedaan jumlah nitrat anorganik dalam daun bayam yang digunakan sehingga tidak didapatkan peningkatan kadar nitrit, nitrat dan NO_x serum yang bermakna.

Pada penelitian ini kelompok kontrol tidak mendapatkan plasebo karena kesulitan dalam membuat produk plasebo. Penggunaan plasebo merupakan salah satu teknik ketersamaran dalam uji klinis untuk mengurangi bias, dari sisi subyek penggunaan plasebo dapat mengurangi pengaruh plasebo efek yakni perasaan mengalami suatu efek padahal efek tersebut tidak ada.^{44,50} Hal tersebut kemungkinan mempengaruhi perubahan tekanan darah pada kelompok kontrol.

Subyek penelitian pada penelitian ini adalah subyek dengan tekanan darah normal oleh karena penelitian ini adalah uji klinis fase II. Pada keadaan normal, terjadi homeostasis tekanan darah sehingga penurunan tekanan darah sulit terjadi. Secara fisiologis tubuh selalu mengatur tekanan darah dalam batas normal, dengan mekanisme pengaturan tekanan darah terjadi melalui mekanisme neural dan hormonal yang bekerja secara simultan. Perubahan tekanan darah yang sangat kecil kemungkinan dapat terjadi namun secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. Perubahan tekanan darah sistolik dan diastolik kedua kelompok setiap minggu (gambar 4.3) memperlihatkan perbedaan yang sangat kecil namun secara statistik tidak berbeda bermakna.

BAB 6

RINGKASAN, KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Ringkasan

Prahipertensi merupakan keadaan yang ditandai meningkatnya tekanan darah sistolik antara 120-139 mm Hg atau diastolik antara 80-89 mm Hg dan merupakan gejala awal timbulnya hipertensi derajat satu.¹ Rerata tekanan darah di Indonesia pada kelompok usia 25-34 tahun sebesar 119,8/76,5 mm Hg dan peningkatan tekanan darah berkorelasi positif sejalan dengan bertambahnya usia.² Prevalensi prahipertensi lebih banyak ditemukan pada laki-laki (40%) dibandingkan perempuan (23%).^{2,3}

Salah satu penyebab timbulnya prahipertensi adalah disfungsi endotel pembuluh darah. Disfungsi endotel menggambarkan perubahan fungsi sel endotel dalam mengatur tonus otot polos pembuluh darah, akibat berkurangnya sekresi NO sebagai vasodilator.⁶ Berkurangnya sekresi NO salah satunya disebabkan karena berkurangnya sintesis NO endogen dari arginin atau rendahnya asupan sumber nitrat anorganik yang terutama terdapat pada sayuran berwarna hijau seperti bayam.⁷ Data Susenas 2004 menunjukkan hanya 60% dari populasi di Indonesia yang mengkonsumsi sayuran yang sesuai anjuran 4-5 kali sehari, sedangkan sisanya tidak adekuat.⁸

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh jus bayam terhadap kadar NO_x serum dan tekanan darah. Penelitian ini merupakan uji klinis paralel, membandingkan kelompok yang mendapat 100 gram daun bayam dalam bentuk jus bayam satu kali per hari selama empat minggu berturut-turut disertai penyuluhan gizi (P) dengan kelompok yang hanya mendapat penyuluhan gizi saja (K) pada mahasiswa laki-laki semester dua Fakultas Kedokteran Universitas Udayana dengan status gizi dan tekanan darah normal.

Sebanyak 43 orang menyatakan kesediaan untuk ikut serta dalam penelitian, dan menandatangani lembar persetujuan penelitian. Berdasarkan kriteria penelitian, didapatkan sejumlah 34 orang mahasiswa yang memenuhi kriteria sebagai subyek penelitian. Penentuan alokasi subyek penelitian dilakukan dengan cara randomisasi blok, dan didapatkan 17 orang subyek sebagai kelompok

perlakuan dan 17 orang subyek sebagai kelompok kontrol. Dalam perjalanannya, hanya 33 orang yang berhasil menyelesaikan penelitian ini.

Data diperoleh dari hasil wawancara meliputi usia, indeks aktivitas fisik, asupan energi, natrium, dan nitrat anorganik berdasarkan *food recall* 2 x 24 jam dan *food record*. Selain itu juga dilakukan pengukuran berat badan, tinggi badan, dan penilaian indeks massa tubuh. Pemeriksaan kadar nitrit, nitrat, dan NO_x serum, serta pengukuran tekanan darah sistolik dan diastolik dilakukan sebelum dan setelah perlakuan.

Median dan minimum-maksimum usia subyek penelitian adalah 18 (17-19) tahun. Indeks aktivitas fisik subyek tergolong kategori cukup sebanyak 14 orang (41,18%) dan 20 orang (58,82%) tergolong rendah. Pada awal penelitian karakteristik data dasar pada kedua kelompok tidak memperlihatkan perbedaan yang bermakna. Hal ini menggambarkan kedua kelompok dalam keadaan homogen/sebanding.

Persentase asupan energi terhadap kebutuhan energi total pada kedua kelompok termasuk kategori cukup yaitu pada kelompok perlakuan $84,93 \pm 10,60$ % dan kelompok kontrol $88,19 \pm 5,47$ %. Asupan natrium kedua kelompok selama perlakuan lebih rendah dibandingkan dengan AKG Indonesia 2004 yaitu pada kelompok perlakuan 1083,00 (834,84-1797,50) mg/hari dan kelompok kontrol 923,95 (676,20-2494,05) mg/hari. Sebanyak 14 orang (82,32%) subyek mengeluh mual pada minggu pertama, satu orang (5,88%) mengalami muntah pada hari ke-20 dan dua orang (11,76%) tidak merasakan keluhan apapun selama perlakuan, namun demikian semua subyek tetap melanjutkan penelitian sampai akhir. Didapatkan perbedaan yang bermakna asupan nitrat anorganik selama perlakuan pada kelompok perlakuan sebesar 130,33 (107,28-195,85) mg/hari lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol sebesar 30,79 (9,47-118,38) mg/hari.

Setelah perlakuan selama empat minggu berturut-turut, pada kedua kelompok didapatkan peningkatan kadar nitrit, nitrat dan NO_x serum yang lebih tinggi pada kelompok perlakuan, namun secara statistik tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$). Tidak didapatkan penurunan tekanan darah sistolik dan diastolik yang bermakna pada kedua kelompok selama dan setelah perlakuan ($p > 0,05$).

6.2. Kesimpulan

Pada penelitian pengaruh jus bayam terhadap kadar NO_x serum dan tekanan darah pada laki-laki dewasa muda, dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

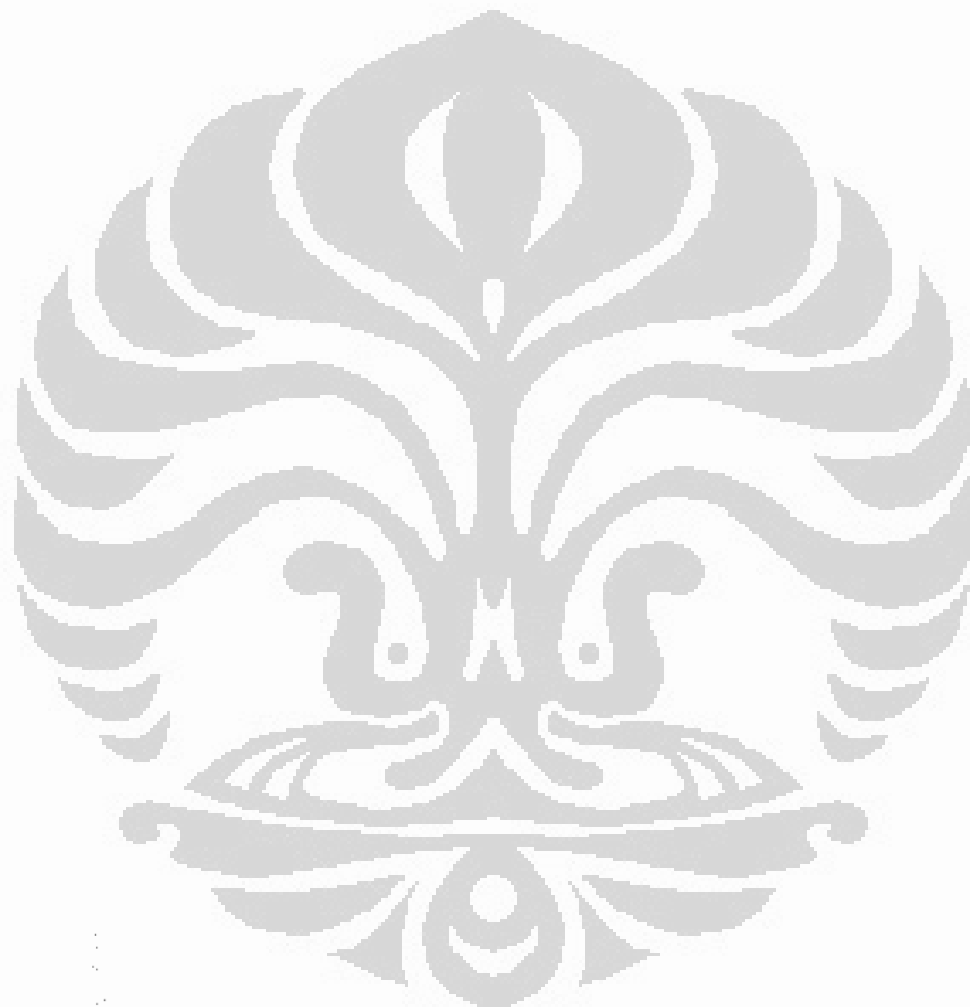
1. Median usia subyek penelitian adalah 18 (17-19) tahun dengan indeks aktivitas fisik subyek tergolong kategori rendah.
2. Penilaian asupan energi dan natrium pada kedua kelompok berdasarkan *food record* lebih tinggi dibandingkan asupan berdasarkan *food recall* 2 x 24 jam, sedangkan asupan nitrat anorganik tidak berbeda.
3. Persentase asupan energi terhadap kebutuhan energi total pada kedua kelompok tergolong kategori cukup, sedangkan asupan natrium pada kedua kelompok selama perlakuan lebih rendah dibandingkan dengan AKG Indonesia 2004. Selama perlakuan didapatkan asupan nitrat anorganik pada kelompok perlakuan lebih tinggi bermakna.
4. Pada kedua kelompok didapatkan peningkatan kadar NO_x serum sebesar 25 $\mu\text{mol/L}$ yang lebih tinggi pada kelompok perlakuan, namun secara statistik tidak bermakna.
5. Tidak terdapat penurunan tekanan darah sistolik sebesar 5,5 mm Hg dan diastolik sebesar 3 mm Hg yang bermakna pada kelompok perlakuan.

Berdasarkan hal tersebut di atas, hipotesis yang diajukan pada penelitian ini belum dapat dibuktikan.

6.3. Saran

1. Perlu dilakukan validasi dalam penilaian dan analisis asupan natrium, dan nitrat anorganik untuk meminimalkan bias.
2. Perlu dilakukan penelitian dengan rancangan serupa menggunakan metoda pengukuran aktivitas NO pada tingkat ekspresi gen enzim eNOS yang lebih stabil.
3. Indeks aktivitas fisik subyek tergolong rendah sehingga perlu dianjurkan untuk melakukan olahraga secara teratur.
4. Perlu dilakukan penelitian dengan rancangan serupa pada subyek dengan prahipertensi atau hipertensi.

5. Perlu dilakukan penelitian dengan rancangan serupa dengan jumlah nitrat anorganik yang lebih tinggi dan dilakukan pengukuran kandungan nitrat anorganik dalam bayam secara langsung dengan metoda ekstraksi.
6. Perlu dilakukan penelitian dengan rancangan serupa dengan menggunakan plasebo sebagai salah satu teknik ketersamaran dalam uji klinik.



SUMMARY, CONCLUSIONS, AND RECOMMENDATIONS

Summary

Prehypertension is usually defined as a systolic blood pressure between 120-139 mm Hg or diastolic blood pressure between 80-89 mm Hg. It represents a risk of developing stage one hypertension.¹ The mean of blood pressure in Indonesia at 25-34 years old are 119,8/76,5 mm Hg and there are positive correlation between age and blood pressure. The prevalence of prehypertension in male are higher than female (40% of male; 23% of female).^{2,3}

The endothelial dysfunction has been used to refer to an impairment of endothelium-dependent vasorelaxation caused by a loss of nitric oxide (NO) secretion in the vessel wall as vasodilator.⁶ Impaired of NO synthesis from arginine or decrease anorganic nitrate intake from green leafy vegetables ie spinach caused it.⁷ According to the data of Susenas 2004, only 60% population consumed vegetables 4-5 times per day, whereas others have not adequate intake.⁸

The aims of this study were to investigate the effect of spinach juice on serum NO_x level and blood pressure. The study was a parallel randomized clinical trial, comparing subjects in treatment group received 100 gram per day spinach leaves juice during four weeks and nutrition counseling (P) and subjects in control group received nutrition counseling only (K) on second semester male students Medicine Faculty of Udayana University with normal nutrition status and blood pressure.

Forty three students provided written informed consent to participate in the present study. Thirty four students were selected using certain criteria. The subjects were divided into two groups using block randomization, seventeen subjects in the treatment group and seventeen subjects in the control group. Only thirty three subjects were completed the study.

Data collected by interviewing the subjects were age, physical activity, body mass index, energy, sodium, and inorganic nitrate intake with 2 x 24 hours food recall and food record. Laboratory findings (serum nitrite, nitrate, and NO_x level) and blood pressure examination were done before and after intervention.

Median of age were 18 (17-19) years old. Fourteen (41,18%) subjects have moderate physical activity index and twenty (58,82%) subjects were low. The characteristic data of the two groups at base line were no significant difference. The characteristic of the two groups were closely matched at base line.

All subjects consumed energy achieve to the recommended diet with an average of $84,93 \pm 10,60$ % in the treatment group and $88,19 \pm 5,47$ % in the control group. The average intake of sodium in both groups were lower than Indonesian recommended dietary allowance 2004 ie. 1083,00 (834,84-1797,50) mg/day in the treatment group and 923,95 (676,20-2494,05) in the control group. Fourteen (82,32%) subjects complaint nausea at first week, one (5,88%) subject complaint vomiting at day 20, while two (11,76%) other subject did not complaint any effect at all during intervention, but all of them were completed the study. The average intake of inorganic nitrate 130,33 (107,28-195,85) mg/day in the treatment group increase significantly than 30,79 (9,47-118,38) mg/day in the control group.

After four weeks of intervention, there were increase in serum nitrit, nitrat and NO_x level in the treatment group were higher than in the control group, although not statistically significant ($p > 0,05$). There were no significant decrease in systolic and diastolic blood pressure in the treatment group ($p > 0,05$).

Conclusions

The effect of spinach juice on serum NO_x level and blood pressure in young adult male were concluded that :

1. Median of age were 18 (17-19) years old and the physical activity index were low.
2. The average intake of energy and sodium in both group using food record were higher than 2 x 24 hours food recall, whereas the intake of inorganic nitrate was not different.
3. The percentage of energy consumed in both groups achieve to the recommended diet, whereas the average intake of sodium lower than Indonesian recommended dietary allowance 2004. During intervention, the average intake of inorganic nitrate in the treatment group increase significantly.

4. There were increase in serum NO_x level (25 μmol/L) which were higher in the treatment group, although not statistically been proven yet.
5. There were also no significant decrease in systolic (5,5 mm Hg) and diastolic (3 mm Hg) blood pressure in the treatment group.

Therefore, the hypothesis were proposed in this study could not been proven yet.

Recommendations

1. There is a need to validate the food analysis to determine sodium and anorganic nitrate intakes to decrease bias.
2. There is a need to conduct similar study design with stable gene expression of eNOS enzyme examination.
3. The physical activity index subject were low, so it was suggested to increase the daily physical activity.
4. There is a need to conduct similar study design in prehypertension or hypertension subject.
5. There is a need to conduct similar study design with higher dosage of inorganic nitrate and inorganic nitrate examination in spinach directly by extraction method.
6. There is a need to conduct similar study design with a placebo design as well as one of the blinding technic in clinical trial.

DAFTAR REFERENSI

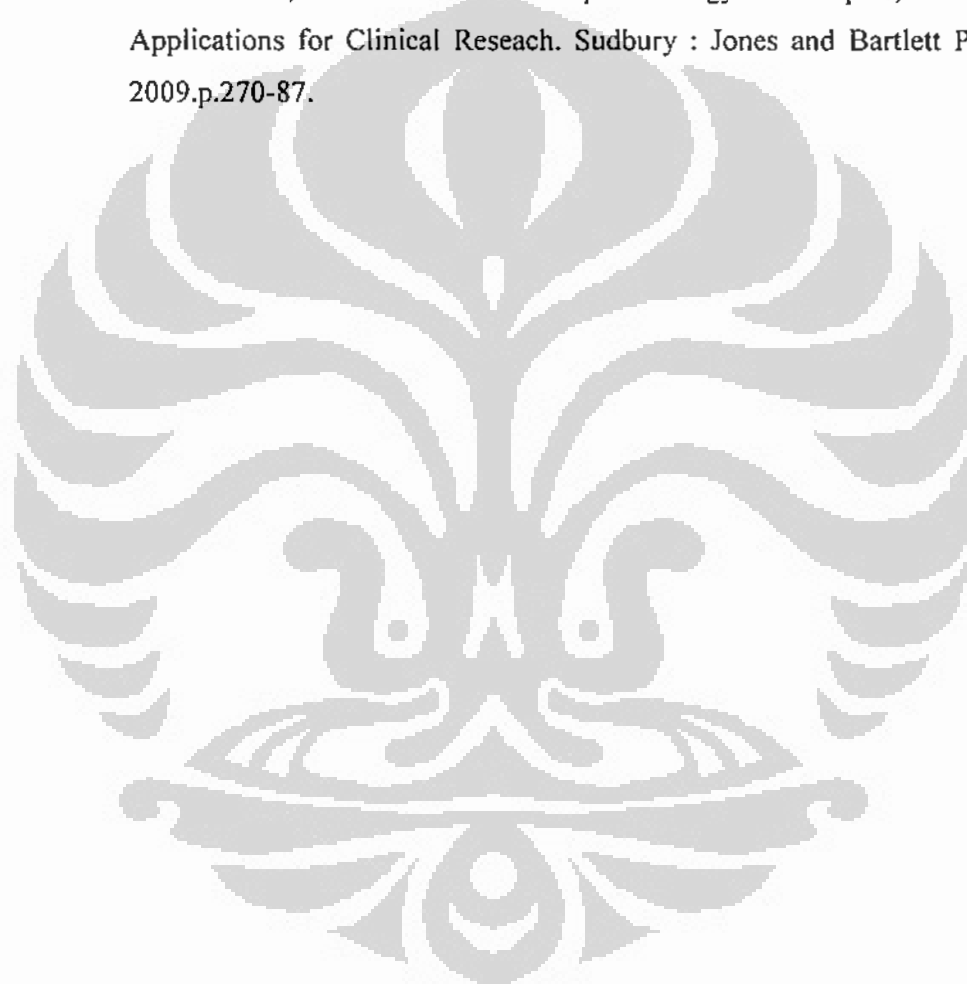
1. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 Report. *JAMA* 2003;289:2560-72.
2. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) 2004*. Vol 2. Jakarta: Litbangkes.
3. Reckelhoff JF. Gender Differences In The Regulation Of Blood Pressure. *Hypertension* 2001;37:1199-208.
4. Qureshi AI, Suri FK, Kirmani JF, Divani AA, Mohammed Y. Is Prehypertension a Risk Factor For Cardiovascular Disease?. *Stroke* 2005;36:1859-63.
5. Vasani R, Beiser A, Seshadri S, Larson M, Kannel WB, D'Agostino RB, et al. Residual Lifetime Risk For Developing Hypertension in Middle Aged Women and Men: The Framingham Heart Study. *JAMA* 2002;287:1003-10.
6. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelial Dysfunction : A Multifaceted Disorder. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:985-1002.
7. Bryan NS. *Dietary Nitrite and Nitrate Contribute to Cardiovascular Health and Disease*. Institute of Molecular Medicine for the Prevention of Human Diseases. The University of Texas Press.
8. Badan Pusat Statistik (BPS). *Survei Sosial Ekonomi Nasional (Susenas) 2004*. Pedoman Kepala BPS Propinsi, Kabupaten/Kota. Jakarta: BPS.
9. Plotnick GD, Corretti MC, Vogel RA, Hesslink R, Wise JA. Effect of Supplemental Phytonutrients on Impairment of The Flow Mediated Brachialartery Vasoactivity After A Single High Fat Meal. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1744-9.
10. Ohta M, Nanri H, Matsushima Y, Sato Y, Ikeda M. Blood Pressure Lowering Effects of Lifestyle Modification: Possible Involvement of Nitric Oxide Bioavailability. *Hypertens Res* 2005;28:779-86.

11. Webb AJ, Patel N, Loukogeorgakis S, Okorie M, Aboud Z, Misra S, et al. Acute Blood Pressure Lowering, Vasoprotective, and Antiplatelet Properties of Dietary Nitrate via Bioconversion to Nitrite. *Hypertension* 2008;51:784-90.
12. Larsen FJ, Ekblom B, Sahlin K, Lundberg JO, Weitzberg E. Effects of Dietary Nitrate on Blood Pressure in Healthy Volunteers. *N Engl J Med* 2006;355:2792-3.
13. Watson A. *Agricultural Innovation In The Early Islamic World*. Cambridge University Press.p.62.
14. United States Departement of Agriculture, Agricultural Research Service. USDA National Nutrientt Database for Standard Reference. *Nutrientt Data Laboratory Home Page*, 2005. Dalam <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp> (diakses tanggal 28 Januari 2009).
15. Barnum DW. Some History of Nitrates. *J Chem Ed* 2003;80:1393-6.
16. Dezfulian C, Raat N, Shiva S, Gladwin MT. Role of The Anion Nitrite in Ischemia Reperfusion Cytoprotection and Therapeutics. *Cardio Res* 2007;75:327-38.
17. Lundberg JO, Weitzberg E. NO Generation From Nitrite and Its Role in Vascular Control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:915-22.
18. Thomsom B. Nitrates and Nitrites Dietary Exposure and Risk Assessment. *ESR* 2004;1-37.
19. Benjamin, N. Nitrate In The Human Diet-Good or Bad?. *Ann Zootech* 2000;49:207-16.
20. Starodubtseva MN, Ignatenko VA, Cherenkevich SN. Damage to Erythrocytes Initiated by The Interaction of Nitrite Ions With Hemoglobin. *Biofizika* 1999;44:1068-972.
21. Chobanian AV. Prehypertension Revisited. *Hypertension* 2006;48:812-14.
22. Couch SC, Krummel DA. Medical Nutrition Therapy for Hypertension. In: Mahan LK, Escott-Stump S, editors. *Krause's Food and Nutrition Therapy*. 12th ed. Missouri: Saunder Elsevier. 2008.p.865-83.
23. Suryohudoyo P. Dasar Molekuler Patogenesis Hipertensi. Dalam: *Kapital Selektta Ilmu Kedokteran Molekuler*. Jakarta: Sagung Seto. 2000.hal.66-79.

24. Tsuchiya K, Takiguchi Y, Okamoto M, Izawa Y, Kanematsu Y, Yoshizumi M, et al. Malfunction of Vascular Control in Lifestyle-Related Disease : Formation of Systemic Hemoglobin-Nitric Oxide Complex (HbNO) From Dietary Nitrite. *J Pharmacol Sci* 2004;96:395-400.
25. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial Dysfunction and Its Role in Atherosclerosis : Testing and Clinical Relevance. *Circulation* 2007;115:1285-95.
26. Cai H, Harrison DG. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Disease : The Role of Oxidant Stress. *Circ Res* 2000;87:840-4.
27. Endemann DH. Endothelial Dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1983-92.
28. Griffiths MJD, Evans TW. Inhaled Nitric Oxide Therapy in Adults. *N Engl J Med* 2005;353:2683-95.
29. Lyamina NP, Dolotovskaya PV, Lyamina SV, Malyshev IY, Manukhina EB. Nitric Oxide Production and Intensity of Free Radical Processes in Young Men With High Normal and Hypertensive Blood Pressure. *Med Sci Monit* 2003;9:304-10.
30. WHO-WPRO. The Asia-Pacific Perspective : Redefining Obesity and Its Treatment. *Health Communications Australia*, 2000.p.22. Dalam <http://www.diabetes.com> (diakses tanggal 16 Januari 2009).
31. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Guo SS, Wei R, et al. CDC Growth Charts : United States. *Advance Data*. 2000;314:1-27.
32. Madiyono B, Moeslichan S, Sastroasmoro S, Budiman I, Purwanto HS. Perkiraan Besar Sampel. Dalam: Sastroasmoro S, dan Ismael S, editor. *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis*. Edisi ke-2. Jakarta: Sagung Seto. 2002.hal.269.
33. Most MM. Estimated Phytochemical Content of The Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) Diet Is Higher Than In The Control Study Diet. *J Am Diet Assoc* 2004;104:1725-7.
34. Butte NF, Caballero B. Energy Needs: Assessment and Requirements. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, editors. *Modern Nutrition In Health and Disease*. 10th edition. Philadelphia: Lippicott Williams & Wilkins. 2006.p.136-48.

35. Willett WC, Stampfer MJ. Foundations of A Healthy Diet. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, editors. *Modern Nutrition In Health and Disease*. 10th edition. Philadelphia: Lippicott Williams & Wilkins. 2006.p.1625-37.
36. JECFA (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). Evaluation of Certain Food Additives. Fifty Ninth Report of JECFA. Genewa : World Health Organization. 2002.
37. Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, Vollmer WM, Svetkey LP, Sacks FM, et al. A Clinical Trial of The Effects of Dietary Patterns on Blood Pressure: DASH Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 1997;336:1117-24.
38. Oey KN. *Daftar Analisis Bahan Makanan*. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 1992.hal.1-50.
39. Alexander J, Benford D, Cockburn A, Cravedi JP, Dogliotti E, Domenico AD, et al. Nitrate in Vegetables. *The EFSA Journal* 2008;689:1-79.
40. Gibson RS. *Principles of Nutritional Assessment*. 2nd edition. New York: Oxford University Press. 2005.p.273-93.
41. Tarpey MM, Fridovich I. Method of Detection of Vascular Reactive Species : Nitric Oxide, Superoxide, Hydrogen Peroxide, and Peroxynitrite. *Circ Res*. 2001;89:224-36.
42. Waspadji S, Semiardji G, Sukardji K, Moenarko R. *Cara Mudah Mengatur Makanan Sehari-Hari Seimbang dan Sesuai Kebutuhan Gizi*. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 2007.hal.1-25
43. Widyakarya Nasional Pangan dan Gizi 2004. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Angka Kecukupan Gizi Indonesia* 2004.
44. Harun SR, Putra ST, Wiharta AS, Chair I. Uji Klinis. Dalam: Sastroasmoro S, dan Ismael S, editor. *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis*. Edisi ke-2. Jakarta: Sagung Seto. 2002.hal.144-63.
45. Montoye HJ, Kemper HCG, Saris WHM, Washburn RA. Measuring Physical Activity and Energy Expenditure. *Human Kinetics*. 1996.
46. Roosevelt FD. The Chemistry of Free Radicals and Related Reactive Species. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, editors. *Free Radicals In Biology and Medicine*. 4th edition. New York: Oxford University Press. 2007.p.30-78.

47. Kusmana, D. Aktivitas Fisik Yang Teratur Komponen Hidup Sehat dalam Pencegahan Dan Rehabilitasi Jantung. Dalam : Pidato pada Upacara Pengukuhan Sebagai Guru Besar Tetap dalam Ilmu Kardiologi Pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 2003. hal 6-7.
48. Franco V, Oparil S, Carretero OA. Hypertensive Therapy : Part II. *Circulation*. 2004;109:3081-8.
49. Svetkey LP. Management of Prehypertension. *Hypertension* 2005;45:1056-61.
50. Grobbee DE, Hoes AW. Clinical Epidemiology : Principles, Methods, and Applications for Clinical Reseach. Sudbury : Jones and Bartlett Publishers. 2009.p.270-87.



EFFECT OF SPINACH JUICE ON SERUM NO_x LEVEL AND BLOOD PRESSURE IN YOUNG ADULT MALE

Sutadarma IWG, Sayogo S, Effendi I

ABSTRACT

The aims of this study were to investigate the effect of 100 gram per day spinach juice during four weeks on serum NO_x level and blood pressure in young adult male. The study was a parallel randomized clinical trial. Thirty four subjects of second semester male student Medical Faculty of Udayana University were selected using certain criteria. The randomly (block randomization) thirty four subject were divided into two group. Treatment group (n=17) received spinach juice and nutrition counseling (P); the control group (n=17) received nutrition counseling alone. Data collected included age, physical activity, body mass index, intake of energy, sodium, and inorganic nitrate using 2 x 24 hours food recall and food record. Laboratory findings (serum nitrite, nitrate, and NO_x levels) and blood pressure examination were done before and after intervention. For statistical analysis, unpaired t-test and Mann Whitney were used. The level of significance was 5%. Seventeen subjects in the treatment group and sixteen subjects in the control group completed the study and analyzed. Median of age were 18 (17-19) years old. The physical activity index in both groups were low. The characteristic of the two groups were closely matched at base line (p>0,05). After four weeks intervention, all subjects consumed energy achieved the recommended diet with an average of 84,93±10,60 % in the treatment group and 88,19±5,47 % in the control group. The average intake of sodium in both groups were lower than Indonesian recommended dietary allowance 2004 (1083,00 (834,84-1797,50) mg/day vs 923,95 (676,20-2494,05) mg/day). The average intake of inorganic nitrate in the treatment group increased significantly than in the control group (130,33 (107,28-195,85) mg/day vs 30,79 (9,47-118,38) mg/day). In both groups there were increase in serum nitrit, nitrat and NO_x levels which were higher in the treatment group, although not statistically significant (p>0,05). There were also no significant decrease in systolic and diastolic blood pressure in the treatment group (p>0,05). In conclusions, the effects of 100 gram per day spinach juice during four weeks did not increase serum nitrit, nitrat and NO_x level and also were not decrease systolic and diastolic blood pressure in the treatment group.

Keywords. young adult male, spinach juice, inorganic nitrate, serum NO_x level, blood pressure.

INTRODUCTION

Prehypertension is usually defined as a systolic blood pressure between 120-139 mm Hg or diastolic blood pressure between 80-89 mm Hg. It represents a risk of developing stage one hypertension.¹ The mean blood pressure in Indonesia at 25-34 years old are 119,8/76,5 mm Hg and there are positive correlation between age and blood pressure. The prevalence of prehypertension in male are higher than female (40% of male; 23% of female).^{2,3}

Prehypertension is a risk factors for coronary heart disease, cardiac and renal failure.⁴ In recent observational studies in subjects between 40 and 80 years of age, the risk of cardiovascular disease increased progressively from levels as low as 115/75 mm Hg upward with doubling for every 20/10 mm Hg increment of blood pressure.⁵

Genetic, age, and sex were not modified risk factors of prehypertension, whereas obese, high intake of energy, sodium, less intake of potassium, low physical activity, alcohol intake and smoking were modified risk factors.⁵

The endothelial dysfunction has been used to refer to an impairment of endothelium-dependent vasorelaxation caused by a loss of nitric oxide (NO) secretion in the vessel wall as vasodilator.⁶ Impaired of NO synthesis from arginine or decrease anorganic nitrate intake from green leafy vegetables ie spinach caused it.⁷ According to the data of Susenas 2004, only 60% population consumed vegetables 4-5 times per day, whereas others were not adequate intake.⁸

The JNC 7 report recommended the adoption of healthy lifestyles to achieve normal blood pressure include maintainance of normal body weight, increasing physical activity, reducing intake of dietary sodium, adopting Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) eating plan and limiting alcohol intake.¹

Plotnick et al studied the effects of fruit and vegetables extract on normal blood pressure subjects for four weeks, showed increase in serum nitrite and nitrate level, whereas decrease in systolic and diastolic blood pressure were not significant.⁹ Ohta et al studied the effects of combination diet counseling and aerobic exercise on normal blood pressure subjects for 12 weeks, showed increase in serum nitrite and nitrate level, and decrease in systolic and diastolic blood pressure.¹⁰

Webb et al studied the effect of inorganic nitrate in 500 mL of beetroot juice on normal blood pressure subjects, showed increase in serum nitrite and nitrate level, and decrease in systolic and diastolic blood pressure. After 24 hours, levels had returned to near base line.¹¹ Whereas Larsen et al studied the effect of sodium nitrate on normal blood pressure subjects for three days, showed the decrease in diastolic blood pressure only.¹²

The study was a parallell randomized clinical trial, comparing in two group, were the treatment group received 100 gram per day spinach leaves juice during four weeks and nutrition counseling (P) and the control group received nutrition counseling only (K). Subjects were second semester male students Faculty of Medicine University of Udayana with normal nutrition status and blood pressure.

METHODS

Subjects

The study was a parallell randomized clinical trial. Fourty three second semester male students Medicine Faculty of Udayana University were partisipated and written informed consent were attained. Nine subjects were not included because body mass index was overweight (n=6), underweight (n=2) and overweight and prehypertension (n=1). Exclusion criteria were any history of hypertesion, smoking and alcohol intake. The final study group consisted of thirty four subjects, and were divided into two group using block randomization. Seventeen subjects in the treatment group and seventeen subjects in the control group. After four weeks of intervention, seventeen subjects in the treatment group and sixteen subjects in the control group were completed the study. This study were approved by the ethics committee Medicine Faculty of Indonesia University and the ethics committee Medicine Faculty of Udayana University.

Study Measurements

Selected subjects completed a questionnaire of demographic information. Physical activity was ascertained with the use of three questions questionnaire. These questions were aimed to quantify the frequency, duration, and intensity level of physical activity. Body weight and height were measured to determine the body mass index (BMI). The subjects completed a self-administered questionnaire on dietary habits using food record and 2 x 24 hours food recall to determine energy, sodium, and inorganic nitrate intake.

Subject were asked to fast 10-12 hours (overnight fast) before blood were drawn. Three mL fasting blood was used to measure serum nitrite, nitrate, and NO_x level. Combined serum nitrate and nitrite level were determined by a two-step reaction. Each measurement required 50 µL of serum. The first step consisted of an enzymatic conversion of nitrate to nitrite, utilizing nitrate reductase. The second step is the addition of Griess reagent that convert nitrite to a deep purple azo chromophore, which is quantified at 520-560 nm and compared to a series of nitrite standards. Laboratory findings were done before and after intervention.

Blood pressure were measured once every weeks and were done before and after intervention. Blood pressure were taken according to a standard protocol using a standard sphygmomanometer and stetoscope with the subject seated after five minutes rest. Three blood pressure were taken at five minutes interval and then mean measurement was used.

Statistical Analysis

All statistical calculation were performed with Statistical Package for Social Science (SPSS version 11.5) software. The normality test were assessed by Kolmogorov-Smirnov test. Differences in mean values were assessed by unpaired t-test for the normal distributed data or Mann Whitney for the abnormal one. Values of $p < 0,05$ were considered to indicate statistical significance.

RESULTS

Median age were 18 (17-19) years old. Fourteen (41,18%) subjects had moderate physical activity index (PAI) and twenty (58,82%) subjects had low PAI.

Table 1. Characteristic of Base Line

Variable	Treatment	Control	p
Age (years)	18 (17-19) [#]	19 (17-19) [#]	0,352 ^{*m}
Physical activity	6 (1-32) [#]	24 (1-32) [#]	0,088 ^{*m}
BMI (kg/m ²)	21,31 (18,62-22,95) [#]	20,59 (18,53-22,99) [#]	0,380 ^{*m}
Energy (kcal)	1505,65±341,79	1522,61±248,65	0,870 ^{*t}
Sodium (mg)	1212,67±332,20	1180,81±334,27	0,782 ^{*t}
Inorganik nitrate (mg)	37,16±26,22	31,40±23,85	0,508 ^{*t}
Nitrite level (µmol/L)	100,37±37,13	84,99±27,54	0,180 ^{*t}
Nitrate level (µmol/L)	39,84 (23,10-100,00) [#]	42,18 (33,19-88,18) [#]	0,705 ^{*m}
NO _x level (µmol/L)	149,65 (59,50-264,09) [#]	115,26 (84,84-212,19) [#]	0,153 ^{*m}
Systolic (mm Hg)	108,94±3,37	106,29±5,42	0,096 ^{*t}
Dyastolic (mm Hg)	72,04±2,54	70,71±4,85	0,322 ^{*t}

* = not significant; t = unpaired t-test; m = mann whitney;

= median (minimum-maximum)

The characteristic data of the two groups at base line were not significantly different. The characteristic of the two groups were closely matched at base line.

Table 2. Average of Energy, Sodium, and Inorganic Nitrate Intake Using Food Record and 2 x 24 Hours Food Recall Before Intervention

Variable	Food Record		Food Recall 2 x 24 jam	
	Treatment	Control	Treatment	Control
Energy (kcal)	1505,65±341,79	1522,61±248,65	1374,11±277,49	1400,34±155,81
Sodium (mg)	1212,67±332,20	1180,81±334,27	994,00 (444,80-2201,65) [#]	813,70 (383,00-1453,70) [#]
Inorganik nitrate (mg)	37,16±26,22	31,40±23,85	29,85 (16,55-125,79) [#]	24,83 (14,08-63,82) [#]

= median (minimum-maximum)

The analysis of nutrient intake using food record was higher than 2 x 24 hours food recall. To determine the average of nutrient intake food record was used to minimize bias.²²

Tabel 3. Energy Intake and Percentage of Total Energy Expenditure

Energy (kcal)	Treatment	Control	p
Base line	1505,65±341,79	1522,61±248,65	0,870 ^{t1}
2 nd Week	1606,01±251,64	1582,71±195,59	0,765 ^{t1}
4 th Week	1580,00±186,29	1641,48±142,14 ^S	0,297 ^{t1}
Percentage of intake (%) ^a	84,93±10,60	88,19±5,47	0,268 ^{t1}

S = 16 subjects; * = not significant; t = unpaired t-test;

a = percentage of total energy expenditure

The average of energy intake in both groups were not significantly different. All subjects consumed energy similar to the recommended diet (80-120% of total energy expenditure).

Tabel 4. Sodium Intake

Sodium (mg)	Treatment	Control	p
Base line	1212,67±332,20	1180,81±334,27	0,782 ^{t1}
2 nd Week	1080,10 (763,80-2048,60) [#]	1081,60 (616,50-1737,30) [#]	0,593 ^m
4 th Week	1083,00 (834,84-1797,50) [#]	923,95 (676,20-2494,05) ^{#S}	0,150 ^m

S = 16 subjects; * = not significant; t = unpaired t-test; m = mann whitney;

= median (minimum-maximum)

The average intake of sodium in both groups were not significantly different and were lower than Indonesian recommended dietary allowance 2004 (1500-2400 mg/day).²³ After four weeks intervention, fourteen (82,32%) subjects in the treatment group complaint of nausea at first week, one (5,88%) subject complaint of vomiting at day 20, while two (11,76%) other subject did not complaint any effect at all during intervention. All of them completed the study.

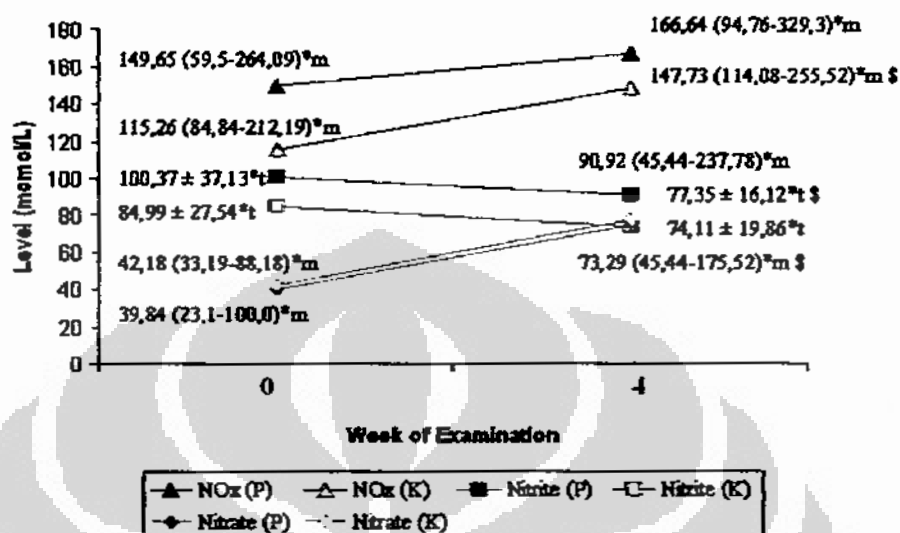
Tabel 5. Inorganic Nitrate Intake

Nitrate (mg)	Treatment	Control	p
Base line	37,16±26,22	31,40±23,85	0,508 ^{t1}
2 nd Week	130,91±19,49	33,69±15,50	0,000 ^{**t}
4 th Week	130,33 (107,28-195,85) [#]	30,79 (9,47-118,38) ^{#S}	0,000 ^{**m}

S = 16 subject; ** = Significant; t = unpaired t-test; m = mann whitney;

= median (minimum-maximum)

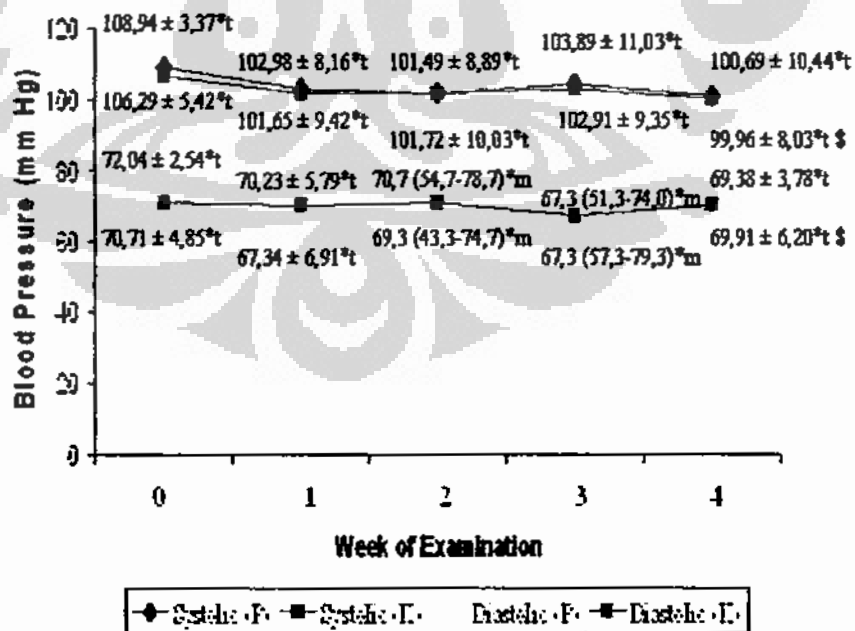
The average of inorganic nitrate intake in base line was not significantly significant, whereas in the 2nd and 4th week, the average of inorganic nitrate intake in treatment group increase significantly compared to control.



\$ = 16 subject; * = not significant; t = unpaired t-test; m = mann whitney; # = median (minimum-maximum)

Figure 1. Serum Nitrite, Nitrate and NO_x Level

There were increase in serum nitrite, nitrate, and NO_x level which were higher in the treatment group, although not statistically significant.



\$ = 16 subject; * = not significant; t = unpaired t-test; m = mann whitney; # = median (minimum-maximum)

Figure 2. Systolic and Diastolic Blood Pressure

There were no significant decrease in systolic and diastolic blood pressure in the treatment group.

DISCUSSION

Study limitations were the difficulty in producing a placebo product for the control group. Dosage of inorganic nitrate in spinach could not be established because direct examination was not possible. Inorganic nitrate table content were use instead. The analysis of nutrient intake using 2 x 24 hours food recall have several limitations included (1) recall bias; subjects forgot or did not report all food eaten, it could be minimize using food record, (2) interviewer bias; different perception between interviewer and subject, it which minimize using food models.²² The limitations of nutrisurvey 2005 programme which is used to determine the nutrient intake were not enough database on local food, therefor analysis was done by self-estimate of foodstuff portion. Laboratory findings using colorimetric Griess was not stable because NO was gasses form and has short half life time.²³

Confounding variables in this study included age, sex, BMI, smoking, alcohol intake, sodium intake, and physical activity were controlled by restriction using exclusion criteria so the results were not bias.¹⁵ The chracterictic data of the two groups at base line were not significantly different, because it was closely mathced at base line. The difference of value is cause by intervention.¹⁹

Median of age were 18 (17-19) years old. The mean blood pressure in Indonesian at 25-34 years old are normal (119,8/76,5 mm Hg) and there are positive correlation between age and blood pressure. One partisipant was prehypertension and not included. Ages was correlated with decrease of elasticity vascular walls which caused increase perifer resistance.¹ Median of BMI was normal (18,5-22,9 kg/m²). The mean of BMI in Indonesian at 18-24 years old was normal. Seven partisipant were overweight and not included. In obese, the risk to developing hypertension was 2-6 time compared non obese.¹⁵

Physical activity index were low because all subjects had static activity. Total energy expenditure (TEE) was determine using 10% of physical activity factor. TEE were lower than recommended dietary allowance (RDA) 2004, because to determine RDA using range ± 2 SD, so the score more higher.²⁴

Serum nitrate level at base line was normal ($> 30 \mu\text{mol/L}$) and also serum nitrite level was normal ($> 1,0 \mu\text{mol/L}$).²⁵ Serum nitrate level rises 16 fold after 1,5 hours nitrate diet and serum nitrite level rises twice after 3 hours nitrite diet. Nitrate and nitrite were intermediate metabolite for NO.¹¹ Lyamina et al showed serum NO_x level in normotensive subject were more higher than hypertensive subject.¹⁸ In hypertension, synthesis NO was decrease because of endothelial dysfunction.¹⁷

The average energy intake was lower than RDA 2004, because the physical activity index subject was low and they just done static activity. The percentage of TEE was normal (80-120%), whereas BMI also normal, because to determine RDA using range ± 2 SD and to determine TEE using 10% of physical activity index. Energy intake and body weight have positive correlation, meanwhile JNC 7 recommendation showed that normal energy intake could maintain normal body weight.¹

Sodium intake analysis were difficulty in determining the portion of sodium in foodstuff. The average sodium intake were lower than RDA 2004

(1500-2400 mg/day).²⁴ All subjects did not cook by themselves and they usually ate outside. Sodium intake and blood pressure have positive correlation. Low sodium intake did not decrease blood pressure, because the analysis sodium intake was underestimate. The effect low sodium intake were influenced reabsorption of water in the kidney and activation of norepinephrine which increase vasoconstriction.¹⁵ Ohta et al showed that nutrition counseling during 12 weeks could decrease blood pressure¹⁰, but in this study nutrition counseling just done three times so did not decrease blood pressure.

The analysis inorganic nitrate using inorganic nitrate foodstuff table contents.²¹ The limitations were difficulty in determining the portion of foodstuff and it could underestimate or overestimate. The average inorganic nitrate intake was normal (0,1-3,7 mg/kg BW/day).²⁰ Inorganic nitrate content in foodstuff were depend on soil, nitrogen fertilizers, humidity, storage, or food processing. Storage in freezer can lower until 30% and heat processing lower until 50% because of polarity.¹⁴ Spinach as a source of inorganic nitrate after celery and lettuce were familiar and more cheap. The spinach which used in this study taken from only one location to minimize the difference. The side effects of spinach juice were nausea and vomiting, because of grass like smell. To minimize this effects, they should drink the juice after breakfast.

After four weeks intervention, there were increase in serum nitrite, nitrate, and NO_x level which were higher in the treatment group, although not statistically significant. This results is different to Larsen et al¹² study and Webb et al¹¹ study who found increase of serum NO_x level after inorganic nitrate supplementation. The increase of serum NO_x level depend on concentration of inorganic nitrate in dietary source, whereas maximal nitrate excretion in urine (65-70%) after five hours nitrate diet.¹³ The dosage of inorganic nitrate in this study was not examined directly and were determined using inorganic nitrate table contents. Perhaps, it caused that inorganic nitrate in spinach juice were not increase serum NO_x level.

Physical activity influenced serum NO_x level, especially aerobic activity, because it could increase blood flow and also influence NO production. In vitro study showed that the increase of 4 mL/minutes of blood flow could increase NO production. A 10 fold increase of arterial pressure caused NO production increase.²⁶ Physical activity index was low, but there were no significant increase serum NO_x level. Perhaps, it caused that 10 subject of control group have moderate physical activity index. This results could increase serum NO_x level in the control group.

There were no significant decrease in systolic and diastolic blood pressure during and after intervention. The increase of serum NO_x level did not significantly decrease of blood pressure in the treatment group. This results is different to Larsen et al¹² and Webb et al¹¹ who found decrease in systolic and diastolic blood pressure after inorganic nitrate supplementation. Subject's age of the study were 18-52 years old, meanwhile in this study were 17-19 years old. This difference may affect blood pressure regulation, where in younger subject with normal blood pressure, regulation may be minimal.^{1,15} The average sodium intake were lower than RDA 2004 and this results were underestimate so its could not influence blood pressure.

Inorganic nitrate influence serum NO_x level by acting as vasodilator. There were increase of serum NO_x level which were higher in the treatment group,

although not statistically significant. The examination of inorganic nitrate concentration in spinach leaves was not done directly and determination were done by inorganic nitrate table contents. The difference in concentration of inorganic nitrate in spinach leaves influence the increase of serum NO_x level.

The control group did not received placebo because it difficult to made placebo. The autonomic nervous system was influence blood pressure regulatory and phsyologic factor.¹⁶ Perhaps, the control group had not received placebo could influence blood pressure regulatory.

All of subjects had normal blood pressure. Indeed, blood pressure regulatory in healthy subject were simultaneously. This mechanism will prevent the decrease or increase blood pressure. The decrease in blood pressure may happen although not statistically been proven yet.

In conclusions, the effects of 100 gram per day spinach juice during four weeks did not increase serum nitrit, nitrat and NO_x level and also were not decrease systolic and diastolic blood pressure in the treatment group.

REFERENCES

1. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 Report. *JAMA* 2003;289:2560-72.
2. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) 2004*. Volume 2. Jakarta: Litbangkes.
3. Reckelhoff JF. Gender Differences In The Regulation Of Blood Presure. *Hypertension* 2001;37:1199-208.
4. Qureshi AI, Suri FK, Kirmani JF, Divani AA, Mohammed Y. Is Prehypertension a Risk Factor For Cardiovascular Disease?. *Stroke* 2005;36:1859-63.
5. Vasan R, Beiser A, Seshadri S, Larson M, Kannel WB, D'Agostino RB, et al. Residual Lifetime Risk For Developing Hypertension in Middle Aged Women and Men: The Framingham Heart Study. *JAMA* 2002;287:1003-10.
6. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelial Dysfunction : A Multifaceted Disorder. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:985-1002.
7. Bryan NS. *Dietary Nitrite and Nitrate Contribute to Cardiovascular Health and Disease*. Institute of Molecular Medicine for the Prevention of Human Diseases. The University of Texas Press.
8. Badan Pusat Statistik (BPS). *Survei Sosial Ekonomi Nasional (Susenas) 2004*. Pedoman Kepala BPS Propinsi, Kabupaten/Kota. Jakarta: BPS.
9. Plotnick GD, Corretti MC, Vogel RA, Hesslink R, Wise JA. Effect of Supplemental Phytonutrients on Impairment of The Flow Mediated Brachialartery Vasoactivity After A Single High Fat Meal. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1744-9.
10. Ohta M, Nanri H, Matsushima Y, Sato Y, Ikeda M. Blood Pressure Lowering Effects of Lifestyle Modification: Possible Involvement of Nitric Oxide Bioavailability. *Hypertens Res* 2005;28:779-86.

11. Webb AJ, Patel N, Loukogeorgakis S, Okorie M, Aboud Z, Misra S, et al. Acute Blood Pressure Lowering, Vasoprotective, and Antiplatelet Properties of Dietary Nitrate via Bioconversion to Nitrite. *Hypertension* 2008;51:784-90.
12. Larsen FJ, Ekblom B, Sahlin K, Lundberg JO, Weitzberg E. Effects of Dietary Nitrate on Blood Pressure in Healthy Volunteers. *N Engl J Med* 2006;355:2792-3.
13. Lundberg JO, Weitzberg E. NO Generation From Nitrite and Its Role in Vascular Control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:915-22.
14. Thomsom B. Nitrates and Nitrites Dietary Exposure and Risk Assessment. *ESR* 2004;1-37.
15. Couch SC, Krummel DA. Medical Nutrition Therapy for Hypertension. In: Mahan LK, Escott-Stump S, editors. *Krause's Food and Nutrition Therapy*. 12th ed. Missouri: Saunder Elsevier. 2008.p.865-83.
16. Suryohudoyo P. Dasar Molekuler Patogenesis Hipertensi. Dalam: *Kapital Selektia Ilmu Kedokteran Molekuler*. Jakarta: Sagung Seto. 2000.hal.66-79.
17. Endemann DH. Endothelial Dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1983-92.
18. Lyamina NP, Dolotovskaya PV, Lyamina SV, Malyshev IY, Manukhina EB. Nitric Oxide Production and Intensity of Free Radical Processes in Young Men With High Normal and Hypertensive Blood Pressure. *Med Sci Monit* 2003;9:304-10.
19. Madiyono B, Moeslichan S, Sastroasmoro S, Budiman I, Purwanto HS. Perkiraan Besar Sampel. Dalam: Sastroasmoro S, dan Ismael S, editor. *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis*. Edisi ke-2. Jakarta: Sagung Seto. 2002.hal.269.
20. JECFA (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). Evaluation of Certain Food Additives. Fifty Ninth Report of JECFA. Geneva : World Health Organization. 2002.
21. Alexander J, Benford D, Cockburn A, Cravedi JP, Dogliotti E, Domenico AD, et al. Nitrate in Vegetables. *The EFSA Journal* 2008;689:1-79.
22. Gibson RS. *Principles of Nutritional Assessment*. 2nd edition. New York: Oxford University Press. 2005.p.273-93.
23. Tarpey MM, Fridovich I. Method of Detection of Vascular Reactive Species : Nitric Oxide, Superoxide, Hydrogen Peroxide, and Peroxynitrite. *Circ Res*. 2001;89:224-36.
24. Widyakarya Nasional Pangan dan Gizi 2004. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Angka Kecukupan Gizi Indonesia* 2004.
25. Harun SR, Putra ST, Wiharta AS, Chair I. Uji Klinis. Dalam: Sastroasmoro S, dan Ismael S, editor. *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis*. Edisi ke-2. Jakarta: Sagung Seto. 2002.hal.144-63.
26. Kusmana, D. Aktivitas Fisik Yang Teratur Komponen Hidup Sehat dalam Pencegahan Dan Rehabilitasi Jantung. Dalam : Pidato pada Upacara Pengukuhan Sebagai Guru Besar Tetap dalam Ilmu Kardiologi Pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 2003. hal 6-7.



UNIVERSITAS INDONESIA

FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Salemba Raya No. 6 Jakarta Pusat

Pos Box 1358 Jakarta 10430

Kampus Salemba Telp. 31930371, 31930373, Fax : 31930372, e-mail : taus-fk@makara.cso.ui.ac.id

NOMOR : 66 IPT02.FK/ETIK/2009

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK

ETHICAL -- CLEARANCE

Panitia Tetap Penilai Etik Penelitian, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:
The Committee of The Medical research Ethics of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled:

"PENGARUH JUS BAYAM TERHADAP KADAR NO_x PLASMA DAN TEKANAN DARAH MAHASISWA".

Peneliti Utama : dr.I. WAYAN GEDE SUTADARMA
Name of the principal investigator

Nama Institusi : ILMU GIZI FKUI/RSCM

dan telah menyetujui protocol tersebut di atas.
and approved the above mentioned proposal.

Jakarta, 23 Februari 2009



Chairman
Ketua

Prof. Dr. Agus Firmansyah, SpA(K)

-Peneliti wajib menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian.

Universitas Indonesia



**UNIT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN (LITBANG)
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS UDAYANA/
RUMAH SAKIT UMUM PUSAT SANGLAH DENPASAR**



Jln. Kesehatan, Denpasar

Telp.(0361) 227911-15 (Ext. 227)

KELAIKAN ETIK

(ETHICAL CLEARANCE)

No. : 77/Skrt/III/2009

Komisi Etika Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/Rumah Sakit Umum Pusat Sanglah Denpasar, setelah mempelajari dengan seksama rancangan penelitian yang diusulkan dengan ini menyatakan bahwa penelitian dengan judul :

“Pengaruh Jus Bayam Terhadap Kadar No_x Plasma dan Tekanan Darah Mahasiswa”

Peneliti Utama : dr. I Wayan Gede Sutadarma

Unit/Lembaga/Tempat Penelitian : Bagian Biokimia FK UNUD
Dinyatakan Laik Etik.

Denpasar, 31 Maret 2009

Komisi Etik Penelitian

Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/

Rumah Sakit Umum Pusat Sanglah Denpasar

Unit Penelitian dan Pengembangan

Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/

Rumah Sakit Umum Pusat Sanglah Denpasar

Ketua,

Ketua,

Prof. Dr.dr. IDN Wibawa, SpPD-KGEH
NIP. 130 886 668

Prof. dr. Soetjijingsih, SpA (K), IBCLC
NIP. 130 358 362



LAMPIRAN 2.

Lembar Informasi Penelitian

Yth. Saudara Mahasiswa

Dengan ini kami menjelaskan bahwa peningkatan tekanan darah di atas normal terutama pada dewasa muda mengakibatkan prahipertensi yang merupakan gejala awal hipertensi derajat satu. Untuk itu akan diadakan penelitian pada mahasiswa laki-laki mengenai pengaruh jus bayam terhadap kadar NO_x serum dan upaya mencegah peningkatan tekanan darah selama empat minggu berturut-turut. Apabila saudara bersedia mengikuti penelitian ini, maka akan dilakukan :

1. Wawancara mengenai usia, dan indeks aktivitas fisik.
2. Wawancara mengenai jumlah makanan yang dikonsumsi dan pencatatan makanan yang dikonsumsi sebanyak empat kali.
3. Pengambilan darah sebanyak 3 mL yang dilakukan sebanyak dua kali pada awal dan akhir penelitian untuk mengetahui kadar NO_x serum.
4. Pengukuran tekanan darah dilakukan seminggu sekali.
5. Penyuluhan gizi seminggu sekali mengenai diet seimbang tanpa mengubah kebiasaan makan.
6. Pemberian tambahan jus bayam 100 gram satu kali per hari selama empat minggu berturut-turut pada kelompok perlakuan.

Akibat pengambilan darah mungkin saudara akan merasakan sedikit ketidaknyamanan atau sakit, namun hal ini dapat diminimalkan dengan pengambilan darah oleh seorang tenaga yang terlatih dan menggunakan jarum suntik yang steril dan kecil. Saat mengkonsumsi jus bayam mungkin timbul gejala mual, namun hal ini dapat diminimalkan dengan cara jus bayam diminum setelah satu jam makan pagi.

Keikutsertaan saudara di dalam penelitian ini bersifat sukarela dan saudara dapat menolak atau mengundurkan diri selama proses penelitian berlangsung.

Keuntungan bagi saudara apabila ikut serta dalam penelitian ini adalah dapat mengetahui keadaan kesehatan dan status gizi serta mencegah peningkatan tekanan darah.

Semua data pada penelitian ini bersifat rahasia sehingga tidak memungkinkan orang lain mengetahuinya.

Apabila saudara bersedia ikut serta dalam penelitian ini, maka kami akan mohon kesediaannya untuk dapat menandatangani lembar persetujuan menjadi peserta penelitian :

**PENGARUH JUS BAYAM TERHADAP KADAR NO_x SERUM
DAN TEKanan DARAH PADA LAKI-LAKI DEWASA MUDA**

Hal-hal yang belum jelas dalam penelitian ini dapat ditanyakan secara langsung atau melalui telepon pada penanggung jawab penelitian ini yaitu dr. I Wayan Gede Sutadarma melalui telepon rumah 0361-425516, dan HP 08886161164.

Atas kesediaan saudara, kami ucapkan terima kasih.

Universitas Indonesia

LAMPIRAN 3.

Lembar Persetujuan

(Informed Consent)

**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
PROGRAM STUDI ILMU GIZI
KEKHUSUSAN ILMU GIZI KLINIK**

Surat Persetujuan Menjadi Peserta Penelitian

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama lengkap :

Usia (tahun) :

Alamat lengkap :

Setelah mendengar dan membaca penjelasan mengenai tujuan dan manfaat penelitian tersebut dengan judul :

**PENGARUH JUS BAYAM TERHADAP KADAR NO_x SERUM
DAN TEKANAN DARAH PADA LAKI-LAKI DEWASA MUDA**

Menyatakan dengan sukarela menyetujui diikutsertakan dalam penelitian tersebut dengan catatan bila sewaktu-waktu dirugikan dalam bentuk apapun berhak membatalkan persetujuan ini.

Denpasar,2009

Mengetahui
Penanggung jawab

Menyetujui
Peserta penelitian

(dr. I Wayan Gede Sutadarma)

(.....)

Saksi

(.....)

Universitas Indonesia

LAMPIRAN 4.

Lembar Data Karakteristik Subyek

Tanggal pemeriksaan :

No. Kode Subyek :

BIODATA

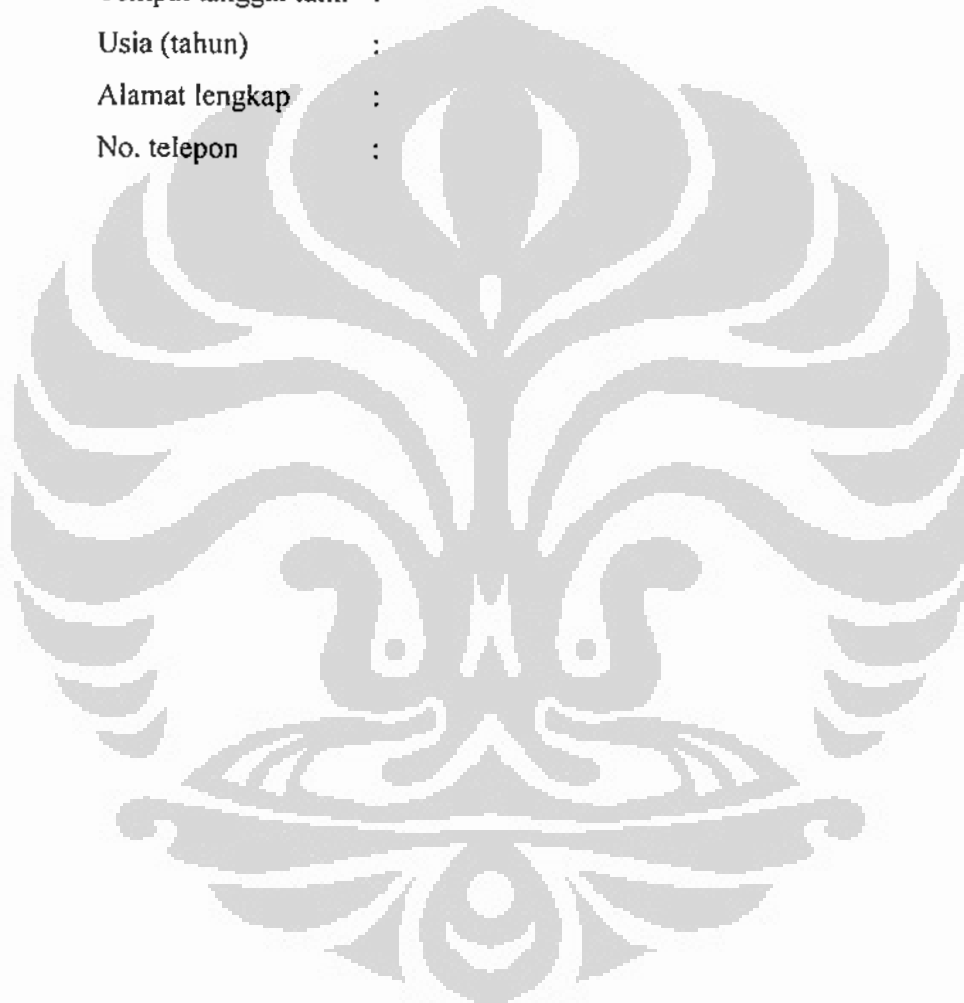
Nama lengkap :

Tempat tanggal lahir :

Usia (tahun) :

Alamat lengkap :

No. telepon :



LAMPIRAN 5.

Lembar Seleksi Dan Riwayat Penyakit

Tanggal pemeriksaan :

Nama subyek :

No. kode subyek :

Kriteria penerimaan

- | | Ya | Tidak |
|--|--------------------------|--------------------------|
| a. Apakah subyek adalah mahasiswa laki-laki semester dua? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| b. Apakah subyek memiliki IMT normal (18,5-22,9 kg/m ²)? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| c. Apakah tekanan darah subyek normal (100-119/60-79 mm Hg)? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Subyek diikutsertakan jika ketiga parameter di atas terpenuhi | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Kriteria penolakan

- | | Ya | Tidak |
|---|--------------------------|--------------------------|
| a. Apakah subyek memiliki riwayat penyakit hipertensi? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| b. Apakah subyek adalah perokok aktif? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| c. Apakah subyek selama ini mengkonsumsi alkohol? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Subyek dikeluarkan bila salah satu jawaban di atas "Ya" | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Riwayat penyakit

1. Berapa kali saudara mengunjungi dokter/pusat pelayanan kesehatan dalam satu tahun terakhir ini?

1. Tidak pernah
2. 1-2 kali
3. 3-12 kali
4. lebih dari 13 kali

2. Pernahkah saudara dirawat di rumah sakit?

1. Ya
2. Tidak

Jika Ya, berapa lamakah dirawat di rumah sakit?

1. 1-7 hari
2. 7-14 hari
3. Lebih dari 14 hari

3. Apakah dokter pernah memberitahu bahwa saudara pernah menderita suatu penyakit berat dan kapan memberitahunya?

No.	Nama Penyakit	Waktu
1.		
2.		
3.		
4.		

4. Apakah saat ini saudara sedang menjalani pengobatan oleh dokter?

1. Ya
2. Tidak

Jika Ya, sebutkan/tunjukkan obat yang sedang diminum, berapa dosisnya dan sudah berapa lama?

No.	Nama Obat	Dosis	Lama Pengobatan
1.			
2.			
3.			
4.			

LAMPIRAN 6.

Lembar Catatan Asupan Makanan

Tanggal pemeriksaan :

Nama subyek :

No. kode subyek :

Waktu	Jenis makanan	Tanggal		Tanggal	
		Jumlah		Jumlah	
		Porsi	URT	Porsi	URT
Pagi Jam	Makanan pokok 1. 2. Lauk pauk 1. 2. Sayuran 1. 2. Buah 1. 2. Minuman 1. 2.				
Selingan Jam					
Siang Jam	Makanan pokok 1. 2. Lauk pauk 1. 2. Sayuran 1. 2. Buah 1. 2. Minuman 1. 2.				
Selingan Jam					

Malam Jam	Makanan pokok				
	1.				
	2.				
	Lauk pauk				
	1.				
	2.				
	Sayuran				
	1.				
	2.				
	Buah				
1.					
2.					
Minuman					
1.					
2.					
Selingan Jam					

Keterangan

URT : ukuran rumah tangga (gelas, sendok, piring, potong)

LAMPIRAN 8.

Lembar Keluhan Subyek

Tanggal pemeriksaan :

Nama subyek :

No. kode subyek :

Minggu I	Minggu II	Minggu III	Minggu IV
Keluhan umum	Keluhan umum	Keluhan umum	Keluhan umum
Keluhan pencernaan	Keluhan pencernaan	Keluhan pencernaan	Keluhan pencernaan

LAMPIRAN 9.

Lembar Hasil Pemeriksaan Klinis

Tanggal pemeriksaan :

Nama subyek :

No. kode subyek :

Hasil Rerata Pengukuran Antropometri

No.	Pengukuran	Hasil
1.	Berat Badan (kg)	
2.	Tinggi Badan (m)	
3.	Indeks Massa Tubuh (kg/m^2)	

Hasil Rerata Pengukuran Tekanan Darah

No.	Tekanan Darah (mm Hg)	Hasil (Minggu)				
		0	1	2	3	4
1.	Sistolik					
2.	Diastolik					

Hasil Pemeriksaan Laboratorium

No.	Pemeriksaan	Hasil	
		Sebelum	Setelah
1.	Kadar nitrit serum ($\mu\text{mol/L}$)		
2.	Kadar nitrat serum ($\mu\text{mol/L}$)		
3.	Kadar NO_x serum ($\mu\text{mol/L}$)		

LAMPIRAN 10.

Lembar Indeks Aktivitas Fisik (IAF)

Tanggal pemeriksaan :
 Nama subyek :
 No. Kode subyek :
 Olah raga saat ini :
 (Lingkari pada nilai yang tertera)

1. Frekuensi (F)

Frekuensi	Nilai
Kurang sekali dalam sebulan	1
Beberapa kali per bulan	2
1 - 2 kali/minggu	3
3 - 5 kali/minggu	4
Setiap hari atau hampir setiap hari/minggu	5

2. Durasi (D)

Durasi	Nilai
Kurang dari 10 menit	1
10 - 20 menit	2
20 - 30 menit	3
> 30 menit	4

3. Intensitas (I)

Intensitas	Nilai
Ringan mis: jalan santai, 2.5 mph	1
Sedang mis: basket, bukan kompetisi	2
Cukup berat (berkeringat) mis: tenis tunggal	3
Berat (berkeringat) mis: bersepeda, aktivitas berat	4
Sangat berat (berkeringat) mis: lari cepat > 7.5 mph	5

NILAI: $I \times D \times F = \dots\dots\dots$

Interpretasi:

Nilai Total	Indeks Aktivitas Fisik
1 - 20	E = Rendah
21 - 40	D = Cukup
41 - 60	C = Rata-rata
61 - 80	B = Baik
81 - 100	A = Sangat baik

Catatan: Bila saudara melakukan 2 atau > jenis olahraga, Indeks Aktivitas Fisik saudara (nilai total) adalah jumlah dari dua atau > IAF

Contoh Aktivitas Fisik

Aktivitas	MET
Sepeda, ditempat, 50 W, sangat ringan, untuk latihan	3.0
Sepeda, < 10 mph, umum, senggang, ke tempat kerja atau untuk santai	4.0
Sepeda, di tempat, 100W, ringan, untuk latihan	5.5
Sepeda, di tempat, 150W, sedang	7.0
Sepeda, di tempat, 200W, berat	10.5
Kalistenik, ringan atau sedang, umum	4.5
Kalistenik, berat	8.0
Angkat beban, ringan atau sedang	3.0
Olahraga kesehatan bersama, umum	5.5
Treadmill, bertingkat, umum	6.0
Dayung, di tempat, 50W, ringan	3.5
Dayung, di tempat, 100W, ringan	7.0
Dayung, di tempat, 150W, berat	8.5
Peregangan	4.0
Pelatih klas aerobik	6.0
Latihan aerobik di air, kalistenik di air	4.0
Aerobik, umum	6.0
Aerobic, low impact (ringan)	5.0
Aerobic, high impact (tinggi, berat)	7.0
Menari (dancing), umum	4.5
Menari, perlahan	3.0
Menari (cepat)	5.5
Jogging, umum	7.0
Lari, 5 mph (12 min/mile)	8.0
Lari, 6 mph (10 min/mile)	10.0
Lari, 7 mph (8.5 min/mile)	11.5
Lari, 7.5 mph (8 min/mile)	12.5
Lari, di tempat	8.0
Badminton, bukan pertandingan, tunggal dan ganda, umum	4.5
Basket, bukan pertandingan, umum	6.0
Basket, pertandingan	8.0
Basket, memasukkan bola (shooting)	4.5
Bilyard	2.5
Bowling	3.0
Golf, umum	4.5
Judo, karate, tae kwan do	10.0
Panjat tebing, umum	8.0
Panjat tebing, cepat	12.0
Lompat tali, sedang, umum	10.0
Lompat tali, lambat	8.0
Sepakbola, santai, umum	7.0
Sepakbola, pertandingan	10.0
Tennis, umum	7.0
Tennis, tunggal	8.0

Aktivitas	MET
Tennis, ganda	6.0
Volley, bukan pertandingan	3.0
Volley, pertandingan	4.0
Jalan, kurang dari 2 mph, lambat, permukaan datar	2.5
Jalan, 2.5 mph, permukaan normal	3.0
Jalan, 3.5 mph, bertingkat, langkah pendek, permukaan normal	4.0
Jalan, 3.5 mph, naik bukit	6.0
Jalan, 4mph, level, permukaan datar, langkah pendek	4.0
Jalan, 4.5 mph, level, permukaan normal, langkah sangat, sangat pendek	4.5
Jalan, untuk santai, jalan bersama anjing	3.5
Jalan ke tempat kerja atau kelas	4.0
Menyelam (snorkeling)	5.0
Softball atau baseball, cepat atau lambat, umum	5.0
Surfing	3.0
Renang laps, gaya bebas, cepat, upaya berat	10.0
Renang laps, gaya bebas, lambat, sedang atau ringan	8.0
Renang, gaya punggung, umum	8.0
Renang, gaya dada, umum	10.0
Skating, ice, umum	7.0

Kategori Aktivitas Fisik

1. Aktivitas Fisik Ringan
< 5 MET atau < 6 kkal/menit
2. Aktivitas Fisik Sedang
5-7 MET atau 6-8 kkal/menit
3. Aktivitas Fisik Berat
> 7 MET atau > 8 kkal/menit

LAMPIRAN 11.

**Prosedur Pemeriksaan Laboratorium
(Kadar Nitrit, Nitrat, dan NO_x Serum)**

Metoda : *Colorimetric Griess Assays*

Alat ukur : *Elisa reader*

Alat dan Bahan

- | | |
|--|----------------------|
| 1. <i>Reaction Buffer Concentrate</i> | : 30 mL |
| 2. <i>Desiccated NADH</i> | : <i>Lyophilized</i> |
| 3. <i>Desiccated Nitrat Reductase</i> | : <i>Lyophilized</i> |
| 4. <i>Nitrate Reductase Storage Buffer</i> | : 4 mL |
| 5. <i>Nitrate Standard</i> | : 0,5 mL |
| 6. <i>Nitrite Standard</i> | : 0,5 mL |
| 7. <i>Griess Reagent I</i> | : 12 mL |
| 8. <i>Griess Reagent II</i> | : 12 mL |
| 9. <i>Microtiter Plate</i> | : 2 buah |
| 10. <i>Plate Sealer</i> | : 2 buah |

Persiapan Umum

- Serum diencerkan 1:1-2 dengan cara menambahkan 50 µL serum dengan 100 µL *reaction buffer*.
- Selain nitrat reduktase, semua reagen disiapkan pada suhu kamar 30 menit sebelum dibuka.
- Letakkan nitrat reduktase pada suhu 0° C sebelum digunakan.

Persiapan Reagen

- **Reaction buffer**
Reaction buffer diencerkan dengan cara menambahkan 10 mL *reaction buffer* dengan 90 mL aquades sehingga menjadi 100 mL.
- **Reagen NADH**
Tambahkan 1 mL aquades ke dalam 1 vial NADH, kemudian tunggu selama 30 menit. Vortex sebelum digunakan dan simpan dalam es.
Final NADH Dilution dibuat dengan cara menambahkan 0,9 mL NADH dengan 1,8 mL aquades, kemudian vortex dan simpan dalam es.

• **Nitrat Reduktase Final Enzim Dilusi**

Enzim Dilusi I

Rekonstitusi nitrat reduktase dengan 1 mL nitrat redutase *storage buffer*, selanjutnya vortex dan diamkan pada suhu kamar selama 15 menit. Ulangi sebanyak dua kali lagi dan simpan dalam es.

Final Enzim Dilusi

Hitung volume enzim dilusi I dengan cara
(jumlah total sampel + 7 standar + 2) x 10 µL

Hitung volume *reaction buffer* dengan cara
(volume enzim dilusi I) x 1,5 µL

Campurkan kedua volume yang sudah dihitung, kemudian vortex dan simpan dalam es sebelum digunakan dalam waktu 15 menit.

- **Standar Nitrit**

Siapkan 7 buah tabung reaksi ukuran 12x75 mm dan beri label 1-7. Tambahkan 0,9 mL *reaction buffer* ke dalam tabung 1, selanjutnya tambahkan 0,5 mL *reaction buffer* ke dalam tabung 2-7. Tambahkan 100 μL nitrit standar ke dalam tabung 1.

Lakukan penipisan dengan cara ambil 500 μL isi tabung 1 lalu masukan ke dalam tabung 2 dan vortex. Selanjutnya ambil 500 μL isi tabung 2 lalu masukan ke dalam tabung 3 dan vortex. Demikian seterusnya sampai tabung 7. Konsentrasi akhir dalam tabung 1-7 yaitu 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 $\mu\text{mol/L}$.

- **Standar Nitrat**

Siapkan 6 buah tabung reaksi ukuran 12x75 mm dan beri label 1-6. Tambahkan 0,9 mL *reaction buffer* ke dalam tabung 1, selanjutnya tambahkan 0,5 mL *reaction buffer* ke dalam tabung 2-7. Tambahkan 100 μL nitrat standar ke dalam tabung 1.

Lakukan penipisan dengan cara ambil 500 μL isi tabung 1 lalu masukan ke dalam tabung 2 dan vortex. Selanjutnya ambil 500 μL isi tabung 2 lalu masukan ke dalam tabung 3 dan vortex. Demikian seterusnya sampai tabung 6. Konsentrasi akhir dalam tabung 1-6 yaitu 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 $\mu\text{mol/L}$.

Prosedur Kerja

Pengukuran Kadar Nitrit

- Tentukan jumlah sumur yang akan digunakan sebagai blangko, standar nol, standar nitrit dan sampel.
- Pipet 200 μL *reaction buffer* sebagai blangko pada sumur 1.
- Tambahkan 50 μL *reaction buffer* sebagai standar nol pada sumur 2.
- Tambahkan 50 μL standar nitrit sumur 3-9.
- Tambahkan 50 μL sampel pada sumur berikutnya sesuai jumlahnya.
- Tambahkan 50 μL *reaction buffer* pada sumur standar nol, standar nitrit dan sampel.
- Tambahkan 50 μL *Griess Reagent I* pada semua sumur, kecuali pada blangko.
- Tambahkan 50 μL *Griess Reagent II* pada semua sumur, kecuali pada blangko.
- Campurkan dengan cara digoyang perlahan-lahan.
- Inkubasi selama 10 menit pada suhu kamar.
- Baca absorbansi pada *elisa reader* pada panjang gelombang 520-560 nm.

Pengukuran Kadar Nitrat

- Tentukan jumlah sumur yang akan digunakan sebagai blangko, standar nol, standar nitrat dan sampel.
- Pipet 200 μL *reaction buffer* sebagai blangko pada sumur 1.
- Tambahkan 50 μL *reaction buffer* sebagai standar nol pada sumur 2.
- Tambahkan 50 μL standar nitrat sumur 3-8.
- Tambahkan 50 μL sampel pada sumur berikutnya sesuai jumlahnya.

- Tambahkan 25 μL NADH pada semua sumur standar nol, standar nitrat dan sampel.
- Tambahkan 25 μL nitrat reduktase final enzim dilusi pada semua sumur standar nol, standar nitrat dan sampel.
- Campurkan dengan cara digoyang perlahan-lahan.
- Inkubasi selama 30 menit pada suhu 37° C.
- Tambahkan 50 μL *Griess Reagent I* pada semua sumur, kecuali pada blanko.
- Tambahkan 50 μL *Griess Reagent II* pada semua sumur, kecuali pada blanko.
- Campurkan dengan cara digoyang perlahan-lahan.
- Inkubasi selama 10 menit pada suhu kamar.
- Baca absorbansi pada *elisa reader* pada panjang gelombang 520-560 nm.

Perhitungan

Kadar Nitrit Serum

- Hitung panjang gelombang (A) akhir dengan cara
 $A \text{ akhir} = A \text{ (sampel dan standar nitrit)} - A \text{ standar nol}$.
- Konversi pada kurva standar nitrit.
- Hitung kadar nitrit serum berdasarkan kurva standar nitrit.

Kadar Nitrat Serum

- Hitung panjang gelombang (A) akhir dengan cara
 $A \text{ akhir} = A \text{ (sampel dan standar nitrat)} - A \text{ standar blanko}$.
- Konversi pada kurva standar nitrat.
- Hitung kadar nitrat serum berdasarkan kurva standar nitrat.

Kadar NO_x Serum

- = Kadar nitrit serum + kadar nitrat serum

Perhitungan kadar nitrit dan nitrat serum pada sampel dapat dikalikan dengan faktor pengenceran serum pada saat persiapan.

LAMPIRAN 12.

Prosedur Randomisasi Blok

Kelompok perlakuan : A
 Kelompok kontrol : B
 Besar sampel : 34 orang
 Jumlah subyek tiap blok : 4 orang

1. Nama subyek berdasarkan daftar absensi diblok masing-masing untuk setiap 4 orang.
2. Jumlah kemungkinan kombinasi daftar blok

$$\frac{4!}{(4/2!) (4/2!)} = \frac{4 \times 3 \times 2 \times 1}{(2 \times 1) (2 \times 1)} = 6$$

Enam variasi blok yaitu

(1) AABB (3) BBAA (5) ABBA
 (2) ABAB (4) BABA (6) BAAB

3. Dengan mata tertutup secara acak ditunjuk satu titik pada tabel angka random.
4. Didapatkan angka 4 sebagai nomor pertama, kemudian dicatat nomor bilangan mulai dari tempat yang ditunjuk diteruskan ke bilangan berikut di bagian bawahnya. (mis. 4, 2, 5, 1, 1, 3, 2, 2, 6 dst)
5. Kemudian ganti nomor bilangan tersebut sesuai letak nomor tersebut di dalam kombinasi daftar blok seperti di bawah ini.

(4)	(2)	(5)	(1)	(1)
BABA	ABAB	ABBA	AABB	AABB
(3)	(2)	(2)	(6)	dst.
BBAA	ABAB	ABAB	BAAB	

6. Sekuen kode kelompok diurutkan berdasarkan urutan blok berdasarkan daftar absensi mahasiswa. Selanjutnya dimasukkan dalam amplop tertutup dan diserahkan kepada subyek.

No. Amplop	Subyek	No. Amplop	Subyek
1.	B	11.	B
2.	A	12.	A
3.	B	13.	A
4.	A	14.	A
5.	A	15.	B
6.	B	16.	B
7.	A	17.	A
8.	B	18.	A
9.	A	19.	B
10.	B	20.	B, dan seterusnya

LAMPIRAN 13**Prosedur Pembuatan Jus Bayam**

Prosedur pembuatan jus bayam adalah sebagai berikut

1. Daun bayam hijau dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel.
2. Blender disiapkan kemudian ditambahkan dengan 200 mL air aqua.
3. 100 gram daun bayam hijau yang telah dicuci dimasukkan ke dalam blender perlahan-lahan.
4. Blender dihidupkan dengan kecepatan 35.000 rpm sampai seluruh daun bayam hancur.
5. Setelah selesai blender dimatikan dan jus bayam dituangkan ke dalam gelas plastik bersih sekali pakai.
6. Selanjutnya ditambahkan satu sachet pemanis tanpa kalori (Sukralosa 1,5 gram) dan diaduk merata.
7. Didapatkan volume jus bayam keseluruhan mencapai 220 mL dan mengandung 20 kkal.

LAMPIRAN 14.

Contoh Menu Diet Seimbang Sehari

Dalam Satuan Penukar

Waktu	Bahan Makanan	Menu 1	Menu 2	Energi (kkal)		
				1700	1900	2100
07.00	Karbohidrat	Mie goreng	Roti panggang	1	1 ½	1 ½
	Hewani	Telur rebus	Telur dadar	1	1	1
	Nabati			½	½	1
	Sayur	Sawi hijau	Selada	S	S	S
	Minyak			1	2	2
10.00	Buah	Melon	Pepaya	1	1	1
13.00	Karbohidrat	Nasi	Nasi	2	2	2
	Hewani	Ayam goreng	Ikan goreng	1	1	1
	Nabati	Tahu bacem	Tempe bacem	1	1	1
	Sayur	Sayur buncis	Sayur urap	S	S	S
	Minyak			2	2	2
16.00	Roti	Kue basah	Kue kering	-	-	1
	Buah	Nenas	Apel	1	1	1
19.00	Karbohidrat	Nasi	Nasi	2	2	2
	Hewani	Tempe bacem	Ayam bakar	1	1	1
	Nabati	Perkedel	Tahu isi	1	1	1
	Sayur	Sayur bening	Sayur terong	S	S	S
	Minyak			2	2	2

Keterangan :

- Komposisi diet seimbang : karbohidrat 60%, lemak 25%, protein 15% dari kalori total.
- Dinyatakan dalam porsi; S : sekehendak.
- Jumlah penukar setiap waktu makan dapat disesuaikan dengan kebiasaan makan individu, tanpa mengubah jumlah penukar total sehari.
- Konsumsi natrium \leq 2400 mg/hari, tidak merokok, dan minum alkohol.

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Nama : I Wayan Gede Sutadarma

Tempat/tanggal lahir : Klungkung, 16 Desember 1980

Agama : Hindu

Status perkawinan : Menikah

Nama Istri : Ni Made Ayu Arisanthi

Nama Anak : I Putu Gede Ranesa Arisuta

Riwayat Pendidikan :

- Lulus Sekolah Dasar Negeri 5 Padang Sambian Klod Denpasar tahun 1992
- Lulus Sekolah Menengah Pertama Negeri 2 Denpasar tahun 1995
- Lulus Sekolah Menengah Atas Negeri 1 Denpasar tahun 1998
- Lulus Fakultas Kedokteran Universitas Udayana tahun 2005

Riwayat Pekerjaan :

- Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Udayana tahun 2006 sampai sekarang.

Organisasi :

- Anggota Ikatan Dokter Indonesia
- Anggota Muda Perhimpunan Dokter Gizi Medik Indonesia