

**PENGARUH TERAPI SARI TEMPE KEDELAI
HITAM (*Glycine max (L.) Merr.*) HASIL FERMENTASI
Rhizopus oligosporus TERHADAP AKTIVITAS
GGT (GAMMA-GLUTAMYL TRANSFERASE)
DAN SOD (SUPEROXIDE DISMUTASE)
PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*)
MODEL FIBROSIS HEPAR**

SKRIPSI

Oleh:

HANA RAZANAH

135130101111066



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2017

**PENGARUH TERAPI SARI TEMPE KEDELAI
HITAM (*Glycine max (L.) Merr.*) HASIL FERMENTASI
Rhizopus oligosporus TERHADAP AKTIVITAS
GGT (GAMMA-GLUTAMYL TRANSFERASE)
DAN SOD (SUPEROXIDE DISMUTASE)
PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*)
MODEL FIBROSIS HEPAR**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
HANA RAZANAH
135130101111066



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2017**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**PENGARUH TERAPI SARI TEMPE KEDELAI HITAM (*Glycine max* (L.)
Merr.) HASIL FERMENTASI *Rhizopus oligosporus* TERHADAP
AKTIVITAS GGT (GAMMA-GLUTAMYL TRANSFERASE)
DAN SOD (SUPEROXIDE DISMUTASE) PADA
TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL
FIBROSIS HEPAR**

Oleh:

**HANA RAZANAH
NIM. 135130101111066**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 14 Agustus 2017
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 198802 2 001

drh. Dyah Ayu Oktavianie A. P., M.Biotech

NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**

NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Hana Razanah

NIM : 135130101111066

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Pengaruh Terapi Sari Tempe Kedelai Hitam (*Glycine max* (L.) Merr.) Hasil Fermentasi *Rhizopus oligosporus* Terhadap Aktivitas GGT (*Gamma-Glutamyl Transferase*) Dan SOD (*Superoxide Dismutase*) Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Fibrosis Hepar

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, makasaya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang,

Yang menyatakan,

Hana Razanah

NIM. 135130101111066

**PENGARUH TERAPI SARI TEMPE KEDELAI HITAM (*Glycine max* (L.)
Merr.) HASIL FERMENTASI *Rhizopus oligosporus* TERHADAP
AKTIVITAS GGT (GAMMA-GLUTAMYL TRANSFERASE)
DAN SOD (SUPEROXIDE DISMUTASE) PADA
TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL
FIBROSIS HEPAR**

ABSTRAK

Fibrosis hepar merupakan akumulasi protein matriks ekstraseluler akibat respon penyakit hepar kronis. Senyawa CCl₄ menimbulkan stress oksidatif pada hepar, dan berujung pada fibrosis hepar. Kedelai hitam (*Glycine max* (L.) Merr.) memiliki kandungan isoflavon paling tinggi dibandingkan kedelai lainnya. Kedelai hitam yang terfermentasi oleh *Rhizopus oligosporus* akan menghasilkan isoflavon lebih tinggi karena reaksi metabolisme secara anaerob jamur *Rhizopus oligosporus* serta menghasilkan enzim fibrinolitik yang dapat menghidrolisis substrat fibrin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh terapi sari tempe kedelai hitam terhadap aktivitas GGT dan SOD pada tikus model fibrosis hepar hasil induksi CCl₄. Penelitian ini menggunakan lima kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif yang diinduksi CCl₄ 20% dua kali perminggu selama dua minggu dan induksi CCl₄ 25% dua kali perminggu selama empat minggu sebanyak 0,2 mL/100gBB, kelompok terapi 1, 2, 3 dengan sari tempe kedelai hitam dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kgBB sebanyak 2 mL. Parameter yang diamati adalah aktivitas GGT dan SOD menggunakan metode spektrofotometer dan dianalisis secara statistik kuantitatif. Hasil penelitian menunjukkan terapi sari tempe kedelai hitam secara signifikan mampu menurunkan aktivitas GGT dan SOD. Dosis 800 mg/kgBB merupakan dosis efektif yang dapat menurunkan GGT dan meningkatkan SOD sebesar 58,4% dan 28,8% berturut-turut. Kesimpulan dari penelitian ini adalah terapi sari tempe kedelai hitam dapat menurunkan aktivitas GGT dan meningkatkan aktivitas SOD, sehingga dapat digunakan sebagai terapi alternatif fibrosis hepar.

Kata kunci: Tempe kedelai hitam (*Glycine max* (L.) Merr.), Fermentasi *Rhizopus oligosporus*, fibrosis hepar, aktivitas GGT, aktivitas SOD.

**THE THERAPY EFFECT OF BLACK SOYBEAN (*Glycine max (L.) Merr.*)
EXTRACT FERMENTED FROM *Rhizopus oligosporus* TOWARDS GGT
(GAMMA-GLUTAMYL TRANSFERASE) AND SOD (SUPEROXIDE
DISMUTASE) ACTIVITIES IN HEPATIC FIBROSIS
RATS (*Rattus norvegicus*)**

ABSTRACT

Hepatic fibrosis is an accumulation of extracellular matrix protein due to response of chronic liver disease. CCl₄ compound induce oxidative stress and lead to fibrotic liver. Black soybean (*Glycine max (L.) Merr.*) has the highest isoflavone content than other types of soy. Fermented black soybean derived from *Rhizopus oligosporus* will generate higher isoflavone due to anaerobic metabolic reaction and produce fibrinolytic enzyme that can hydrolyze fibrin substrate. This research was aimed to determine the effect of fermented black soybean extract on GGT and SOD activity in rats (*Rattus norvegicus*) hepatic fibrosis induced by CCl₄. This research using 5 control group: negative control group, positive control group induced by CCl₄ 20% twice weekly for 2 weeks then CCl₄ 25% twice weekly for 4 weeks with 0.2 mL/100gBW volume, and therapy group number 1, 2 and 3 with given fermented black soybean extract dose 200 mg/kgBW, 400 mg/kgBW, 800 mg/kgBW with 2 mL of volume per-orally. Measurement of GGT and SOD activities were conducted using spectrophotometer methods and analyzed statistically quantitative. The result showed that fermented black soybean significantly ($p < 0.05$) decrease GGT and SOD activity. Dose of 800 mg/kgBW are the effective dose for decreasing GGT and increasing SOD with level of 58,4% and 28,8% respectively. It can be concluded that fermented black soybean extract can reduce GGT activity and increase SOD activity and can be used as alternative therapy for hepatic fibrosis.

Keywords: Fermented black soybean (*Glycine max (L.) Merr.*), *Rhizopus oligosporus*, fibrotic liver, GGT activity, SOD activity.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT atas segala rahmat dan nikmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Pengaruh Terapi Sari Tempe Kedelai Hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) Hasil Fermentasi *Rhizopus oligosporus* Terhadap Aktivitas GGT (*Gamma-Glutamyl Transferase*) dan SOD (*Superoxide Dismutase*) Pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Model Fibrosis Hepar**”. Penelitian ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan, Program Studi Pendidikan Dokter Hewan, Universitas Brawijaya.

Dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati, penulis mengucapkan terima kasih kepada segenap pihak yang secara langsung maupun tidak langsung yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini. Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih khususnya kepada:

1. Prof. Dr. Drh. Aulanni'am, DES, selaku Pembimbing I dan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan atas segala bantuan, bimbingan, kesabaran, nasihat, waktu dan arahan yang diberikan tiada hentinya kepada penulis.
2. drh. Dyah Ayu Oktavianie Ardhiana Pratama, M.Biotech selaku Pembimbing II dan Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas segala bantuan, bimbingan, kesabaran, nasihat, waktu dan arahan yang diberikan tiada hentinya kepada penulis.
3. drh. Indah Amalia Amri, M.Si dan drh. Yudit Oktanella, M.Si sebagai dosen penguji yang telah meluangkan waktu serta memberikan masukan dan saran yang membangun.
4. drh. Wawid Purwatiningsih, M. Vet selaku dosen penguji pengganti yang telah meluangkan waktu serta memberikan masukan dan saran yang membangun.
5. Bapak dan Ibu serta Adik tercinta yang terus memberikan doa, motivasi, kasih sayang serta materi kepada penulis.
6. Venna Oktavia Anggraini, Bella Kusuma Dewi, dan Eki Bahtiar selaku anggota kelompok penelitian yang telah berjuang bersama.

7. Okky Elga, Latiffatul 'Ainiyah, Rizka Utami, Dicky Yoga, Lalita Permatasari, Vashti Rahma, Ajeng Sukma, Devi Intan, dan Arenda Daila, terimakasih atas segala dukungan, bantuan dan doa yang tidak akan terlupakan kepada penulis.
8. Anggota tim SHIPONEL, SALIFA dan STARTEC yang telah memberikan pengalaman berharga kepada penulis.
9. Teman-teman Dexa serta Keluarga Cemara yang mengisi hari-hari penulis dengan keceriaan,
10. Teman-teman Micronium 2012-2014 yang tidak pernah lelah untuk meluangkan waktu di laboratorium.
11. Teman-teman seperjuangan Kolega FKH UB angkatan 2013, dan kakak-kakak tingkat yang selalu memberikan bantuan tenaga dan pikiran.
12. Semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan proposal ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini penulis merasa masih banyak kekurangan pada teknis penulisan maupun materi, mengingat akan kemampuan yang dimiliki penulis. Skripsi ini masih jauh dari kata sempurna sehingga diharapkan dapat memberikan masukan dari berbagai pihak untuk penulisan yang lebih baik. Semoga tugas akhir ini dapat memberikan manfaat karena pengalaman adalah guru terbaik.

Malang, 14 Agustus 2017

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	ii
ABSTRAK	i
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Hepar	6
2.1.1 Anatomi Hepar	6
2.1.2 Fisiologi Hepar	7
2.2 Fibrosis Hepar	8
2.3 Senyawa <i>Carbon Tetrachloride</i> (CCl ₄)	10
2.4 Patomekanisme Fibrosis oleh Senyawa CCl ₄	11
2.5 <i>Gamma-glutamyl Transferase</i> (GGT)	13
2.6 <i>Superoxide Dismutase</i> (SOD)	14
2.7 Kedelai Hitam (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.)	16
2.8 Bahan Aktif Sari Tempe Kedelai Hitam (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.) Hasil Fermentasi <i>Rhizopus oligosporus</i>	17
2.8.1 Antioksidan Isoflavon	17
2.8.2 Enzim Fibrinolitik	19
2.9 Hewan Coba Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	20
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN	21
3.1 Kerangka Konsep	21

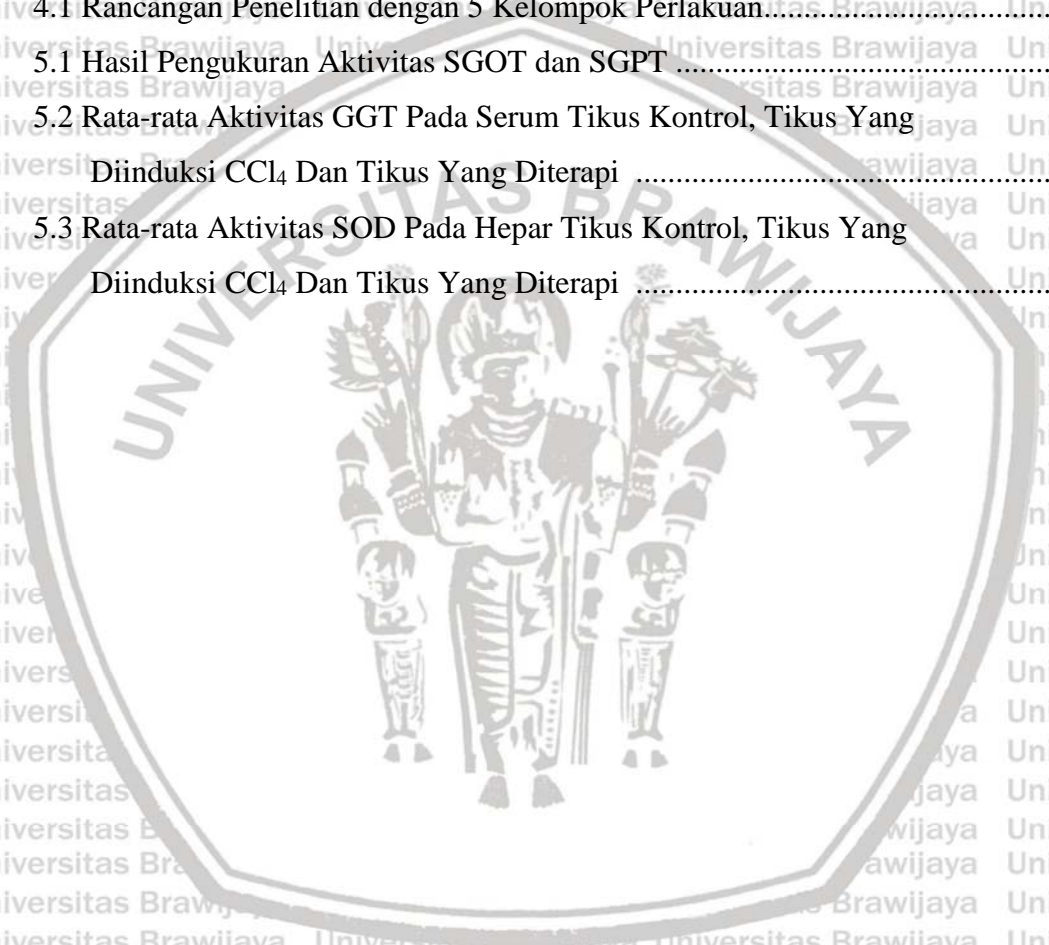


3.2 Hipotesis Penelitian	24
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN	25
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	25
4.2 Alat dan Bahan Penelitian	25
4.2.1 Alat Penelitian	25
4.2.2 Bahan Penelitian	26
4.3 Sampel Penelitian.....	26
4.4 Rancangan Penelitian.....	27
4.5 Variabel Penelitian.....	27
4.6 Prosedur Kerja	28
4.6.1 Persiapan Hewan Coba	28
4.6.2 Pembuatan Hewan Model Fibrosis Hepar	28
4.6.3 Penyiapan Inokulum	28
4.6.4 Pembuatan Media Biji Kedelai Hitam	28
4.6.5 Proses Fermentasi Tempe	29
4.6.6 Pembuatan Sari Tempe Kedelai Hitam (<i>Glycine max (L.)</i> <i>Merr.</i>) Hasil Fermentasi <i>Rhizopus oligosporus</i>	29
4.6.7 Uji Cakram Fibrin	29
4.6.8 Identifikasi Profil Antioksidan dengan LCMS	30
4.6.9 Pemeriksaan Aktivitas SGOT-SGPT Untuk Penentuan Fibrosis Hepar	30
4.6.10 Pemberian Sari Tempe Kedelai Hitam (<i>Glycine max (L.)</i> <i>Merr.</i>) Hasil Fermentasi <i>Rhizopus oligosporus</i> sebagai Terapi	31
4.6.11 Pengambilan Sampel Serum Darah dan Organ Hepar	31
4.6.12 Pengukuran Aktivitas GGT.....	32
4.6.13 Pengukuran Aktivitas SOD.....	32
4.7 Analisa Data	33
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	34
5.1 Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Fibrosis Hepar Hasil Induksi CCl ₄	34
5.2 Pengaruh Sari Tempe Kedelai Hitam (<i>Glycine max (L.) Merr.</i>) Hasil Fermentasi <i>Rhizopus oligosporus</i> Terhadap Penurunan Aktivitas GGT (<i>Gamma-glutamyl Transferase</i>).....	36
5.3 Pengaruh Sari Tempe Kedelai Hitam (<i>Glycine max (L.) Merr.</i>) Hasil Fermentasi <i>Rhizopus oligosporus</i> Terhadap Peningkatan Aktivitas SOD (<i>Superoxide dismutase</i>).....	39
BAB VI PENUTUP	45
6.1 Kesimpulan	45
6.2 Saran	45
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN	51



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Penelitian dengan 5 Kelompok Perlakuan.....	27
5.1 Hasil Pengukuran Aktivitas SGOT dan SGPT	35
5.2 Rata-rata Aktivitas GGT Pada Serum Tikus Kontrol, Tikus Yang Diinduksi CCl ₄ Dan Tikus Yang Diterapi	37
5.3 Rata-rata Aktivitas SOD Pada Hepar Tikus Kontrol, Tikus Yang Diinduksi CCl ₄ Dan Tikus Yang Diterapi	40





DAFTAR GAMBAR

Gambar

Halaman

2.1 Kedelai Hitam

16

3.1 Kerangka Konseptual

21



LEMBAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Laik Etik No. 745-KEP-UB	51
2. Determinasi Kedelai Hitam	52
3. Keterangan Varietas Kedelai Hitam dari Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi	53
4. Kerangka Operasional	54
5. Perhitungan Larutan dan Induksi CCl ₄	55
6. Penyiapan Inokulum	56
7. Pembuatan Media Biji Kedelai Hitam	56
8. Proses Fermentasi Tempe	56
9. Pembuatan Sari Kedelai Hitam (<i>Glycine max (L.) Merr.</i>) Hasil Fermentasi <i>Rhizopus oligosporus</i>	56
10. Uji Cakram Fibrin	57
11. Identifikasi Profil Antioksidan	57
12. Perhitungan Dosis dan Pemberian Sari Tempe Kedelai Hitam	58
13. Pengukuran Aktivitas GGT (<i>gamma-glutamyl transferase</i>)	59
14. Pengukuran Aktivitas SOD (<i>superoxide dismutase</i>)	60
15. Volume Induksi CCl ₄ Pada Hewan Coba	61
16. Hasil LCMS	62
17. Hasil Uji Cakram Fibrin	63
18. Hasil Aktivitas GGT	64
19. Perhitungan Statistik Aktivitas GGT	65
20. Hasil Aktivitas SOD Menggunakan Spektrofotometer	68
21. Perhitungan Statistik Aktivitas SOD	69
22. Dokumentasi	72

DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH

%	: Persen
μl	: Microliter
$^{\circ}$: Derajat
β -glukosidase	: Beta-glukosidase
γ -glutamil	: Gamma-glutamil
H_2O_2	: Hidrogen peroksida
O_2^-	: Anion superoksida
O_2	: Oksigen
b/v	: Berat per volume
ANOVA	: <i>Analysis of variance</i>
BSA	: <i>Bovine Serum Albumin</i>
C	: Celcius
CCl_3^-	: Triklorometri
CCl_3O_2^-	: Triklorometilperoxi
CCl_4	: <i>Carbon tetrachloride</i>
ECM	: <i>Extracellular matrix</i>
EDTA	: <i>Ethylene diamine tetra acetic acid</i>
FNCC	: <i>Food and Nutrition Culture Collection</i>
GGT	: <i>Gamma-glutamyl transferase</i>
GSH	: <i>Glutathione</i>
HSC	: <i>Hepatic stellate cell</i>
L	: Liter
mg/g	: Milligram per gram
mL	: Mililiter
mL/100g BB	: Milliliter per 100 gram berat badan
mL/kgBB	: Milliliter per kilo gram berat badan
mMol	: Milimol
MMP	: <i>Matrix of metalloproteinase</i>
NaCl	: Natrium klorida
NBT	: <i>Nitro blue tetrazolium chloride</i>
nM	: Nanometer
PAI-1	: <i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
PAI-2	: <i>Plasminogen activator inhibitor-2</i>
PUFAs	: <i>Polyunsaturated fatty acid</i>
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
rpm	: <i>Rotation per minutes</i>
SOD	: <i>Superoxide dismutase</i>
TIMP	: <i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
tPA	: <i>Tissue plasminogen activator</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hepar merupakan organ utama dalam mengatur dan menjaga keseimbangan metabolisme tubuh. Hepar berkaitan erat dengan metabolisme nutrisi (protein, karbohidrat, lipid, vitamin, sintesis protein, sekresi empedu) dan detoksifikasi xenobiotik, sehingga hepar rentan terhadap kerusakan (Klaassen, 2008). Kerusakan hepar menyebabkan respon inflamasi serta aktivasi dan proliferasi populasi sel mesenkim di dalam hepar yang akan me-*remodelling extracellular matrix* (ECM) sebagai bagian respon penyembuhan luka. Kerusakan hepar kronis akan menyebabkan akumulasi protein penyebab jaringan parut (fibrosis) secara progresif. Fibrosis hepar dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti virus, bakteri, parasit, fungi, dan obat-obatan serta senyawa toksik (Anom dan Wibawa, 2010).

Senyawa *carbon tetrachloride* (CCl_4) merupakan salah satu senyawa xenobiotik yang sering digunakan untuk membuat hewan model fibrosis. CCl_4 yang masuk kedalam jaringan hepar hewan model akan membentuk CCl_3^- dan CCl_3O_2^- karena proses oksidasi di retikulum endoplasma sel hepatosit oleh sitokrom P-450.

Radikal bebas yang terbentuk akan mengakibatkan perubahan struktur dan fungsi membran sel karena adanya reaksi CCl_3^- dengan asam lemak tak jenuh ganda sehingga menghasilkan peroksidasi lipid (Li *et al.*, 2012). Peroksidasi lipid mengakibatkan rusaknya struktur membran sel hepatosit sehingga membuat enzim GGT yang terikat pada membran sel, terlepas ke lingkungan ekstraseluler, masuk ke sirkulasi dan kehilangan fungsinya dalam mensintesis antioksidan intraseluler yang

menyebabkan sel semakin sulit bertahan dari serangan radikal bebas (Emdin *et al.*, 2015).

Kemajuan teknologi kesehatan memang sangat signifikan, namun belum ada pengobatan untuk fibrosis hepar yang efektif. Hubscher (2006) menyatakan terdapat tahap kerusakan hepar yang berkaitan dengan peluang pemulihan hepar yaitu *fatty liver* dengan peluang pemulihan sebesar 50%-90%, *liver fibrosis* peluang pemulihan sebesar 20%- 30%, dan *cirrhosis* peluang pemulihan sebesar 2%-5%.

Berdasarkan hal tersebut, pengobatan fibrosis hepar masih terbatas efikasi dan sulit dijalankan, sehingga diperlukan adanya pengobatan alternatif sebagai upaya preventif dan atau kuratif penyakit hepar (Lee *et al.*, 2007).

Indonesia memiliki kedelai hitam yang telah menjadi bagian dalam budaya kuliner sejak lama. Kedelai hitam memiliki kandungan antosianin, isoflavon dan zat besi yang lebih tinggi apabila dibandingkan dengan kedelai kuning (Beninger, 2003). Isoflavon dan derivatnya merupakan senyawa yang diketahui berfungsi sebagai antioksidan, antitumor, dan antisteroklerosis (Atun, 2009).

Biji kedelai yang terfermentasi jamur *Rhizopus oligosporus*, seperti tempe menunjukkan kandungan isoflavon dan derivatnya yang lebih tinggi dari pada dalam biji kedelai tanpa fermentasi. Kandungan isoflavon yang lebih tinggi tersebut diakibatkan oleh reaksi metabolisme secara anaerob jamur *Rhizopus oligosporus* yang dapat mengubah senyawa flavonoid menjadi isoflavonoid (Atun, 2009).

Selain kandungan antioksidan, makanan-makanan yang terfermentasi telah diteliti dan terbukti mengandung enzim fibrinolitik yaitu enzim yang mampu

mendegradasi fibrin (Sugiarti, 2015). Hal tersebut menjadikan tempe kedelai hitam berpotensi sebagai kandidat agen fibrinolitik serta sumber antioksidan yang baik.

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, penelitian ini dimaksudkan untuk menghasilkan terapi alternatif fibrosis hepar dengan memanfaatkan tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus*. Uji efek sari tempe kedelai hitam perlu dilakukan untuk membuktikan aktivitas antioksidan dalam upaya mencegah peningkatan aktivitas GGT (*gamma-glutamyl transferase*) dan mencegah penurunan aktivitas SOD (*superoxide dismutase*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model fibrosis hepar yang diinduksi CCl₄.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah terapi sari tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* dapat mempengaruhi aktivitas GGT (*gamma-glutamyl transferase*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model fibrosis hepar yang diinduksi CCl₄?
2. Apakah terapi sari tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* dapat mempengaruhi aktivitas SOD (*superoxide dismutase*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model fibrosis hepar yang diinduksi CCl₄?

1.3 Batasan Masalah

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar umur 2 bulan dengan berat 150-200 gram yang diperoleh dari Unit

Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta. Penggunaan hewan coba telah mendapat sertifikat Laik Etik dari Komisi Etik Penelitian

Universitas Brawijaya nomor 745-KEP-UB (**Lampiran 1**).

2. Biji kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) varietas DETAM-1 yang digunakan berasal dari Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi, Malang (**Lampiran 3**) dan telah mendapat keterangan determinasi dari UPT Materia Medica, Batu (**Lampiran 2**).

3. Proses fermentasi dilakukan dengan *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010 yang diperoleh dari Laboratorium PAU Pangan dan Gizi UGM, Yogyakarta dan diencerkan hingga konsentrasi 10%.

4. Pembuatan sari tempe dilakukan dengan menghaluskan tempe kedelai hitam dengan aquadest yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.

5. Induksi fibrosis hepar dilakukan dengan pemberian CCl_4 konsentrasi 20% secara intraperitoneal dengan volume 0,2 mL/100g BB tiap dua kali per minggu selama dua minggu. Kemudian, dua kali per minggu selama empat minggu selanjutnya digunakan induksi CCl_4 konsentrasi 25% menggunakan volume 0,2 mL/100g BB (Costandinou, *et al.*, 2005).

6. Terapi sari tempe kedelai hitam diberikan pada hewan coba dengan dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kgBB diberikan secara per-oral sebanyak 2 mL setiap hari satu kali selama 14 hari.

7. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah aktivitas GGT (*gamma-glutamyl transferase*) dan SOD (*superoxide dismutase*) menggunakan spektrofotometer.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh terapi sari tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* terhadap aktivitas GGT (*gamma-glutamyl transferase*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model fibrosis hepar yang diinduksi CCl₄.
2. Mengetahui pengaruh terapi sari tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* terhadap aktivitas SOD (*superoxide dismutase*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model fibrosis hepar yang diinduksi CCl₄.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi media informasi dalam kajian ilmiah tentang manfaat dari sari tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus*. Adanya penelitian ini dapat mengetahui potensi sari tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* sebagai terapi fibrosis hepar terhadap aktivitas GGT dan SOD pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi CCl₄.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hepar

2.1.1 Anatomi Hepar

Hepar merupakan salah satu organ terbesar dalam tubuh yang terletak dibagian teratas dalam cavum abdomen di sebelah kanan dibawah diafragma, hepar secara luas dilindungi oleh costae. Pada kondisi hidup, hepar berwarna merah tua karena kaya akan persediaan darah (Pearce, 2006). Hepar terbagi atas 4 lobus, yaitu lobus kanan, kiri, kuadratus, dan kaudatus, yang dipisahkan oleh ligamentum fasciformis. Seluruh permukaan hepar dilapisi oleh kapsul Glisson, jaringan ikat pada irregular yang melekat longgar pada seluruh permukaan hepar, kecuali pada area porta hepatica (Gartner and Hiatt, 2001).

Hepar memiliki suplai darah ganda, yang berasal dari vena porta hepatica (75%) dan arteri hepatica dekster dan sinister (25%) (Gartner and Hiatt, 2001). Arteri hepatica keluar dari aorta dan memberi 1/5 darah pada hepar, darah dengan kejenuhan 95-100% masuk ke hepar dan keluar sebagai vena hepatica. Sedangkan, percabangan vena porta terbentuk dari lienalis dan vena mesenterika superior yang mampu menghantarkan 4/5 darahnya ke hepar, darah membawa zat makanan ke hepar yang telah diabsorpsi oleh mukosa usus halus. Cabang vena porta dan arteri hepatica membentuk saluran porta (Pearce, 2006).

Hepar menerima suplai darah dari arteri hepatica dan vena porta, kemudian darah mengalir melalui perifer lobulus ke ruang kapiler yang

disebut sinusoid. Sinusoid bagian dalam dilapisi sel kupffer sebagai penghancur sel darah merah dan bakteri yang lewat. Dua pertiga penyusun organ hepar adalah parenkim yang mengandung sel hepar (hepatosit). Hepatosit tersusun di antara sinusoid, sehingga masing-masing tepi lateral hepatosit menghadap genangan darah sinusoid. Vena sentralis disemua lobulus hepar menyatu membentuk vena hepatica yang mengalirkan darah dari hepar menuju organ di luar hepar (Sherwood, 2009).

2.1.2 Fisiologi Hepar

Hepar adalah organ sentral dalam tubuh dan penting untuk pertahanan tubuh, baik berupa perlindungan, detoksifikasi maupun metabolisme. Hepar merupakan organ pertama yang menghadapi proses pencernaan nutrisi, vitamin, logam, obat-obatan, dan bahan toksik dari lingkungan yang masuk ke dalam vena porta. Kerusakan pada hepar menyebabkan terganggunya metabolisme di dalam tubuh, sehingga terjadilah gangguan homeostasis (Klaassen, 2008).

Organ hepar merupakan jalur utama proses sintesis, metabolisme, dan ekskresi bahan-bahan kimia yang masuk ke dalam tubuh (Klaassen, 2008). Hepar sangat efisien sebagai organ penyerap bahan-bahan dari darah untuk proses katabolisme, penyimpanan, dan sekresi. Menurut Sherwood (2009) hepar juga melakukan berbagai fungsi yang tidak berkaitan dengan pencernaan, diantaranya:

1. Memproses secara metabolis tiga kategori utama nutrien (karbohidrat, protein, dan lemak) setelah zat-zat tersebut diserap oleh saluran cerna.

2. Detoksifikasi atau menguraikan zat sisa tubuh dan hormon serta obat dan senyawa asing.
3. Membentuk protein plasma, termasuk protein yang dibutuhkan untuk pembekuan darah, pengangkut hormon (steroid dan tiroid) serta kolesterol dalam darah.
4. Menyimpan glikogen, lemak, besi, tembaga, dan berbagai vitamin.
5. Mengaktifkan vitamin D yang dilakukan oleh hepar bersama ginjal.
6. Mengeluarkan bakteri dan sel darah merah tua yang sudah tua.
7. Mengekskresikan kolesterol dan bilirubin, bilirubin merupakan produk penguraian yang berasal dari destruksi sel darah merah yang sudah tua.

2.2 Fibrosis Hepar

Fibrosis hepar merupakan akumulasi protein *extracellular matrix* (ECM), termasuk tumbuhnya kolagen yang terjadi pada sebagian besar jenis penyakit hepar kronis dan merupakan respon penyembuhan luka yang *reversible* (Anom dan Wibawa, 2010). Akumulasi ECM berdampak pada perubahan struktur jaringan hepar serta disfungsi sel hepar. Inflamasi merupakan tanda klinis yang tampak sebagai respon terhadap penyakit hepar kronis (Rockey, 2006). Penyalahgunaan alkohol, virus (Hepatitis B Virus dan Hepatitis C Virus), obesitas, autoimun hepatitis, penyakit parasit, gangguan metabolisme, penyakit empedu, paparan toksik secara terus-menerus dan obat-obatan yang dapat menginduksi penyakit hepar kronis merupakan penyebab paling umum dari fibrosis hepar (Mormone *et al.*, 2011).

Patogenesis fibrosis hepar merupakan proses yang sangat kompleks, dimulai dengan aktivasi HSC (*hepatic stellate cell*) yang meliputi 3 fase yaitu inisiasi, pengekatan dan resolusi sampai terjadinya akumulasi jaringan ikat. Patogenesis fibrosis hepar melibatkan HSC sebagai sel utama, sel kupffer, leukosit, berbagai mediator, sitokin, *growth factor* dan inhibitor, serta berbagai jenis kolagen (Friedman *et al.*, 2007).

Setelah terjadi cedera hepar akut, sel parenkim hepar beregenerasi dan menggantikan sel yang nekrosis atau apoptosis. Proses ini berkaitan dengan respon inflamasi dan deposisi terbatas pada protein ECM. Jika cedera hepar menetap, regenerasi hepar gagal dan hepatosit disubstitusi dengan protein ECM, termasuk kolagen fibrillar (Walace *et al.*, 2008). Fibrosis hepar berkaitan dengan gangguan utama pada kuantitas dan komposisi ECM. Pada tahap lanjut, hepar mengandung sekitar 6 kali lebih banyak ECM daripada hepar normal, meliputi kolagen tipe I, kolagen tipe III, kolagen tipe IV, fibronektin, undulin, elastin, laminin, hyaluronan dan proteoglikan. Akumulasi ECM terjadi akibat peningkatan sintesis dan pengurangan degradasi. Penurunan aktivitas *matrix of metalloproteinase* (MMP) dalam menghilangkan ECM terutama akibat inhibitor spesifik MMP yang berlebihan, yaitu *tissue inhibitor of metalloproteinase* (TIMP) (Friedman *et al.*, 2007).

Hepatic stellate cell (HSC) adalah sel penghasil ECM utama pada hepar yang cedera. Pada hepar normal, HSC terdapat pada *space of disse* dan merupakan lokasi utama penyimpanan vitamin A. Apabila hepar mengalami cedera kronis, HSC akan teraktivasi menjadi sel seperti miofibroblas. *Hepatic stellate cell* teraktivasi

kemudian bermigrasi dan berakumulasi pada lokasi perbaikan jaringan, mensekresi sejumlah besar ECM dan meregulasi degradasi ECM (Wallace *et al.*, 2008).

Sel hepatosit merupakan target untuk kebanyakan agen yang hepatotoksik, terutama hepatitis virus, metabolik alkohol dan asam empedu. Sel hepatosit yang rusak akan melepaskan ROS (*Reactive Oxygen Spesies*) dan mediator fibrogenik dan menginduksi perekrutan sel darah putih oleh sel inflamasi. Apoptosis dari sel hepatosit yang rusak akan menstimulasi aktivitas fibrogenik dari miofibroblas hepar. Sel inflamasi, baik limfosit maupun sel polimorfonuklear, mengaktifasi HSC untuk mensekresikan kolagen. HSC teraktivasi mensekresikan kemokin inflamasi, mengekspresikan molekul adhesi sel dan memodulasi aktivasi limfosit sehingga sel inflamasi dan fibrogenik menstimulasi satu sama lain sehingga perubahan komposisi ECM dapat secara langsung menstimulasi fibrogenesis (Ramon dan Daud, 2005).

2.3 Senyawa *Carbon Tetrachloride* (CCl₄)

Senyawa CCl₄ digunakan untuk menginduksi hewan sebagai model jejas hepar karena kerusakan oleh CCl₄ dianggap sebagai analog kerusakan hepar yang disebabkan oleh berbagai hepatotoksin pada manusia. Senyawa CCl₄ berupa zat cair yang tidak berwarna, tidak mudah terbakar, dan berbau manis. Senyawa CCl₄ bersifat lipofilik sehingga CCl₄ dapat diserap kulit, saluran pencernaan serta paru-paru, meskipun tingkat penyerapan setiap rute berbeda (Zhen, 2003).

Senyawa CCl₄ merupakan salah satu zat hepatotoksik yang dapat menghasilkan radikal bebas yang dapat tertimbun dalam lemak tubuh, hepar, dan

sumsum tulang belakang. Senyawa CCl_4 menyebabkan kerusakan hepar melalui reaksi stress oksidatif dan mekanisme biokimia (Krisnansari dkk., 2014). Senyawa CCl_4 merupakan senyawa tetrahedral yang terbukti hepatoksik dan dapat menimbulkan kerusakan pada sel-sel hepar. Senyawa CCl_4 dapat menimbulkan stress oksidatif pada hepar karena dapat menjadi radikal triklorometil ($\text{CCl}_3\cdot$) sehingga CCl_4 merupakan representatif zat racun yang dapat menyebabkan terjadinya perlemakan hepar (steatosis), fibrosis hepar hingga sirosis hepar (Weber *et al.*, 2003).

2.4 Patomekanisme Fibrosis oleh Senyawa CCl_4

Senyawa CCl_4 akan dimetabolisme oleh sitokrom P450 2E1 (CYP 2E1) di dalam retikulum endoplasmik hepar menjadi triklorometil ($\text{CCl}_3\cdot$). Triklorometil akan bereaksi dengan beberapa molekul biologis yang penting, seperti asam lemak, protein, lipid, asam nukleat dan asam amino (Jeon *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2003).

Triklorometil dengan oksigen akan membentuk radikal triklorometilperoksi ($\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$) yang dapat menyerang membran lipid dari retikulum endoplasma dengan kecepatan yang melebihi radikal bebas triklorometil (Zhen, 2003).

Triklorometilperoksi lebih aktif melepaskan hidrogen dari asam lemak rantai panjang tak jenuh (PUFAs) yang menyebabkan peroksidasi lipid dan terjadi kerusakan pada membran lipid dan protein serta menyebabkan penurunan antioksidan (Gutteridge dan Halliwell, 2007).

Asam lemak penyusun membran sel khususnya PUFAs amat rentan terhadap radikal bebas. Jumlah PUFAs dalam fosfolipid membran retikulum endoplasma

akan berkurang sebanding dengan jumlah CCl_4 yang diinduksikan. Pemberian CCl_4 dalam dosis tinggi dapat merusak retikulum endoplasma, mengakumulasi lipid, mengurangi sintesis protein, mengacaukan proses oksidasi, menurunkan bobot badan, menyebabkan pembengkakan hepar sehingga bobot hepar menjadi bertambah, dan pemberian jangka panjang dapat menyebabkan nekrosis sentrilobular serta degenerasi lemak di hepar (Jeon *et al.*, 2003).

Induksi CCl_4 ke dalam tubuh hewan coba menyebabkan terjadinya reaksi inflamasi dan stress oksidatif yang selanjutnya akan mempengaruhi keadaan hepar normal. Sebagai respon dari penyakit hepar yang sedang berlangsung, terjadi peningkatan total kolagen dan komponen non-kolagen pada ECM. Pada jaringan sub-endotelial terjadi perubahan komposisi dasar, dari membran dengan densitas rendah menjadi matriks interstitial. Perubahan ini menyebabkan hilangnya microvilli pada sel hepatosit dan hilangnya fenestra pada lapisan endotel. Peningkatan matriks interstitial pada lapisan sub-endotelial merupakan faktor yang mengaktivasi HSC (Rockey, 2006).

Kerusakan hepar akibat induksi CCl_4 dapat mengakibatkan penurunan aktivitas SOD yang berperan dalam melakukan pembersihan “scavenge” pada anion superoksida dan mengubahnya menjadi hidrogen peroksida serta menghilangkan toksisitas radikal bebas. Aktivitas SOD (*superoxide dismutase*) menurun karena tidak mampu mengimbangi peningkatan peroksidasi lemak dan peningkatan ROS akibat pemberian CCl_4 . Peningkatan ROS dalam jaringan berbanding lurus dengan stress oksidatif dan aktivitas SOD dalam jaringan (Widyaningsih, dkk., 2016). Kerusakan pada membran plasma, membran organel

dan kematian sel dapat menyebabkan terlepasnya GGT yang terikat pada membran ke sirkulasi sistemik (Haurissa, 2014).

2.5 *Gamma-Glutamyl Transferase (GGT)*

Gamma-glutamyl transferase atau *gamma-glutamyl transpeptidase* adalah ikatan membran glikoprotein yang mengkatalis perpindahan gamma-glutamil menjadi peptida lain, asam amino dan air. GGT dapat ditemukan di sel hepatosit, sel epitel empedu, tubulus renalis, pankreas dan intestinal. GGT merupakan enzim mikrosomal yang aktivitasnya dapat dipicu oleh obat-obatan antikonvulsan. GGT yang meningkat dapat ditemukan pada penyakit non-hepatik termasuk obstruksi pulmo kronis, dan gagal ginjal. Peningkatan aktivitas GGT pasien gangguan hepar kronis disebabkan karena kerusakan empedu dan fibrosis (Giannini, 2005).

Pemeriksaan aktivitas serum enzim GGT dalam klinis digunakan untuk berbagai tujuan yaitu diagnosa hepatitis kronis, kolestasis, deteksi kelainan hepar dini, deteksi kelainan hepar karena alkohol dan deteksi kelainan hepar degeneratif. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemeriksaan enzim GGT tidak spesifik untuk membedakan jenis-jenis penyakit hepatic, namun pemeriksaan GGT mempunyai kelebihan berupa sensitivitas yang lebih baik daripada enzim penanda fungsi hepar lainnya (Whitfield, 2001). GGT merupakan marker yang lebih spesifik terhadap kolestasis daripada *alkaline phosphatase*. GGT akan meningkat ketika terjadi kelainan hepar subklinis dan bertindak sebagai marker pengganti kelainan hepar karena alkohol (Levison dan Ried, 2008).

GGT adalah salah satu enzim dalam serum yang berperan pada proses degradasi ekstraseluler *glutathione* (GSH) (Emdin *et al.*, 2005). GSH, SOD dan katalase adalah antioksidan utama pada mamalia yang berperan penting dalam perlindungan sel dari oksidan. Level intraseluler GSH dipelihara oleh serangkaian enzim sintesis yang mengatur produksi tripeptida tersebut. GSH memiliki konsentrasi intraseluler yang relatif tinggi, GSH diangkut keluar dari sel-sel ke lingkungan ekstraseluler untuk perlindungan radikal bebas ekstraseluler. Ketika lingkungan intraseluler membutuhkan suplai GSH dari ekstraseluler, hanya ada sedikit atau bahkan tidak ada serapan GSH yang utuh untuk masuk ke dalam sel.

GSH ekstraseluler kemudian akan dimetabolisme oleh GGT dengan menghilangkan kelompok γ -glutamil dari GSH dan mengakibatkan *cysteinylglycine* dapat dipecah oleh membran dipeptidase. Sistein yang ada kemudian diangkut ke dalam sel dan digunakan sebagai substrat untuk sintesis *de novo* GSH (Karp *et al.*, 2001).

2.6 Superoxide Dismutase (SOD)

Antioksidan adalah suatu substansi yang dapat menghentikan atau menghambat kerusakan oksidatif (Suarsana dkk., 2013). Antioksidan merupakan senyawa yang memiliki struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas. Antioksidan dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas sehingga dapat melindungi sel dari efek bahaya radikal bebas oksigen reaktif (Kumalaningsih, 2006).

Tubuh memiliki mekanisme sistem pertahanan alami berupa antioksidan endogen yang berfungsi menetralkan dan mempercepat degradasi senyawa radikal bebas untuk mencegah kerusakan komponen makromolekul. Sistem ini dibagi dalam dua kelompok besar, yaitu: sistem pertahanan preventif seperti *superoxide dismutase* (SOD), glutation (GSH) dan katalase serta sistem pertahanan melalui pemutusan reaksi radikal bebas seperti penambahan isoflavon, vitamin A, vitamin C, dan vitamin E ke dalam tubuh (Suarsana dkk., 2013).

Enzim SOD, GSH dan katalase termasuk enzim antioksidan intrasel yang diproduksi dalam tubuh yang berfungsi penting bagi tubuh untuk meredam radikal bebas sehingga dapat mencegah kerusakan sel. SOD sebagai salah satu enzim antioksidan intrasel bekerja dengan cara membersihkan radikal bebas atau *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) dengan reaksi enzimatik dan mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil. SOD merupakan salah satu antioksidan endogen yang berfungsi mengkatalisis reaksi dismutasi radikal bebas anion superoksida (O_2^-) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan molekul oksigen (O_2) (Suarsana dkk., 2013). Pada mamalia terdapat 2 bentuk SOD yaitu:

- a. CuZn-SOD yang berada di dalam sitoplasma; dan
- b. Mn-SOD yang terdapat di dalam matriks mitokondria.

2.7 Kedelai Hitam (*Glycine max* (L.) Merr.)

Kedelai hitam merupakan tanaman asli Asia tropis di Asia Tenggara.

Tanaman ini telah menyebar ke Jepang, Korea, Asia Tenggara dan Indonesia.

Kedelai hitam adalah salah satu varietas dari kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.)

Kedelai hitam banyak mengandung isoflavon, asam amino esensial, vitamin E serta anthosianin dan merupakan sumber serat yang baik (Anderson *et al.*, 2009).



Gambar 2.1 Kedelai Hitam

Menurut Rukmana dan Yuniarsih (1996), taksonomi kedelai adalah sebagai

berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Sub-divisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledonae</i>
Ordo	: <i>Polypetales</i>
Famili	: <i>Leguminosae (Papilionaceae)</i>
Sub-famili	: <i>Papilionoideae</i>
Genus	: <i>Glycine</i>
Spesies	: <i>Glycine max</i> (L.), Merr

Pemanfaatan kedelai hitam kurang mendapat perhatian dan tidak sepopuler kedelai kuning. Kurangnya pemanfaatan kedelai hitam karena warna kedelai hitam yang kurang menarik. Pemanfaatannya selama ini, sebatas hanya sebagai bahan baku kecap padahal kedelai hitam mengandung isoflavon dan antosianin yang berfungsi sebagai antioksidan bagi tubuh (Utaminingrum, 2011). Antioksidan isoflavon dalam kedelai terdapat dalam empat bentuk, yaitu bentuk malonil-glikosida, asetil-glikosida, glikosida, dan aglikon (bebas). Di antara keempat bentuk isoflavon, aktivitas antioksidatif tertinggi ditunjukkan oleh isoflavon aglikon, terutama genistein (Purwoko, 2004).

Kedelai hitam sendiri menempati daftar teratas dengan aktivitas antioksidan tertinggi, dibandingkan jenis kedelai lainnya (kedelai merah, coklat, kuning dan putih) (Beninger, 2003). Kedelai hitam memiliki kandungan genistein dengan kadar $0,65 \pm 0,07$ mg/g yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan kadar genistein kedelai kuning yaitu $0,40 \pm 0,01$ mg/g (Nurrahman, 2015). Genistein merupakan *phytoestrogen* yang mempunyai sifat estrogenik, antiestrogenik, antikarsinogenik, antifungal dan antioksidan (Fitzpatrick, 2003).

2.8 Bahan Aktif Sari Tempe Kedelai Hitam (*Glycine max* (L.) Merr.) Hasil

Fermentasi *Rhizopus oligosporus*

2.8.1 Antioksidan Isoflavon

Tempe adalah salah satu pangan fermentasi berbasis protein yang pada umumnya menggunakan bahan kedelai atau bahan lainnya dan dilakukan fermentasi menggunakan campuran kultur yaitu ragi yang merupakan kumpulan spora kapang *Rhizopus sp.* Pada tempe dapat ditemukan golongan

mikroorganisme yang berbeda seperti jamur, yeast, bakteri asam laktat dan bakteri gram negatif lainnya (Babu, *et al.*, 2009). Dalam sepotong tempe, terkandung berbagai unsur yang bermanfaat, seperti protein, lemak, hidrat arang, serat, vitamin, enzim, daidzein, genestein serta komponen antibakteri dan zat antioksidan yang berkhasiat sebagai obat, diantaranya genestein, daidzein, fitosterol, asam fitat, asam fenolat, lesitin dan inhibitor protease (Cahyadi, 2006).

Pembuatan tempe terdiri dari 2 tahap, yaitu perendaman dan fermentasi.

Pada tahap perendaman, kedelai direndam dalam air agar pelepasan kulit tipis kedelai lebih mudah sehingga jamur dapat memfermentasi kedelai tanpa kulit.

Proses fermentasi yang terjadi pada tempe berfungsi untuk mengubah senyawa makromolekul kompleks yang terdapat pada kedelai (seperti protein, lemak, dan karbohidrat) menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti peptida, asam amino, asam lemak dan monosakarida. Pada kedua tahap tersebut, proses hidrolisis isoflavon glikosida menjadi isoflavon aglikon berlangsung. Isoflavon aglikon dihasilkan dari aktivitas enzim β -glukosidase mikroba yang hidup di sekitar kedelai (Purwoko, 2004). Ketika proses fermentasi, enzim β -glucosidase mengkatalisis hidrolisis ikatan glikosida di gugus *alkyl* dan *aryl β -D-glucosides* serta glikosida yang hanya mengandung residu karbohidrat (Vattern dan Shetty, 2003). Menurut Lee *et al.*, (2008), total kandungan fenolik dan antosianin serta aktivitas antioksidan dari kedelai hitam meningkat setelah difermentasi oleh jamur *filamentous*.

Tempe merupakan olahan kedelai dengan fermentasi jamur *Rhizopus*.

Jamur kapang yang sering digunakan dalam pembuatan tempe, adalah *Rhizopus microsporus* dan *Rhizopus oryzae*. Kedua jamur tersebut mempunyai aktivitas enzim β -glukosidase yang berbeda. Hidrolisis dengan asam atau enzim β -glukosidase dapat mengubah isoflavon glikosida menjadi isoflavon aglikon dan glukosa (Purwoko dkk., 2001). Isoflavon yang ada pada tempe telah banyak diteliti karena potensinya dalam pencegahan penuaan dini sel dan penyakit degeneratif. Potensi ini disebabkan karena kemampuannya sebagai antioksidan, yaitu sebagai pemecah radikal bebas (*free radical scavenging*) (Suarsana, dkk., 2013).

2.8.2 Enzim Fibrinolitik

Enzim fibrinolitik adalah agen yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi benang-benang fibrin. Secara normal, terdapat tiga enzim yang bertugas untuk mendegradasi fibrin, yaitu urokinase, streptokinase dan *tissue plasminogen activator* (tPA). Namun, pemberian terapi untuk mendegrasi fibrin termasuk mahal dan memiliki efek samping terhadap tubuh. Penelitian saat ini menemukan bahwa enzim fibrinolitik dapat ditemukan pada makanan yang terfermentasi seperti tempe (Mine *et al.*, 2004).

Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) meregulasi aktivitas t-PA, sedangkan *plasminogen activator inhibitor-2* (PAI-2) meregulasi urokinase yang berada di ekstra vaskular. t-Pa dan urokinase merupakan activator dari plasminogen. Plasminogen dalam bentuk aktif akan berubah menjadi plasmin.

Plasmin bertugas untuk mendegradasi fibrin menjadi *fibrinogen degradation product*. Fibrin terbentuk dari pemecahan fibrinogen oleh thrombin. Fibrin merupakan struktur yang menjaga jaringan yang terluka dari kondisi pendarahan, ketika sudah terjadi regenerasi pada dinding pembuluh darah maka fibrin harus didegradasi untuk mengembalikan aliran darah normal. Enzim fibrinolitik dari makanan yang terfermentasi mampu meningkatkan kerja t-PA dan membantu plasmin dalam proses degradasi fibrin (Mine *et al.*, 2004).

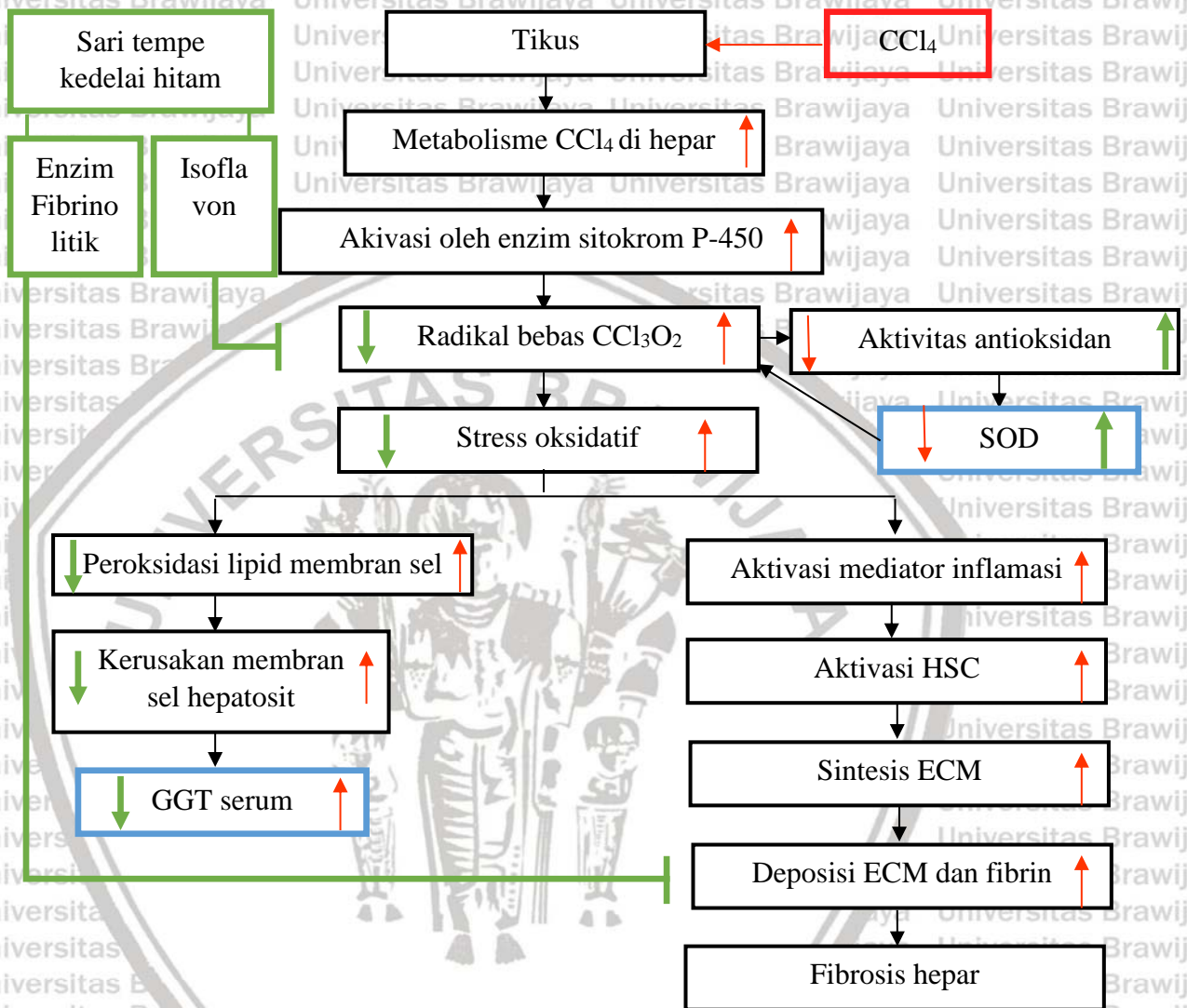
2.9 Hewan Coba Tikus Model (*Rattus norvegicus*)

Tikus *Rattus norvegicus* merupakan hewan yang umum digunakan dalam penelitian, karena mudah dipelihara, secara garis besar fungsi dan bentuk organ serta proses biokimia antara tikus dan manusia memiliki banyak kesamaan (Suckow *et al.*, 2006). Tikus *Rattus norvegicus* memiliki waktu hidup 2,5-3,5 tahun, berat badan jantan 300-500 gram dan betina 250-300 gram, denyut jantung 330-480 kali per menit, frekuensi respirasi 85 kali per menit dan memasuki masa dewasa pada usia 40-60 hari. Klasifikasi tikus yang digunakan dalam penelitian menurut Armitage (2004), adalah sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Animalia</i>
Kelas	: <i>Mamalia</i>
Ordo	: <i>Rodentia</i>
Famili	: <i>Muridae</i>
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka konseptual

Keterangan:

- ↑ = Pengaruh induksi CCl₄
- ↓ = Perlakuan
- ↑ = Pengaruh sari tempe kedelai hitam
- ↓ = Penghambatan oleh sari tempe kedelai hitam
- = Parameter yang diamati

Induksi CCl_4 pada hewan coba dapat mengakibatkan kerusakan hepar karena merupakan salah satu sumber radikal bebas. CCl_4 akan mengalami reaksi oksidasi yang dikatalisis oleh sitokrom P-450 di retikulum endoplasma menjadi triklorometilperoksi ($\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$) dan menjadi sumber radikal bebas dalam hepar. Produksi radikal bebas yang meningkat di dalam tubuh melebihi jumlah antioksidan endogen akan menimbulkan terjadinya stress oksidatif dan mengakibatkan kerusakan sel.

Triklorometilperoksi dapat menyebabkan abnormalitas fungsi protein, peroksidasi lipid, kerusakan mitokondria dan nukleus. Peroksidasi lipid akibat stress oksidatif akan memicu perubahan struktur dari membran sel hepatosit, dapat menonaktifkan ikatan membran dengan reseptor atau enzim yang dapat mengganggu fungsi normal sel. Ketika sel hepatosit dirusak oleh radikal bebas, GGT yang terikat ke membran akan dilepas menuju sirkulasi tubuh sehingga menyebabkan kenaikan aktivitas GGT dalam serum.

Tingginya radikal bebas dalam sirkulasi akan mengakibatkan penurunan aktivitas enzim SOD di hepar. SOD merupakan salah satu antioksidan endogen. SOD akan menurun karena tingginya radikal bebas tanpa adanya asupan antioksidan eksogen. SOD bertugas untuk melindungi HSC dari cedera yang disebabkan paparan CCl_4 dan fibrosis dengan menurunkan stress oksidatif.

Stress oksidatif juga memicu terjadinya aktivasi sel inflamasi, sehingga mengakibatkan pelepasan mediator inflamasi. Produksi mediator inflamasi yang berlebihan akan menyebabkan kerusakan struktur dan membran sel hepar, jika

struktur dari membran sel rusak maka sel stelata hepatosit yang teraktivasi akan mensekresikan kemokin inflamasi, mengekspresikan molekul adhesi sel dan memodulasi aktivasi limfosit sehingga sel inflamasi dan fibrogenik menstimulasi satu sama lain yang dapat memicu perubahan komposisi ECM dan membentuk jaringan ikat.

Kerusakan hepar akibat radikal bebas dalam tubuh dapat diperbaiki oleh antioksidan. Sari tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* sebagai terapi fibrosis hepar memiliki kandungan antioksidan berupa isoflavon. Isoflavon dapat membantu kerja SOD dalam memusahkan radikal bebas.

Isoflavon bekerja dengan cara menyumbangkan satu atom hidrogen kepada senyawa radikal sehingga senyawa radikal berubah menjadi senyawa tidak radikal atau senyawa yang tidak berbahaya bagi sel. Oleh karena itu, isoflavon dapat membantu kerja SOD sehingga aktivitas SOD di dalam sel hepatosit dapat dipertahankan. SOD yang mulai meningkat akan memperbaiki kerusakan pada membran sel hepatosit, sehingga aktivitas GGT dalam serum yang dilepas ke sirkulasi tubuh akan menurun.

Kandungan yang terdapat ekstrak tempe kedelai hitam selain isoflavon adalah adanya enzim fibrinolitik. Makanan-makanan yang terfermentasi akan menghasilkan produk fibrinolitik yang tergolong dalam protease serin yang dikenal memiliki kemampuan untuk mendegradasi benang-benang fibrin. Sehingga akumulasi dari ECM hepar dapat di degradasi oleh enzim fibrinolitik.

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut:

1. Terapi sari tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) hasil fermentasi

Rhizopus oligosporus dapat menurunkan aktivitas GGT (*gamma-glutamyl transferase*) tikus (*Rattus norvegicus*) model fibrosis hepar yang diinduksi CCl₄.

2. Terapi sari tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) hasil fermentasi

Rhizopus oligosporus dapat meningkatkan aktivitas SOD (*superoxide dismutase*) tikus (*Rattus norvegicus*) model fibrosis hepar yang diinduksi CCl₄.



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan April hingga Juni 2017. Pelaksanaan penelitian terdiri atas tahapan pembuatan tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* sampai dengan pembuatan sari yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya. Tahapan *freeze drying* dan uji cakram fibrin dilakukan di Laboratorium Fitokimia dan Farmakognosi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga. Tahapan pengujian LCMS dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar, Fakultas Teknik, Politeknik Negeri Malang. Tahapan perawatan, perlakuan dan pembedahan hewan coba yang dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Tahapan pemeriksaan SOD dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Molekuler, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Tahapan pemeriksaan GGT dilaksanakan di Laboratorium Pattimura Malang.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah inkubator, tabung falcon, sentrifugator, *vortex mixer*, panci, cawan petri, blender, kertas saring, *freeze dryer*, jangka sorong, refrigerator, erlenmeyer, gelas ukur, pipet, *disposable syringe*, pot, kandang tikus, *dissecting set*, alumunium foil,

vacutainer, *microtube*, spektrofotometer UV-Vis, *Automatic Analyzer Hitachi*

902.

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*), *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010, NaCl 0,9%, aquadest, CCl₄, *olive oil*, *fibrin bovine blood*, dapar phospat pH 7,8, agarosa, asetonitril, ammonia format, *phospat buffer saline*, EDTA, xantin 10 mM, *bovine serum albumin* (BSA) 0,5%, NBT 2,5 mM, xantin oksidase, reagen GGT (Dyasis®).

4.3 Sampel Penelitian

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar umur 2 bulan dengan berat 150-200 gram (Costandinou *et al.*, 2005). Hewan coba diadaptasikan selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasar rumus (Kusriningrum, 2008):

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

t: jumlah kelompok perlakuan

n: jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan diatas, maka untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 4 kali dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

4.4 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan *post-test control design only*. Rancangan penelitian ditunjukkan **Tabel 4.1**.

Tabel 4.1 Rancangan penelitian dengan 5 kelompok perlakuan:

Kelompok	Keterangan Perlakuan
Kelompok negatif	Tikus tidak diberikan sari tempe kedelai hitam (<i>Glycine max (L.) Merr.</i>) hasil fermentasi <i>Rhizopus oligosporus</i> dan tidak induksi CCl ₄ .
Kelompok positif	Tikus diinduksi CCl ₄ 20% secara intraperitoneal dengan volume 0,2 mL/100gBB tiap dua kali perminggu selama dua minggu, kemudian diinduksi CCl ₄ 25% secara intraperitoneal volume 0,2 mL/100gBB tiap dua kali perminggu selama empat minggu untuk pembuatan hewan model fibrosis hepar
Kelompok terapi 1	Tikus model fibrosis hepar dengan terapi sari tempe kedelai hitam masing-masing sebanyak 200 mg/kgBB diberikan secara per-oral sebanyak 2 mL setiap hari satu kali selama 14 hari
Kelompok terapi 2	Tikus model fibrosis hepar dengan terapi sari tempe kedelai hitam masing-masing sebanyak 400 mg/kgBB diberikan secara per-oral sebanyak 2 mL setiap hari satu kali selama 14 hari
Kelompok terapi 3	Tikus fibrosis hepar dengan terapi sari tempe kedelai hitam masing-masing sebanyak 800 mg/kgBB selama diberikan secara per-oral sebanyak 2 mL setiap hari satu kali selama 14 hari

4.5 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

- Variabel bebas : Dosis sari tempe biji kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* dan dosis induksi CCl₄.
- Variabel tergantung : Aktivitas GGT dan SOD.
- Variabel kendali : Tikus, jenis kelamin, berat badan, umur, pakan dan kondisi pemeliharaan.

4.6 Prosedur Kerja

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba pada semua kelompok perlakuan dikandangkan secara terpisah dan diadaptasikan selama lebih kurang 7 hari. Selama penelitian tikus diberikan pakan dan minum secara *ad libitum*.

4.6.2 Pembuatan Hewan Model Fibrosis Hepar

Induksi fibrosis hepar dilakukan dengan pemberian CCl_4 yang dilarutkan dengan *olive oil*. CCl_4 20% diberikan secara intraperitoneal dengan volume 0,2 mL/100g BB tiap dua kali per minggu selama dua minggu.

Kemudian, dua kali per minggu selama empat minggu selanjutnya dilakukan induksi CCl_4 25% secara intraperitoneal menggunakan volume 0,2 mL/100g BB (Costandinou *et al.*, 2005). Perhitungan dosis CCl_4 20% dan 25% dapat dilihat di **Lampiran 5**.

4.6.3 Penyiapan Inokulum

Dilakukan pembuatan suspensi spora *Rhizopus oligosporus* dengan cara menambahkan 10 mL NaCl 0,9% steril ke dalam tabung inokulum yang telah diinkubasi selama 72 jam, divortex sampai spora jamur terlepas dari mediana (± 15 menit) (Poernomo, dkk. 2015).

4.6.4 Pembuatan Media Biji Kedelai Hitam

Sebanyak 500 gram masing-masing biji kedelai hitam dicuci dengan aquadest, kemudian direbus selama 15 menit. Setelah dicuci, dilakukan pengelupasan dan dipotong menjadi ukuran yang lebih kecil, direndam dalam aquadest (1:3, b/v) selama 24 jam. Setelah perendaman 24 jam, dicuci dan

direbus kembali dengan aquadest (1:4, b/v) selama 15 menit dan ditiriskan selama 30 menit (Poernomo, dkk. 2015).

4.6.5 Proses Fermentasi Tempe

Fermentasi biji kedelai hitam oleh *Rhizopus oligosporus* dilakukan dalam cawan petri steril. Tiap cawan berisi 100 gram biji dan difermentasi dengan 10 mL suspensi spora dan dicampur sampai homogen. Seluruh cawan petri dimasukkan inkubator pada suhu $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 43 jam (Poernomo, dkk. 2015).

4.6.6 Pembuatan Sari Tempe Kedelai Hitam (*Glycine max (L.) Merr.*)

Hasil Fermentasi *Rhizopus oligosporus*

Pembuatan sari dilakukan dengan menghaluskan sebanyak 500 gram tempe kedelai hitam di-blender dengan 1 L larutan aquadest untuk menghasilkan bubur encer. Bubur encer selanjutnya disaring menggunakan kertas saring hingga diperoleh ampas dan filtrat berupa sari tempe. Filtrat yang diperoleh dikeringkan dengan proses *freeze drying* pada suhu -15° (Poernomo, dkk. 2015).

4.6.7 Uji Cakram Fibrin

Fibrin bovine blood sebanyak 0,3% dalam 100 mL dapar borat pH 7,8 dicampur dengan agarosa sebanyak 1,7%, kemudian dipanaskan. Dalam keadaan masih panas, dituang media *fibrin plate* sebanyak 20 mL ke dalam cawan petri. Ditambahkan *methylen blue* sebanyak 400 μL pada plate agar zona jernih fibrinolitik terlihat dengan jelas. Setelah beberapa menit media akan memadat, dibuat lima lubang dan diinokulasikan sari tempe sebanyak 60 μL .

Seluruh cawan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 jam dan aktivitas fibrinolitik dapat diukur. Pengukuran indeks fibrinolitik dilakukan dengan menghitung diameter zona jernih dibagi dengan diameter inokulasi menggunakan jangka sorong. Zona jernih transparan mengindikasikan hasil degradasi fibrin dan diameter zona sebanding dengan potensi aktivitas fibrinolitik (Poernomo, dkk. 2015).

4.6.8 Identifikasi Profil Antioksidan dengan LCMS

Uji LC-MS dengan hasil saringan tempe kedelai hitam sebanyak $100\ \mu\text{L}$ ditambah dengan larutan asetonitril hingga $1000\ \mu\text{L}$ kemudian ditambah dengan larutan ammonia format $20\ \text{mMol}$ sebanyak $500\ \mu\text{L}$. Tahap selanjutnya adalah filterisasi dan dimasukkan ke dalam botol vial. Sampel di injeksikan ke dalam alat LC-MS yang terdiri dari fase gerak larutan A ($0,1\%$ asam format dalam H_2O) dan larutan B ($0,1\%$ asam format dalam asetonitril), dan fase diam atau kolom Hypersilgold. Laju alir fase gerak $300\ \mu\text{L}/\text{min}$ (Firmansyah, dkk. 2015).

4.6.9 Pemeriksaan Aktivitas SGOT-SGPT Untuk Penentuan Fibrosis Hepar

Pemeriksaan keberhasilan pembuatan hewan model fibrosis hepar dengan induksi CCl_4 dilakukan dengan mengukur aktivitas SGPT dan SGOT secara berkala selama masa induksi 6 minggu. Pemeriksaan dilakukan pada kelompok kontrol positif pada waktu sebelum induksi CCl_4 , setelah induksi CCl_4 20% selama 2 minggu, setelah induksi CCl_4 25% selama 2 minggu pertama, dan setelah induksi CCl_4 25% selama 2 minggu kedua.

Penetapan aktivitas SGOT dan SGPT diawali dengan pengambilan darah melalui *sinus orbitalis* mata, didiamkan selama 30 menit kemudian disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit hingga didapatkan serum. Setelah itu dibaca aktivitas SGOT dan SGPT menggunakan alat spektrofotometer (*Shimadzu UV-1201 V*). Aktivitas SGOT dan SGPT ditetapkan berdasarkan reaksi enzimatik. Serum dicampur dengan *reagent kit* dengan temperatur 25°/30°. Serum diambil sebanyak 200 µl dan *reagent kit* sebanyak 1000 µl. Setelah homogen dibaca absorbansinya pada menit 1, 2, dan 3 menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 334 nm (Pertiwi dan Widyaningsih, 2005).

4.6.10 Pemberian Sari Tempe Kedelai Hitam (*Glycine max (L.) Merr.*)

Hasil Fermentasi *Rhizopus oligosporus* sebagai Terapi

Pemberian terapi sari tempe kedelai hitam diberikan secara peroral. Pemberian terapi sari masing-masing pada kelompok T1 sebesar 200 mg/kgBB selama 2 minggu, kelompok T2 sebesar 400 mg/kgBB selama 2 minggu dan kelompok T3 sebesar 800 mg/kgBB selama 2 minggu (Yusof *et al.*, 2013). Perhitungan dosis dan pengenceran sari dapat dilihat pada **Lampiran 12**.

4.6.11 Pengambilan Sampel Serum Darah dan Organ Hepar

Euthanasi tikus dilakukan dengan dislokasi pada bagian leher, kemudian dilakukan pembedahan. Tikus diposisikan pada posisi rebah dorsal kemudian dilakukan nekropsi. Dibuat insisi pada ventral midline abdomen, kemudian insisi kulit dan subkutan ke arah kranial lalu insisi musculus daerah abdomen kearah kranial. Prosesus xiploideus diangkat kemudian dipotong beserta sternum hingga cavum thoraks terbuka. Sampel darah diambil dengan

menusukkan spuit 3 mL ke atrium kiri jantung. Darah yang didapat dimasukkan kedalam vacutainer *red stopper* dan diposisikan miring 45° lalu dibiarkan mengendap pada suhu kamar. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3500 rpm untuk mendapatkan serum. Selanjutnya serum dikoleksi dan dimasukkan kedalam tabung *microtube* dan disimpan di lemari pendingin.

Organ hepar diisolasi dari cavum abdomen kemudian dicuci dengan NaCl fisiologis 0,9% dan direndam pada larutan *phosfat buffer saline* dengan pH 7,4 dalam pot, diberi label lalu disimpan pada lemari pendingin.

4.6.12 Pengukuran Aktivitas GGT

Pemeriksaan aktivitas GGT diukur dengan menggunakan metode spektrofotometri. Serum dikeluarkan dari lemari pendingin lalu dibiarkan hingga mencapai suhu ruang. Serum diambil 100 μ L serum dan ditambahkan 1000 μ L reagen Gamma-GT dengan menggunakan mikropipet. Selanjutnya dihomogenkan dan didiamkan pada suhu ruang selama satu menit. Sampel dibaca dengan spektrofotometer dengan $\lambda = 405$ nm. Hasil yang diperoleh dinyatakan dalam satuan IU/L (Whitfield, 2001).

4.6.13 Pengukuran Aktivitas SOD

Pemeriksaan aktivitas SOD diukur dengan menggunakan *Shimadzu UV-Visible spectrophotometer* UV-10601. Organ hepar digerus kemudian dilarutkan dalam PBS, kemudian divortex hingga homogen. Diambil *microtube* yang lain kemudian diberi 100 μ L xantin, 100 μ L xantin oksidase, 100 μ L NBT (*Nitroblue tetrazolium*), 1000 μ L *phosfat buffer saline*, 100 μ L

supernatan dari gerusan organ, kemudian divortex hingga homogen.

Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 30 menit pada suhu 30 °C. Selanjutnya

disentrifus pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Prinsip dari

spektrofotometer *UV-Visible* adalah penyerapan cahaya oleh molekul-molekul.

Panjang gelombang bergantung pada kekuatan absorbansi molekul tersebut.

Nilai absorbansi dibaca menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum (580 nM).

4.7 Analisa Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan analisa kuantitatif berupa persentase aktivitas GGT dan SOD yang ditabulasi menggunakan *Microsoft Office Excel* kemudian dianalisa menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) dengan *software IBM SPSS Statistic 24*. Analisa *one-way ANOVA* didahului dengan uji normalitas data, selanjutnya dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui data tersebut memiliki varian yang sama atau tidak.

Apabila data terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan dengan uji *one-way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan rata-rata antar kelompok perlakuan atau perbedaan secara keseluruhan atau kelompok perlakuan. Apabila hasil uji *one-way ANOVA* menunjukkan hasil yang signifikan ($p < 0,05$), maka dapat dilakukan uji lanjutan menggunakan uji *Tukey* (Beda Nyata Jujur) dengan α 5%.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Fibrosis Hepar Hasil Induksi CCl₄

Mekanisme CCl₄ dalam menyebabkan kerusakan hepar adalah melalui metabolisme CCl₄ oleh enzim sitokrom P450 di retikulum endoplasma hepar menjadi senyawa radikal yaitu triklorometil (CCl₃). Triklorometil akan bereaksi dengan oksigen dan menghasilkan radikal bebas triklorometilperoksi (CCl₃O₂).

Triklorometilperoksi dapat berikatan dengan asam lemak tak jenuh dalam membran sel hepatosit yang menyebabkan peroksidasi lipid pada sel-sel hepatosit. Rusaknya sel hepatosit menyebabkan perubahan fungsi transport dan permeabilitas membran sehingga terjadi pelepasan enzim-enzim di hepar menuju sirkulasi darah, salah satunya adalah lepasnya SGOT dan SGPT (Pertiwi dan Widyaningsih, 2005).

SGOT (*Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase*) dan SGPT (*Serum Glutamic Pyruvic Transaminase*) merupakan enzim yang mengkatalis perpindahan kelompok α -amino dari aspartat dan alanin ke kelompok α -keto dari asam ketoglutarat. SGOT dan SGPT dapat ditemukan pada hepar dengan konsentrasi paling tinggi. Selain hepar, SGOT juga dapat ditemukan di jantung, otot skelet, ginjal, otak sedangkan, SGPT juga dapat ditemukan di otot skelet dan ginjal. SGOT dapat ditemukan pada mitokondria dan sitosol di sel hepatosit, sedangkan SGPT hanya terdapat pada mitokondria di sel hepatosit. Peningkatan aktivitas SGOT dan SGPT ke sirkulasi darah menunjukkan adanya kerusakan atau kematian hepatoselular (Giannini *et al.*, 2005). Peningkatan aktivitas SGOT dan SGPT menunjukkan keberhasilan induksi CCl₄ dalam membuat hewan model fibrosis hepar.

Penentuan fibrosis hepar pada hewan coba dapat dilakukan dengan menggunakan rasio De Ritis, yaitu dengan membandingkan aktivitas SGOT:SGPT yang mengalami peningkatan dari angka aktivitas SGOT-SGPT normal. Apabila perbandingan antara SGOT dan SGPT berjumlah 1.5-2.0, maka hewan coba dinyatakan beresiko mengalami fibrosis hepar (Botros *and* Sikaris, 2013). Pengukuran aktivitas SGOT dan SGPT dilakukan sebelum induksi CCl₄, setelah induksi CCl₄ 20% selama 2 minggu, setelah induksi CCl₄ 25% selama 2 minggu pertama, dan setelah induksi CCl₄ 25% selama 2 minggu kedua. Penentuan fibrosis hepar dilakukan dengan menghitung aktivitas SGOT dan SGPT pada kelompok hewan coba yang diberi perlakuan diinduksi dengan CCl₄. Hasil pengukuran aktivitas SGOT dan SGPT terdapat pada **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Hasil Pengukuran Aktivitas SGOT dan SGPT

Tanggal Pemeriksaan	Sampel	Hasil SGOT (U/L)	Hasil SGPT (U/L)	Keterangan Hasil	Rasio De Ritis SGOT:SGPT
Sebelum Induksi	K(+) 1	46	22	Normal	-
	K(+) 2	48	21	Normal	-
	K(+) 3	54	28	Normal	-
	K(+) 4	58	30	Normal	-
Rata-rata		51,25	25,25		
Induksi Minggu ke-2	K(+) 1	216	167	Meningkat	1,293413
	K(+) 2	224	179	Meningkat	1,251397
	K(+) 3	257	185	Meningkat	1,389189
	K(+) 4	137	114	Meningkat	1,201754
Rata-rata		208,50	161,25		
Induksi Minggu ke-4	K(+) 1	237	172	Meningkat	1,377907
	K(+) 2	161	123	Meningkat	1,308943
	K(+) 3	253	169	Meningkat	1,497041
	K(+) 4	306	199	Meningkat	1,537688*
Rata-rata		239,25	165,75		
Induksi Minggu ke-6	K(+) 1	304	191	Meningkat	1,591623*
	K(+) 2	242	158	Meningkat	1,531623*
	K(+) 3	279	184	Meningkat	1,516304*
	K(+) 4	262	173	Meningkat	1,514451*
Rata-rata		271,75	176,50		

Keterangan: Aktivitas SGOT normal tikus yaitu 45.5-80.08 IU/L, sedangkan aktivitas SGPT normal tikus yaitu 16-89 IU/L (Harkness *et al.*, 2010).

*Tikus yang mengalami fibrosis hepar (Rasio De Ritis 1.5-2)

Pada pemeriksaan SGOT:SGPT sebelum induksi, hasil yang diperoleh menunjukkan aktivitas SGOT dan SGPT dalam rentang normal. Pada pemeriksaan SGOT:SGPT setelah induksi CCl₄ 20% selama 2 minggu, hasil yang diperoleh menunjukkan aktivitas SGOT dan SGPT yang meningkat karena induksi CCl₄, aktivitas SGOT:SGPT berada dalam rentang rasio 1,2-1,3. Pada pemeriksaan SGOT:SGPT setelah induksi CCl₄ 25% selama 2 minggu pertama, hasil yang diperoleh menunjukkan aktivitas SGOT dan SGPT yang meningkat karena induksi CCl₄, aktivitas SGOT:SGPT berada dalam rentang rasio 1,3-1,5. Pada pemeriksaan SGOT:SGPT setelah induksi CCl₄ 25% selama 2 minggu kedua, hasil yang diperoleh menunjukkan aktivitas SGOT dan SGPT yang meningkat karena induksi CCl₄, aktivitas SGOT-SGPT seluruh sampel menunjukkan rasio mencapai 1,5. Hewan coba dinyatakan telah mengalami fibrosis hepar pada minggu ke-enam sehingga dapat dilanjutkan dengan perlakuan pemberian sari tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus*.

5.2 Pengaruh Sari Tempe Kedelai Hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) Hasil Fermentasi *Rhizopus oligosporus* Terhadap Penurunan Aktivitas GGT (*Gamma-glutamyl Transferase*)

GGT merupakan enzim utama dalam katabolisme glutation (GSH). Peningkatan aktivitas GGT dikarenakan adanya stress oksidatif dan kerusakan sel. Aktivitas GGT normal pada tikus jantan umur 2-3 bulan yakni berkisar 0-1 U/L (Giknis and Clifford, 2003). Pengukuran aktivitas GGT pada serum tikus model fibrosis hepar yang telah diberi sari tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* ditampilkan pada **Tabel 5.2**.

Tabel 5.2 Rata-rata aktivitas GGT pada serum tikus kontrol, tikus yang diinduksi CCl₄, dan tikus yang diterapi

Perlakuan	Rata-rata Aktivitas GGT (U/L)	Aktivitas GGT (%)	
		Peningkatan Terhadap Kontrol Negatif	Penurunan Terhadap Kontrol Positif
Kontrol Negatif	0,95 ± 0.12 ^a	-	-
Kontrol Positif	2,77 ± 0.09 ^d	65,7%	-
Kelompok Terapi 1 (200 mg/kgBB)	2,17 ± 0.09 ^c	-	21,6%
Kelompok Terapi 2 (400 mg/kgBB)	1,80 ± 0.08 ^b	-	53,8%
Kelompok Terapi 3 (800 mg/kgBB)	1,15 ± 0.05 ^a	-	58,4%

Keterangan: Aktivitas GGT normal pada tikus yaitu 0-1 U/L (Giknis *and* Clifford, 2003). Perbedaan notasi a, b, c, d menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$) antara kelompok perlakuan.

Hasil analisa statistik menggunakan *IBM SPSS Statistic 24* menunjukkan bahwa uji normalitas dan homogenitas memiliki hasil data yang terdistribusi normal dan homogen ($p > 0.05$) sehingga dilanjutkan dengan uji *one way* ANOVA. Uji *one way* ANOVA menunjukkan bahwa sari tempe kedelai hitam dapat menurunkan aktivitas GGT secara signifikan. Pada hasil uji *post-hoc* Tukey menunjukkan bahwa kelompok perlakuan sari tempe kedelai hitam memiliki perbedaan yang nyata karena memiliki notasi yang berbeda. Data pada **Tabel 5.2** menunjukkan bahwa aktivitas GGT pada kelompok terapi dengan dosis 200 mg/kgBB ($2,17 \pm 0.09$ U/L), dosis 400 mg/kgBB ($1,80 \pm 0.08$ U/L) dan dosis 800 mg/kgBB ($1,15 \pm 0.05$ U/L) lebih rendah dari pada kelompok positif ($2,77 \pm 0.09$ U/L). Rata-rata aktivitas GGT pada kelompok terapi dosis 800 mg/kgBB tidak memiliki perbedaan yang nyata ($p > 0.05$) dengan kelompok negatif atau sehat, hal ini dapat diartikan bahwa kelompok terapi 800 mg/kgBB mempunyai respon terhadap radikal bebas yang

hampir sama dengan kelompok negatif, sehingga dosis 800 mg/kgBB adalah dosis efektif dalam menurunkan aktivitas GGT.

Aktivitas GGT pada kelompok positif meningkat sebesar 65,7% terhadap kelompok negatif (**Tabel 5.2**). Peningkatan aktivitas GGT diakibatkan oleh pemberian CCl_4 . CCl_4 yang diinduksikan ke hewan coba memiliki efek toksik karena mengakibatkan peroksidasi lipid pada membran lipid. Peroksidasi lipid diakibatkan oleh radikal bebas $\text{CCl}_3\cdot$ dan $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$. Peroksidasi lipid merusak struktur membran sel hepatosit karena radikal bebas melepaskan hidrogen dari PUFA (Kuzu *et al.*, 2007). Kerusakan membran sel hepatosit sebagai situs terikatnya enzim GGT akan menyebabkan lepasnya ikatan GGT dengan membran dan merilis GGT menuju sirkulasi dan menjadi tidak fungsional. Berkurangnya jumlah GGT fungsional menyebabkan sintesis antioksidan GSH ke dalam sel sehingga sel akan semakin rentan terhadap kerusakan yang diakibatkan radikal bebas (Whitfield, 2001).

Menurut hasil analisa statistik, terdapat peningkatan aktivitas GGT secara signifikan ($p < 0.05$) pada kelompok kontrol positif yang diinduksi dengan CCl_4 dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif atau sehat sebesar 65,7%.

Penurunan secara signifikan terhadap kontrol positif ditunjukkan pada kelompok terapi 1 dengan dosis terapi 200 mg/kgBB sebesar 21,6%. Penurunan secara signifikan terhadap kontrol positif ditunjukkan pada kelompok terapi 2 dengan dosis terapi 400 mg/kgBB sebesar 53,8%. Penurunan secara signifikan terhadap kontrol positif ditunjukkan pada kelompok terapi 3 dengan dosis terapi 800 mg/kgBB sebesar 58,4% yang merupakan hasil terbaik penurunan aktivitas GGT.

Dosis efektif terapi fibrosis hepar oleh sari tempe kedelai hitam adalah terapi dengan dosis 800 mg/kgBB.

Penurunan aktivitas GGT disebabkan oleh adanya kandungan isoflavon dalam sari tempe kedelai hitam yang diberikan (Kuzu *et al.*, 2007). Sari tempe kedelai hitam yang digunakan sebagai terapi telah diidentifikasi kandungan isoflavonnya menggunakan metode LCMS (Lampiran 16). Turunan isoflavon yang berhasil teridentifikasi adalah genistein dan diadzein. Pemberian isoflavon mampu meningkatkan tingkat GSH intraselular. Peningkatan GSH disebabkan kerja dari *c-glutamyl cycteine synthetase* dan *GSH synthetase*. Genistein juga bekerja dengan molekul pertahanan fisiologis untuk melindungi tubuh dari stress oksidatif (Salas *et al.*, 2007).

5.3 Pengaruh Sari Tempe Kedelai Hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) Hasil Fermentasi *Rhizopus oligosporus* Terhadap Peningkatan Aktivitas SOD (*Superoxide Dismutase*)

Superoxide dismutase adalah enzim yang terdapat pada sitoplasma dan mitokondria yang berfungsi sebagai penangkal ROS yang dapat melindungi dari kerusakan sel dan membran (Devasagayam *et al.*, 2004). Pengukuran aktivitas SOD pada organ hepar tikus model fibrosis hepar yang telah diberi sari tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* ditampilkan pada Tabel 5.3.

Tabel 5.3 Rata-rata aktivitas SOD pada hepar tikus kontrol, tikus yang diinduksi CCl₄, dan tikus yang diterapi

Perlakuan	Rata-rata Aktivitas SOD (U/mL)	Aktivitas SOD (%)	
		Penurunan Terhadap Kontrol Negatif	Peningkatan Terhadap Kontrol Positif
Kontrol Negatif	5,98 ± 0,25 ^c	-	-
Kontrol Positif	4,51 ± 0,50 ^a	24,5%	-
Kelompok Terapi 1 (200 mg/kgBB)	4,84 ± 0,27 ^{ab}	-	6,8%
Kelompok Terapi 2 (400 mg/kgBB)	5,56 ± 0,26 ^{bc}	-	18,8%
Kelompok Terapi 3 (800 mg/kgBB)	6,34 ± 0,47 ^c	-	28,8%

Keterangan: Perbedaan notasi a, b, c, menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$) antara kelompok perlakuan. Notasi ab dan bc menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

Hasil analisa statistik menggunakan *IBM SPSS Statistic 24* menunjukkan bahwa uji normalitas dan homogenitas memiliki hasil data yang terdistribusi normal dan homogen ($p > 0.05$) sehingga dilanjutkan dengan uji *one way ANOVA*. Uji *one way ANOVA* menunjukkan bahwa sari tempe kedelai hitam dapat meningkatkan aktivitas SOD secara signifikan. Pada hasil uji *post-hoc* Tukey menunjukkan bahwa kelompok perlakuan sari tempe kedelai hitam memiliki perbedaan yang nyata, kecuali pada kelompok dosis 200 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB karena memiliki notasi yang sama. Data pada **Tabel 5.3** menunjukkan bahwa aktivitas SOD pada kelompok terapi dengan dosis 200 mg/kgBB ($4,84 \pm 0,27$ U/mL), dosis 400 mg/kgBB ($5,56 \pm 0,26$ U/mL) dan dosis 800 mg/kgBB ($6,34 \pm 0,47$ U/mL) lebih tinggi dari pada kelompok positif ($4,51 \pm 0,50$ U/mL). Rata-rata aktivitas SOD pada kelompok terapi dosis 800 mg/kgBB tidak memiliki perbedaan yang nyata ($p > 0.05$) dengan kelompok negatif atau sehat, hal ini dapat diartikan bahwa kelompok terapi 800 mg/kgBB mempunyai respon terhadap radikal bebas yang hampir sama dengan kelompok negatif atau merupakan dosis efektif dalam menurunkan aktivitas SOD.

Aktivitas SOD pada kelompok positif menurun sebesar 24,5% terhadap kelompok negatif (**Tabel 5.3**). Penurunan aktivitas SOD diakibatkan oleh pemberian CCl_4 . CCl_4 merupakan agen toksik yang digunakan untuk membuat kerusakan hepar. CCl_4 dimetabolisme oleh sitokrom P450 menjadi radikal bebas $\text{CCl}_3\cdot$ dan $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$. Radikal bebas tersebut akan mengakibatkan peroksidasi lipid pada membran sel. Radikal peroksidasi lipid, hidroperoksidasi lipid dan produk pemecahan lipid berperan dalam proses oksidasi. Peroksidasi lipid mengakibatkan struktur membran sel dan organel intraseluler rusak. Kerusakan kronis dapat menyebabkan fibrosis (Kuzu *et al.*, 2007).

Radikal bebas dan senyawa oksigen reaktif yang diproduksi dalam jumlah yang normal, penting untuk fungsi biologis, seperti sel darah putih yang menghasilkan H_2O_2 untuk membunuh beberapa jenis bakteri serta pengaturan pertumbuhan sel, namun radikal bebas tidak menyerang sasaran spesifik, sehingga akan menyerang asam lemak tidak jenuh ganda dari membran sel, organel sel, atau DNA, sehingga dapat menyebabkan kerusakan struktur dan fungsi sel. Tubuh dilengkapi oleh seperangkat sistem pertahanan untuk menangkal serangan radikal bebas. Sistem pertahanan antioksidan ini antara lain adalah enzim SOD. SOD bekerja dengan beberapa cara antara lain berinteraksi langsung dengan radikal bebas, oksidan atau oksigen tunggal, mencegah pembentukan senyawa oksigen reaktif atau mengubah senyawa reaktif menjadi kurang reaktif (Winarsi, 2007).

Pada keadaan tertentu, produksi radikal bebas atau ROS melebihi sistem pertahanan tubuh atau yang disebut dengan kondisi stress oksidatif. Ketika terjadi stress oksidatif, keseimbangan antara produksi radikal bebas atau ROS dengan

kemampuan antioksidan alami untuk mengeliminasi mengalami gangguan sehingga terjadi kerusakan jaringan. Kerusakan jaringan dipengaruhi beberapa faktor, antara lain: target molekuler, tingkat stress yang terjadi, mekanisme yang terlibat serta waktu dan sifat alami dari sistem yang diserang (Winarsi, 2007).

Enzim SOD bekerja mengkatalis dismutase anion $O_2^{\bullet-}$ yang merupakan ROS menjadi H_2O_2 dan O_2 didalam mitokondria. H_2O_2 yang terbentuk menyebabkan inaktivasi SOD. Namun, inaktivasi SOD tidak akan terjadi selama jumlah radikal bebas yang ditangani oleh antioksidan eksogen bersifat non-enzimatis. Kerja antara antioksidan tersebut menyebabkan oksidan dalam tubuh dalam dipertahankan konsentrasinya dalam tingkat yang dapat diterima, sehingga tidak menyebabkan kerusakan jaringan (Landis and Tower, 2005).

Menurut hasil analisa statistik, terdapat penurunan aktivitas SOD secara signifikan ($p < 0.05$) pada kelompok kontrol positif yang diinduksi dengan CCl_4 dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif atau sehat sebesar 24,5%.

Peningkatan secara signifikan terhadap kontrol positif ditunjukkan pada kelompok terapi 1 dengan dosis terapi 200 mg/kgBB sebesar 6,8%. Peningkatan secara signifikan terhadap kontrol positif ditunjukkan pada kelompok terapi 2 dengan dosis terapi 400 mg/kgBB sebesar 18,8%. Peningkatan secara signifikan terhadap kontrol positif ditunjukkan pada kelompok terapi 3 dengan dosis terapi 800 mg/kgBB sebesar 28,8% yang merupakan hasil terbaik peningkatan aktivitas SOD.

Peningkatan aktivitas enzim SOD pada kelompok terapi menunjukkan bahwa kandungan antioksidan isoflavon pada sari tempe kedelai hitam yang telah diidentifikasi kandungan isoflavonnya menggunakan metode LCMS (Lampiran

16) mampu meningkatkan aktivitas enzim SOD. Turunan isoflavon yang berhasil teridentifikasi adalah genistein dan diadzein. Isoflavon dalam tempe memiliki kemampuan sebagai antioksidan yaitu sebagai pemusnah radikal bebas (*free radical scavenging*) (Suarsana dkk., 2013). Dosis efektif terapi fibrosis hepar oleh sari tempe kedelai hitam adalah terapi dengan dosis 800 mg/kgBB.

Isoflavon mampu mempertahankan aktivitas SOD diduga karena peran isoflavon genistein dalam menginduksi gen yang bertanggung jawab pada sintesis SOD. Genistein meningkatkan regulasi ekspresi gen antioksidan dengan melibatkan reseptor estrogen, ERK1/2 (*extracellular-signal regulated kinase*), dan NF κ B (*nuclear factor κ B*). Selain itu, isoflavon membantu kerja SOD dalam memusnahkan radikal bebas sebagai antioksidan dengan cara menyumbangkan satu elektronnya kepada senyawa radikal sehingga senyawa radikal berubah menjadi senyawa yang tidak berbahaya bagi sel (Suarsana, dkk., 2013).

Sari tempe kedelai hitam yang digunakan sebagai terapi selain mengandung antioksidan isoflavon, juga mengandung enzim fibrinolitik yang telah diuji menggunakan Uji Cakram Fibrin. Pada hasil uji cakram fibrin, zona jernih yang terbentuk semakin lebar dan jelas menunjukkan bahwa semakin banyak fibrin yang terhidrolisis oleh enzim fibrinolitik dari sari tempe kedelai hitam yang diinokulasikan ke sumuran media agar (**Lampiran 17**). Hal tersebut sesuai dengan Sugimoto *et al.*, (2007), yang menyatakan bahwa tempe memiliki kandungan enzim fibrinolitik. Enzim fibrinolitik adalah salah satu jenis enzim protease yang sering digolongkan sebagai salah satu jenis protease serin yang dikenal memiliki kemampuan untuk mendegradasi benang-benang fibrin (Dewi, 2006).

Enzim fibrinolitik dari tempe akan mendegradasi fibrin melalui mekanisme meningkatkan jumlah t-PA sebagai aktivator dari plasminogen. Plasminogen yang aktif akan berubah menjadi plasmin dan mendegradasi fibrin menjadi *fibrin degradation product* (Mine *et al.*, 2004). Pengaruh enzim fibrinolitik terhadap degradasi fibrin dapat diamati pada gambaran histopatologi hepar dengan pewarnaan *Masson Trichome*, yang menunjukkan persebaran serabut kolagen yang berkurang pada kelompok terapi sari tempe kedelai hitam dengan dosis 800 mg/kggBB dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (Bahtiar, 2017). Hal tersebut mendukung pemberian sari tempe kedelai hitam sebagai agen terapi fibrosis hepar dengan mendegradasi fibrin yang telah terbentuk sehingga kerusakan fungsi hepar karena fibrosis dapat diperbaiki.

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Terapi sari tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* pada tikus model fibrosis hepar hasil induksi CCl₄ dapat menurunkan aktivitas GGT secara signifikan. Dosis 800 mg/kgBB merupakan dosis efektif yang dapat menurunkan aktivitas GGT mendekati kelompok kontrol negatif.
2. Terapi sari tempe kedelai hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* pada tikus model fibrosis hepar hasil induksi CCl₄ dapat meningkatkan aktivitas SOD secara signifikan. Dosis 800 mg/kgBB merupakan dosis efektif yang dapat meningkatkan aktivitas SOD mendekati kelompok kontrol negatif.

6.2 Saran

Untuk penelitian lanjutan sebaiknya dilakukan penelitian tentang:

1. Metode ekstraksi tempe kedelai hitam yang mampu memaksimalkan aktivitas antioksidan serta aktivitas enzim fibrinolitik.
2. Uji toksisitas sari tempe kedelai hitam terhadap tikus (*Rattus novergicus*).

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, J. W., P. Baird, R. H. Davis, S. Ferreri, M. Knudtson, A. Koraym, V. Waters, C. L. Williams. 2009. Health Benefits of Dietary Fiber. *International Life Institute. Nutrition Reviews* Vol. 67 (4): 188-205.
- Anom, T dan D. Wibawa. 2010. Pendekatan Diagnosis dan Terapi Fibrosis Hati. *J Peny. Dalam*, Volume 11 Nomor 1.
- Armitage, D. 2004. *Rattus norvegicus*. Animal Diversity Web Online. at: http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Rattus_norvegicus/. [06 Januari 2017].
- Atun, S. 2009. *Potensi Senyawa Isoflavon Dan Derivatnya Dari Kedelai (Glycine Max. L) Serta Manfaatnya Untuk Kesehatan*. Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan dan Penerapan MIPA. Fakultas MIPA Universitas Negeri Yogyakarta.
- Babu, P. D., R. Bhagyaraj, R. Vidhyalakshmi. 2009. A Low Cost Nutritious Food "Tempeh"-A Review. *World J. Of Diary And Food Science* 4(1):22-27
- Bahtiar, E. 2017. Pengaruh Terapi Sari Tempe Kedelai Hitam (*Glycine max (L.) Merr.*) Hasil Fermentasi *Rhizopus oligosporus* Terhadap Gambaran Histopatologi Dan Ekspresi IL-1 β Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Fibrosis Hepar [Skripsi]. Universitas Brawijaya: Malang.
- Beninger, C. W and L. H. George. 2003. Antioxidant Activity of Extract, Condensed Tannin fraction, and Pure Flavonoids from Ixx *Phaseolus vulgaris* L. Seed Coat Color Genotypes. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7879 – 7883.
- Botros, M. and K. Sikaris. The De Ritis Ratio: The Tesf of Time. *Clin Biochem Rev* Vol 34: 117-130
- Cahyadi, W. 2006. *Kedelai Khasiat dan Teknologi*. Bumi Aksara. Bandung.
- Constandinou, C., N. Henderson, J. P. Iredale. 2005. Modeling Liver Fibrosis in Rodents. *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 117:237-250
- Devasagayam, T. J. Tilak, K. Bloor, K. Sane. 2004. Free radicals and antioxidants in human health. Current status and future prospects. *Journal of Association of Physicians of India* 52, 794-804
- Dewi, W. K. 2006. *Pemurnian dan Pencirian Protease dari Isolat Bakteri W-1 yang Dihasilkan oleh Tauco Hitam* [Skripsi]. Institut Pertanian Bogor: Bogor.
- Emdin, M., A. Pompella, A. Paolicchi. 2005. Gamma-Glutamyltransferase, Atherosclerosis and Cardiovascular Disease. *Circulation*. 112: 2078-2080.
- Firmansyah, R., R. Hakim, D. Damayanti. 2015. Efek Antihipertensi Dekokta Daun Sambung Nyawa (*Gynura procumbens*) Melalui Penghambatan ACE (Studi *In Silico*). *Jurnal Kedokteran Komunitas* Vol 3(1): 200-208



- Fitzpatrick, L. A. 2003. Reprint Of Soy Isoflavones: Hope Or Hype. *Mat.*, 6(1-2): 132-140.
- Friedman, S. L., D. C. Rockey, D. M. Bissell. 2007. Hepatic Fibrosis 2006: Report of The Third AASLD Single Topic Conference. *J Hepatology* 45; 242-249.
- Gartner, L. P and J. L. Hiatt. 2001. *Color Textbook of Histology 2nd Edition*. Philadelphia: W. B. Saunders Company. Hlm. 420-432.
- Giannini, E., R. Testa, V. Savarino. 2005. Liver Enzyme Alteration: A Guide For Clinicians. *CMAJ* 1: 172 (3).
- Giknis, M. A. Clifford. B. Charles. 2006. Clinical Laboratory Parameters for Rats. *Charles River Lab*. Wilmington.
- Gutteridge, J.M.C., and B. Halliwell. 2007, *Free radicals in Biology and Medicine, Third Edition*, New York, Oxford University Press.
- Harkness, J., P. Turner, S. VandeWoude, C. Wheler. 2010. *Harkness and Wargner's Biology and Medicine of Rabbits and Rodents 5th Ed.* Iowa: Blackwell Publishing.
- Haurissa, A. 2014. Gamma-Glutamyltransferase Sebagai Biomarker Resiko Penyakit Kardiovaskuler. *CDK-222* vol. 41(11).
- Hubscher, S. G. 2006. Histological Assessment Of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Histopathology*. 49:450-456.
- Jeon, T. I., S. G. Hwang, N. G. Park, Y. R. Jung, S. I. Shin, S. D. Choi, D. K. Park. 2003. Antioxidative effect of chitosan on chronic carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. *Toxicology*. 187:67-73
- Karp, G. 2001. Flavonoid-Membrane Interactions: A Protective Role of Flavonoids at The Membrane Surface. *Clin. & Dev. Immunol.* 12(1): 19-25
- Klaassen, C. D. 2008. *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. New York: McGraw-Hill. Hlm. 557-562.
- Krisnansari, D., H. Sulistyono, W. Kusdaryanto. 2014. Potensi Hepatoprotektor Propolis Terhadap Hepar Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Yang Diinduksi Karbon Tetrakhlorida. *Jurnal Ners Vol. 9 No. 2: 270-278*
- Kumalaningsih, S. 2006. *Antioksidan Alami*. Trubus Agrisarana: Surabaya.
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Kuzu, N. K. Metin, A. Dagli. 2007. Protective Role of Genistein in Acute Liver Damage Induced by Carbon Tetrachloride. *Hindawi Publishing Corporation*.
- Landis, G. and J. Tower. 2005. Superoxide Dismutase Evolution And Life Span Regulation. *Mechanism of Ageing and Development*, 126: 365-379.

- Lee, C.H., S. W. Park, Y. S. Kim, S. S. Kang, J. A. Kim, S. H. Lee. 2007. Protective Mechanism Of Glycyrrhizin On Acute Liver Injury Induced By Carbon Tetrachloride In Mice. *Biology Pharmacology Bulletin*, 30 (10), 1898–1904.
- Lee, I. H., Y. H. Hung, C. C. Chou. 2008. Solid-State Fermentation With Fungi To Enhance The Antioxidative Activity, Total Phenolic And Anthocyanin Contents Of Black Bean. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2), 150–156.
- Levison, D and R. Reid. 2008. *MUIR'S Text book of Pathology 14th edition*. London: Edward Arnold. Ltd.
- Li, L. Hu, Z. Li, W. Hu, M. Ran, J. Chen, P. Sun, Q. 2012. Establishment of a Standarized Liver Fibrosis with Different Pathological Stages in Rats. *Gastroenterology Reseach and Practice Volume 2012*
- Mine, Y. A. Wong, B. Jiang. 2004. Fibrinolytic Enzymes in Asian Traditional Fermented Foods. *Food Research International* (38):243-250
- Mormone, E., J. George, N. Nieto. 2011. Molecular Pathogenesis of Hepatic Fibrotic and Current Therapeutic Approaches. *ELSEVIER Journal of Chemico-Biological Interaction* 193 : 225-231
- Nurrahman. 2015. Evaluasi Komposisi Zat Gizi dan Senyawa Antioksidan Kedelai Hitam dan Kedelai Kuning. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan* 4 (3).
- Pearce, E. 2006. *Anatomi dan Fisiologi Hewan*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Pertiwi, P., dan W. Widyaningsih. 2015. Efek Ekstrak Etanol Ganggang Hijau (*Ulva lactuca L.*) Terhadap Aktivitas SGOT-SGPT Pada Tikus. *Trad. Med J.*, Vol 20(1)
- Poernomo, A., Isnaeni, Purwanto. 2015. Aktivitas Invitro Enzim Fibrinolitik Fermentasi *Rhizopus oligosporus* ATCC 6010 Pada Substrat Kedelai Hitam. *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi*, Vol.4 No. 2 November 2015.
- Purwoko, T. 2001. *Biotransformasi Isoflavon oleh Rhizopus oryzae UICC 524 dan Rhisopus microsporus var. chinensis UICC 521 pada Fermentasi Tempe dan Aktivitas Antioksidan Isoflavon Aglikon terhadap Oksidasi Minyak Kedelai*. [Tesis]. Depok: Universitas Indonesia.
- Purwoko, T. 2004. Kandungan Isoflavon Aglikon pada Tempe Hasil Fermentasi *Rhizopus microsporus var. oligosporus*: Pengaruh Perendaman. *BioSMART* Vol. 6 (2): 85-85
- Ramon, B., and A. Daud. Liver Fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* 115: 209-218.
- Rockey, D. 2006. Hepatic Fibrosis and Cirrhosis. *Hepatology* 43: S113-S120.

- Rukmana, S. K. dan Y. Yuniarsih. 1996. *Kedelai, Budidaya Pasca Panen*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Salas, A. L., G. Ocampo, G. G. Farina, J. Reyes L. R. Fragoso. 2007. Genistein Decreases Liver Fibrosis And Cholestasis Induced By Prolonged Biliary Obstruction In The Rat. *Annals of Hepatology*, 6 (1), 41-47
- Sherwood, L. 2009. *Human Physiology: From Cells To System 7th Edition*. Belmont: Brooks/Cole.
- Suarsana, I., T. Wresdiyati, A. Suprayogi. 2013. Respon Stress Oksidatif Dan Pemberian Isoflavon Terhadap Aktivitas Superoksida Dismutase Dan Peroksidasi Lipid Pada Hati Tikus. *JITV 18(2): 146-152*
- Suckow, M.A., H. Steven, C. L. Frangklin. 2006. *The Laboratory Rat Second Edition*. A volume in American College of Laboratory Animal Medicine. Academic Press.
- Sugiarti, T. 2015. *Pengaruh Purifikasi Parsial-Kromatografi Filtrasi Gel Terhadap AKtivitas Enzim Fibrinolitik Tempe Kacang Koro (Canavalla ensiformis) Hasil Fermentasi Rhizopus oligosporus FNCC 6010*. ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga: Surabaya.
- Sugimoto. 2007. The Fibrinolytic Activity Of A Novel Protease Derived From Tempeh Producing Fungus, Fusarium Sp. BLB. *Jurnal Biosci Biotechnol Biochem Japan* 71 (9): 2184-2189
- Utamingrum, F. 2011. *Pengaruh Pemberian Yoghurt Kedelai Hitam (Black Soyghurt) Terhadap Kadar Kolesterol LDL Serum pada Tikus Dislipedemia*. [Skripsi] Semarang: Universitas Diponegoro.
- Vattem, D. A and Shetty, K. 2003. Ellagic Acid Production And Phenolic Antioxidant Activity In Cranberry Pomace (Vaccinium Macrocarpon) Mediated By Lentinus Edodes Using A Solid-State System. *Process Biochemistry*, 39(3), 367-379.
- Walace, K., A. Burt, M. Wirght. 2008. Liver Fibrosis. *Biochemical J.* 411:1-8.
- Weber, L., M. Boll, A. Stampfl. 2003. Hepatotoxicity and Mechanism of Action of Haloalkanes: Carbon Tetrachloride as A Toxicological model. *Toxicology*. 33(2): 105-1036.
- Whitfield, J. B. 2001. *Gamma Glutamyl Transferase*. Departement of Clinical Biochemistry, Royal Prince Alfred Hospital and University of Sydney.
- Widyaningsih, W., R. Sativa, I. Primardiana. 2015. Efek Antioksidan Ekstrak Etanol Ganggang Hijau (*Ulva Lactuca* L.) Terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) Dan Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase (SOD) Hepar Tikus Yang Diinduksi CCl₄. *Media Farmasi Vol 12(2): 163-175*
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.

Yusof, M. H., A. Norlaily, S. Keong, W. Yong, B. Kee, S. Peng, K. Long, S. Abdul, N. Banu. 2013. Hepatoprotective Effect of Fermented Soybean (Nutrient Enriched Soybean Tempeh) against Alcohol-Induced Liver Damage in Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2013*

Zhen, G. 2003. *The Toxicology of Carbon Tetrachloride*. Free Radical and Radiation Biology Program The University of Iowa. Iowa City.

