



**UJI EFEKTIVITAS PROTEIN BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon* Linn.)
TERHIDROLISIS SEBAGAI HEPATOPROTEKTOR TERHADAP
RADIKAL BEBAS DALAM MENEGAH PENINGKATAN
KADAR ALKALI FOSFATASE TIKUS WISTAR
YANG DIINDUKSI CCL₄**

SKRIPSI

Oleh

**Nila Mahardika Tiara Nindy
NIM 102010101034**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2014**



**UJI EFEKTIVITAS PROTEIN BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon* Linn.)
TERHIDROLISIS SEBAGAI HEPATOPROTEKTOR TERHADAP
RADIKAL BEBAS DALAM MENCEGAH PENINGKATAN
KADAR ALKALI FOSFATASE TIKUS WISTAR YANG
DIINDUKSI CCL₄**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Ilmu Kedokteran (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh
Nila Mahardika Tiara Nindy
NIM 102010101034

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2014**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Allah SWT atas limpahan rahmat, hidayat, dan inayah-Nya yang tidak pernah putus, beserta Nabi Muhammad SAW yang selalu menjadi panutan dalam menapaki setiap tangga kehidupan;
2. Orang tuaku tercinta, Ibunda Nining Purwati S.Pd dan Ayahanda Sutono SH.MH yang senantiasa telah membesarkan, mendidik, mendukung, serta memberikan kasih sayang dan doa sehingga membantuku menjadi manusia yang lebih baik dan kuat menghadapi segala sesuatu. Senyum dan kebahagiaan mereka adalah harapan terbesarku;
3. Dosen-dosen pembimbingku, Bapak Prof. Tri Agus Siswoyo, S.P., M.Agr., Ph.D dan dr. Hairrudin, M.Kes yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dukungan, pengarahan, dan bimbingan dalam penulisan skripsi ini;
4. Guru-guruku tercinta yang telah mendidik dengan penuh kesabaran mulai dari Taman Kanak-kanak hingga Perguruan Tinggi;
5. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

MOTO

“ Dan Allah tidak menjadikan pemberian bala bantuan itu melainkan sebagai kabar gembira bagi kemenanganmu, dan agar tentram hatimu karenaNya.
Dan kemenanganmu itu hanyalah dari Allah”
((Terjemahan Surat Ali Isra, ayat 36))*



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

nama : Nila Mahardika Tiara Nindy

NIM : 102010101034

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul: *Uji Efektivitas Protein Biji Melinjo (Gnetum gnemon Linn.) Terhidrolisis Sebagai Hepatoprotektor terhadap Radikal Bebas dalam Mencegah Peningkatan Kadar Alkali Fosfatase Tikus Wistar yang Diinduksi CCl₄* adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 12 Mei 2014
Yang menyatakan,

Nila Mahardika Tiara Nindy
NIM 102010101034

SKRIPSI

**UJI EFEKTIVITAS PROTEIN BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon Linn.*)
TERHIDROLISIS SEBAGAI HEPATOPROTEKTOR TERHADAP
RADIKAL BEBAS DALAM MENCEGAH PENINGKATAN
KADAR ALKALI FOSFATASE TIKUS WISTAR YANG
DIINDUKSI CCL₄**

Oleh

Nila Mahardika Tiara Nindy
NIM 102010101034

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr.,
Ph.D.

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Hairrudin, M.Kes.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul *Uji Efektivitas Protein Biji Melinjo (Gnetum gnemon Linn.) Terhidrolisis Sebagai Hepatoprotektor Terhadap Radikal Bebas dalam Mencegah Peningkatan Kadar Alkali Fosfatase Tikus Wistar yang Diinduksi CCl₄* telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Universitas Jember pada:

hari, tanggal : Senin , 12 Mei 2014

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji

Penguji I,

Penguji II,

dr. Ali Santosa, Sp.PD
NIP. 195909041987011001

dr. Dini Agustina, M.Biomed
NIP. 198308012008122003

Penguji III,

Penguji IV,

Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D
NIP. 197008101998031001

dr. Hairrudin, M.Kes
NIP. 197510112003121008

Mengesahkan
Dekan,

dr. Enny Suswati, M.Kes
NIP. 197002141999032001

RINGKASAN

Uji Efektivitas Protein Hidrolisis Biji Melinjo (*Gnetum Gnemon Linn.*) Terhadap Kadar Alkali Fosfatase Tikus Wistar Yang Diinduksi CCL₄; Nila Mahardika Tiara Nindy, 102010101034; 2014; 55 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Hepar adalah organ terbesar pada tubuh manusia, yang terletak dalam rongga perut sebelah kanan, tepatnya di bawah diafragma. Hepar juga menyumbang sekitar 2% berat tubuh total atau sekitar 1,5 kg pada manusia dewasa. Fungsi hepar adalah sebagai pusat metabolisme terbesar di tubuh seperti metabolisme karbohidrat, protein, lemak, vitamin, hormon, obat-obatan dan zat lain. Apabila terjadi kerusakan hepar akan berdampak pada keabnormalitasan berbagai fungsi dari organ tersebut. Hepar rentan sekali terhadap berbagai gangguan seperti gangguan metabolik, toksik, dan sirkulasi. Gangguan hepar yang paling sering menyebabkan kerusakan antara lain akibat proses infeksi, metabolisme obat, konsumsi alkohol berlebihan, dan dekompensasi jantung. Berbagai obat-obatan yang sifatnya hepatotoksik juga bisa menyebabkan kerusakan hepar antara lain paracetamol, tetrasiklin, isoniazid, sulfonamid, kontrasepsi oral, halotan, alfametidopa, karbontetraklorida, obat antineoplastik, dan lain-lain.

Karbontetraklorida (CCl₄) adalah toksin yang bias menyebabkan kerusakan hepar. CCl₄ merupakan cairan tak berwarna, tidak larut dalam air, dan digunakan dalam industri sebagai pelarut organik. CCl₄ dapat menembus membran sel dan CCl₄ yang tertelan akan didistribusikan ke semua organ, tapi efek toksiknya terutama terlihat pada hepar. Pemberian CCl₄ dengan dosis toksik pada hewan dapat menyebabkan akumulasi lemak pada hepar akibat blokade sintesis lipoprotein yang berfungsi sebagai pembawa lemak dari hepar. Kerusakan pada hepar dapat dinetralisir dengan pemberian antioksidan dari protein terhidrolisis biji melinjo (Gg-AOP).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dosis protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-AOP) (*Gnetum gnemon Linn.*) dan untuk mengetahui apakah

protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-AOP) (*Gnetum gnemon* Linn.) dalam mencegah peningkatan kadar alkali fosfatase dibandingkan dengan kontrol positif. Jenis penelitian yang digunakan adalah *True experimental laboratories*. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Post Test Only Control Group Design*. Pemilihan sampel dilakukan dengan cara *simple random sampling* dan sampel yang digunakan adalah tikus wistar jantan, umur 2-3 bulan, berat badan 170-250 gram, dan kondisi fisik sehat. Terdapat enam kelompok perlakuan, yaitu kelompok K diberikan aquades selama 7 hari; kelompok K (-) diberikan aquades selama 7 hari dan diberi CCl₄ 1,5 ml/kgBB secara peroral pada hari ke-7; kelompok K (+) diberikan *Glutathion reduced minimum* 99% dosis 10 mg/kgBB selama 7 hari dan diberi CCl₄ 1,5 ml/kgBB secara peroral pada hari ke-7; kelompok P1, P2, dan P3 masing-masing diberikan protein Gg-AOP dengan dosis 10, 20, dan 30 mg/kgBB selama 7 hari dan pada hari ke-7 diberikan CCl₄ 1,5ml/kgBB. Masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus dengan total sampel 24 tikus. Sampel darah diambil pada hari ke-8 dan diukur kadar enzim ALP. Kemudian dilakukan analisis data menggunakan *One Way ANOVA (Analysis of Variance)*. Data analisis *One Way ANOVA* dilanjutkan dengan analisis *post hoc multiple comparison* dengan metode LSD (*Least Significantly Difference*).

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa protein Gg-AOP terhidrolisis mampu mencegah peningkatan kadar ALP tikus wistar yang diinduksi CCl₄. Protein Gg-AOP terhidrolisis dosis 30 mg/kgBB memiliki efek paling kuat dalam mencegah peningkatan kadar ALP.

DAFTAR ISI

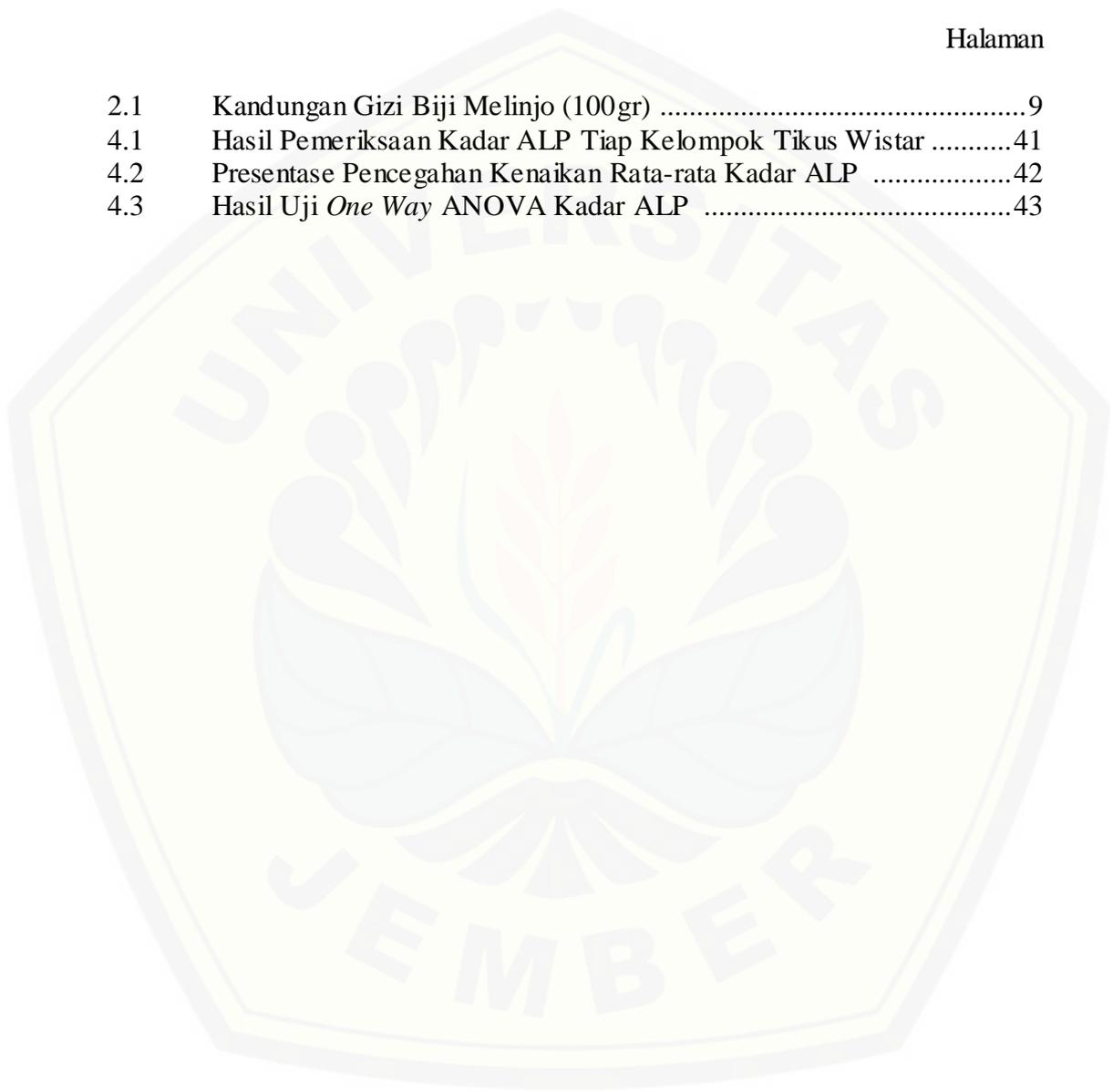
	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Tujuan Penelitian	5
1.4. Manfaat Penelitian	6
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Melinjo (<i>Gnetum gnemon. L</i>)	7
2.1.1. Klasifikasi	8
2.1.2. Karakteristik	8
2.1.3. Manfaat	9
2.1.4. Kandungan Gizi	9
2.1.5 Fisiologi	10
2.1.6 Kandungan Kimia	10
2.1.7 Habitat	11

2.1.8 Pemanfaatan.....	11
2.2 Hepar	11
2.2.1 Anatomi	11
2.2.2 Fungsi Hepar	12
2.3 Radikal Bebas	15
2.4 Karbon Tetra Klorida (CCl₄).....	18
2.5 Antioksidan.....	19
2.4.1 Mekanisme Kerja Antioksidan	21
2.6 Glutation	22
2.7 Diagnosis Ezimatik Hati	23
2.8 Kerangka Konseptual Penelitian.....	26
2.8 Hipotesis Penelitian.....	27
BAB 3. METODE PENELITIAN	28
3.1 Jenis Penelitian.....	28
3.2. Rancangan Penelitian	28
3.3. Jumlah Sampel.....	29
3.4 Tempat dan Waktu Penelitian.....	30
3.5 Alat dan Bahan.....	30
3.5.1 Alat.....	30
3.5.2 Bahan	31
3.6 Variabel Penelitian	31
3.6.1 Variabel Bebas	31
3.6.2 Variabel Terikat	31
3.6.3 Variabel Kendali	31
3.7 Definisi Operasional.....	31
3.7.1 Protein Biji Melinjo Hidrolisis.....	31
3.7.2 Enzim Alkali Fosfatase.....	32
3.7.3 Dosis Larutan CCl ₄	32
3.7.4 Hewan Coba.....	32
3.8 Prosedur Kerja	32
3.8.1. Pembuatan Protein Hidrolisis Biji Melinjo.....	32

3.8.2 Penentuan Daya Hepatotoksik CCL ₄	34
3.8.3 Perlakuan Terhadap Hewan Coba.....	34
3.8.4 Pemeriksaan Kadar Alkali Fosfatase.....	35
3.9 Analisis Data	36
3.10 Alur penelitian	37
3.10.1 Skema Pembuatan Ekstrak dan Pengisolasian Protein.	37
3.10.2 Skema Perlakuan Terhadap Hewan Coba.....	38
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	39
4.1 Hasil Penelitian	39
4.1.1 Hasil Rata-Rata Kadar Alkali Fosfatase	39
4.2 Analisis Data	42
4.3 Pembahasan	43
BAB 5. PENUTUP	50
5.1 Kesimpulan	50
5.2 Saran	50
DAFTAR PUSTAKA	

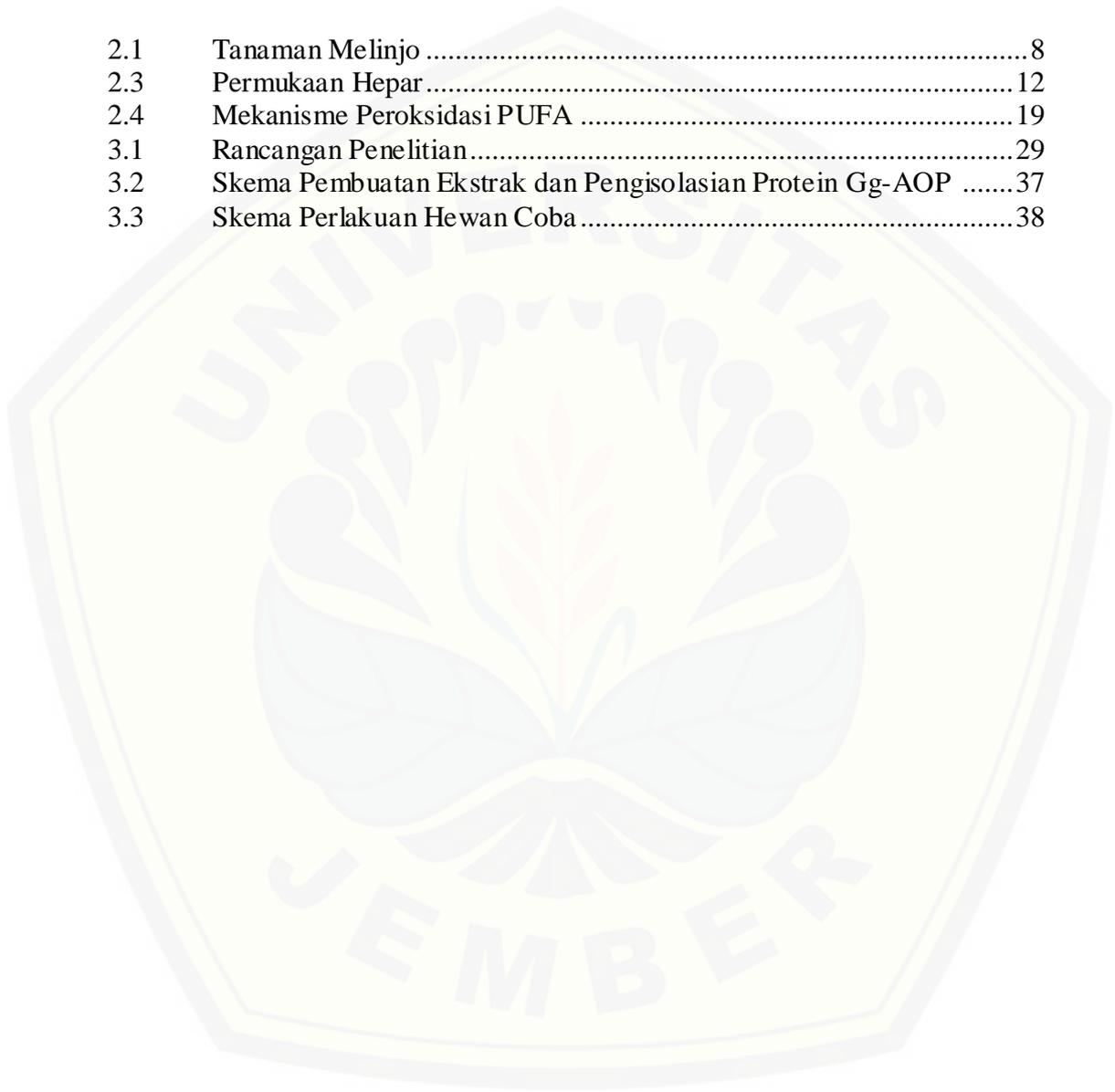
DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Kandungan Gizi Biji Melinjo (100gr)	9
4.1 Hasil Pemeriksaan Kadar ALP Tiap Kelompok Tikus Wistar	41
4.2 Presentase Pencegahan Kenaikan Rata-rata Kadar ALP	42
4.3 Hasil Uji <i>One Way</i> ANOVA Kadar ALP	43



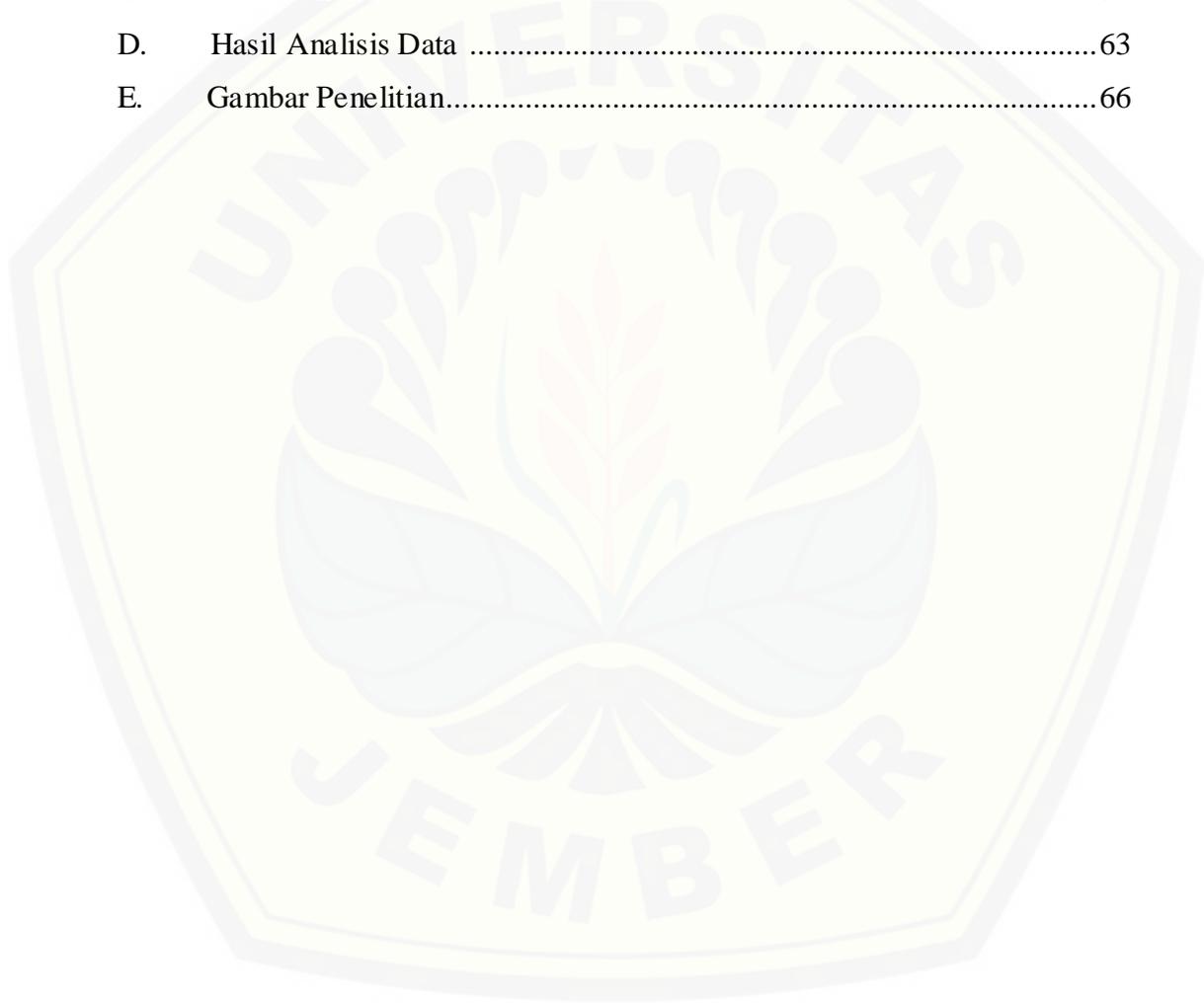
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Tanaman Melinjo	8
2.3 Permukaan Hepar	12
2.4 Mekanisme Peroksidasi PUFA	19
3.1 Rancangan Penelitian	29
3.2 Skema Pembuatan Ekstrak dan Pengisolasian Protein Gg-AOP	37
3.3 Skema Perlakuan Hewan Coba	38



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Tabel Daftar Volume Maksimal Larutan Sediaan Uji yang Dapat Diberikan pada Berbagai Hewan	55
B. Perhitungan dan Pemberian Dosis	56
C. Hasil Penelitian	57
D. Hasil Analisis Data	63
E. Gambar Penelitian.....	66



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hepar adalah organ terbesar pada tubuh manusia, yang terletak dalam rongga perut sebelah kanan, tepatnya di bawah diafragma. Hepar juga menyumbang sekitar 2% berat tubuh total atau sekitar 1,5 kg pada manusia dewasa. Fungsi hepar adalah sebagai pusat metabolisme terbesar di tubuh seperti metabolisme karbohidrat, protein, lemak, vitamin, hormon, obat-obatan dan zat lain. Seluruh fungsi hepar saling memiliki keterkaitan satu sama lain. Apabila terjadi kerusakan hepar akan mengakibatkan gangguan fungsinya. Fungsi lain dari hepar adalah sebagai alat ekskresi. Hal ini dikarenakan hepar membantu fungsi ginjal dengan cara memecah beberapa senyawa yang bersifat racun seperti urea, asam urat dengan menghasilkan nitrogen dari asam amino. Proses pemecahan senyawa racun oleh hepar disebut proses detoksifikasi (Guyton and Hall, 2008).

Dalam metabolisme obat-obatan, hepar menjadi organ yang berperan penting dengan mengubah obat-obatan yang non-polar (larut lemak) menjadi lebih polar (larut air) agar dapat dikeluarkan melalui ginjal dan empedu. Sebagai organ utama dalam metabolisme obat di tubuh, hepar berpotensi mengalami kerusakan akibat bahan-bahan kimia. Kerusakan tersebut dapat terjadi akibat penggunaan secara langsung suatu obat yang dikonversi menjadi toksin aktif oleh hepar atau ditimbulkan oleh mekanisme imunologik, biasanya obat atau metabolitnya yang dapat mengubah protein sel menjadi imunogen (Sativa, 2006).

Hepar rentan sekali terhadap berbagai gangguan seperti gangguan metabolik, toksik, dan sirkulasi. Gangguan hepar yang paling sering menyebabkan kerusakan antara lain akibat proses infeksi, metabolisme obat, konsumsi alkohol berlebihan, dan dekompensasi jantung. Berbagai obat-obatan yang sifatnya hepatotoksik juga bisa menyebabkan kerusakan hepar antara lain paracetamol, tetrasiklin, isoniazid,

sulfonamid, kontrasepsi oral, halotan, alfa metildopa, karbontetraklorida, obat antineoplastik, dan lain-lain (Sativa, 2006).

Karbon tetraklorida (CCl_4) adalah toksin yang bisa menyebabkan kerusakan hepar. CCl_4 merupakan cairan tak berwarna, tidak larut dalam air, dan digunakan dalam industri sebagai pelarut organik. CCl_4 dapat menembus membran sel dan CCl_4 yang tertelan akan didistribusikan ke semua organ, tapi efek toksiknya terutama terlihat pada hepar. Pemberian CCl_4 dengan dosis toksik pada hewan dapat menyebabkan akumulasi lemak pada hepar akibat blokade sintesis lipoprotein yang berfungsi sebagai pembawa lemak dari hepar, (CCl_4) biasa digunakan sebagai penginduksi kerusakan hepar sehingga sering digunakan dalam pengujian aktivitas hepatoprotektor suatu zat. Karbon tetraklorida dosis tunggal 0,1; 1,0; dan 10 ml/kg bobot badan bisa diberikan secara intraperitoneal pada tikus jantan, dan diamati kerusakan yang terjadi terutama pada hepar dan ginjal. Kerusakan hepar itu sendiri ditandai dengan berbagai peningkatan enzim dalam hepar, antara lain kadar enzim alanin transaminase (ALT), aspartat transaminase (AST), alkali fosfatase (ALP), bilirubin total, dan protein total dalam serum (Panjaitan *et al*, 2007).

Dalam endoplasmik retikulum hepar, CCl_4 dimetabolisme oleh sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) menjadi radikal bebas triklorometil (CCl_3). Triklorometil dengan oksigen yang akan membentuk radikal triklorometilperoksi sehingga dapat menyerang lipid membran endoplasmik retikulum dengan kecepatan yang melebihi radikal bebas triklorometil. Kemudian triklorometilperoksi menyebabkan peroksidasi lipid sehingga mengganggu homeostasis Ca^{2+} , dan akhirnya menyebabkan kematian sel (Panjaitan *et al*, 2007).

Hal tersebut di atas menyebabkan dilakukannya berbagai penelitian untuk mencari obat-obatan herbal yang dapat digunakan sebagai hepatoprotektor, contohnya antioksidan dari tumbuhan yang akan digunakan pada penelitian ini. Hepatoprotektor yaitu senyawa atau zat berkhasiat yang dapat melindungi sel-sel hepar terhadap pengaruh zat toksik yang dapat merusak sel hepar. Mekanisme dari hepatoprotektor adalah dengan cara detoksifikasi senyawa racun baik yang masuk

dari luar (eksogen) maupun yang terbentuk dalam tubuh (endogen) pada proses metabolisme, meningkatkan regenerasi hepar yang rusak, anti radang, dan sebagai imunostimulator (Dalimartha, 2000).

Kerusakan hepar dapat diketahui dari berbagai indikator. Salah satunya adalah kadar alkali fosfatase. Alkali fosfatase (ALP) merupakan enzim yang diproduksi terutama oleh epitel hepar dan osteoblast (sel-sel pembentuk tulang baru). Enzim ini juga berasal dari usus, tubulus proksimalis ginjal, plasenta dan kelenjar susu yang sedang membuat air susu. Alkali fosfatase disekresi melalui saluran empedu. Meningkat dalam serum apabila ada hambatan pada saluran empedu atau biasa disebut dengan kolestasis. Alkali fosfatase dilepaskan ke dalam darah dalam jumlah yang meningkat, hal ini terjadi apabila ada kerusakan sel-sel hepar dan selama aktivitas normal seperti pertumbuhan tulang dan kehamilan. Tingkat abnormal rendah alkali fosfatase juga bisa terjadi dalam kondisi genetik dan hipotiroidisme. Zat ini diukur dalam tes darah rutin (Panjaitan *et al.*, 2007 : 12).

Hepar akan melepaskan enzim-enzim ke dalam darah apabila mengalami kerusakan. Enzim-enzim itu dapat berupa SGOT, SGPT, dan alkali fosfatase. Alkali fosfatase (ALP) kelompok enzim yang akan meningkat dalam keadaan sirosis hepatis, *fatty liver*, tumor hepar, metastase hepar, hepatitis, dan intoksikasi obat. Nilai normal ALP pada tikus berkisar antara 87-190 (\pm 9,54) U/L (Sutanudjaja, 2009).

Tes kadar ALP terutama digunakan untuk mengetahui apakah terdapat penyakit hepar (hepatobilier) atau tulang. Alkali fosfatase pada orang dewasa berasal dari hepar, sedangkan pada anak-anak sebagian besar berasal dari tulang. Jika terjadi kerusakan ringan pada sel hepar, kadar ALP akan naik. Tubuh manusia dapat melakukan suatu proteksi alamiah untuk mencegah kerusakan hepar, mekanisme pencegahan tersebut dapat terganggu karena terjadi peningkatan jumlah radikal bebas. Pada kondisi tersebut tubuh memerlukan suatu proteksi tambahan untuk menghindari kerusakan hepar yang lebih parah, yaitu dengan melakukan konsumsi antioksidan guna mengikat radikal bebas yang berlebihan. Pemakaian CCL₄ dosis toksik dapat menyebabkan toksisitas pada hepar (hepatotoksik). Dalam proses

tersebut antioksidan bisa digunakan sebagai hepatoprotektor. Hepatoprotektor dapat difungsikan sebagai obat maupun suplemen untuk menjaga fungsi normal dari hepar (Syafrudin, 2008).

Banyak obat-obatan alami atau herbal yang memiliki senyawa antioksidan yang telah direkomendasikan sebagai pencegahan dan pengobatan penyakit hepar akibat radikal bebas. Sebagian besar tumbuhan dapat digunakan sebagai antioksidan, contohnya sumber protein alami dan protein hidrolisis dari tanaman melinjo (*Gnetum gnemon Linn.*) yang banyak dibudidayakan di Indonesia. Di Indonesia, tanaman ini merupakan salah satu komoditas favorit dimana bijinya dapat dimakan setelah dimasak dan dibuang kulitnya. Dari hasil penelitian sebelumnya, yaitu peneliti dari Universitas Jember, Tri agus Siswoyo, menilai bahwa biji melinjo mempunyai potensi aktif sebagai antioksidan, aktivitas antioksidan biji melinjo setara dengan vitamin C. Aktivitas antioksidan ini diperoleh dari konsentrasi protein tinggi, 9-10 % dalam tiap biji melinjo. Protein utamanya efektif untuk menetralkan radikal bebas penyebab berbagai macam penyakit seperti hipertensi, kolesterol tinggi, penyempitan pembuluh darah, penuaan dini, dan lain-lain (Siswoyo *et al.*,2010).

Protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-AOP) merupakan suatu protein biji melinjo yang sudah melewati proses modifikasi yaitu dengan menambahkan enzim alkalase dengan perbandingan 0.2% (E/S) pada kondisi suhu 50°C pada pH 8 selama 7-8 jam, disertai pengadukan secara kontinyu. Proses hidrolisis (Gg-AOP) oleh alkalase menghasilkan produk berupa campuran peptida dan asam-asam amino (Gg-AOP) melalui pemecahan ikatan peptida. Inaktivasi enzim dilakukan melalui inkubasi hidrolisat pada suhu 80°C selama 10 menit. Selanjutnya protein terhidrolisis yang terbentuk dipisahkan secara sederhana dengan sentrifugasi. Supernatan hidrolisat dipekatkan dengan cara pengeringan dingin hingga menjadi serbuk. Proses pengeringan dingin dapat mengatasi perubahan karakteristik hidrolisat yang tidak diinginkan, mencegah terjadinya penyusutan padatan dengan mempertahankan bentuk dan dimensi aslinya, meningkatkan stabilitas selama penyimpanan, mencegah kehilangan flavor, dan menghambat pertumbuhan bakteri (Siswoyo *et al.*, 2012).

Berdasarkan latar belakang diatas, diperlukan suatu penelitian mengenai uji keefektivitasan protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-AOP) dalam mencegah kenaikan kadar alkali fosfatase sehingga dapat dijadikan hepatoprotektor untuk mencegah kerusakan hepar. Kadar alkali fosfatase merupakan salah satu indikator yang digunakan untuk mengetahui tingkat kerusakan hepar yang disebabkan karena induksi CCL₄.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka permasalahan yang dapat dirumuskan adalah :

- a. Apakah protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-AOP) (*Gnetum gnemon Linn.*) dapat mencegah peningkatan kadar alkali fosfatase pada tikus wistar yang diinduksi CCL₄?
- b. Apakah ada pengaruh perbedaan pemberian dosis protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-AOP) (*Gnetum gnemon Linn.*) dalam mencegah peningkatan kadar enzim alkali fosfatase pada tikus wistar yang diinduksi CCL₄?

1.3 Tujuan penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari peneliti ini adalah untuk mengetahui apakah protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-AOP) (*Gnetum gnemon Linn.*) dapat mencegah peningkatan kadar alkali fosfatase pada tikus yang diinduksi CCL₄.

1.3. Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini antara lain.

- 1) Untuk mengetahui dosis protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-AOP) (*Gnetum gnemon Linn.*).

- 2) Untuk mengetahui apakah protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-AOP) (*Gnetum gnemon Linn.*) dalam mencegah peningkatan kadar alkali fosfatase dibandingkan dengan kontrol positif.

1.4 Manfaat penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah

- 1) Menambah wawasan dan pengetahuan di bidang penggunaan nutrisitikal mengenai manfaat biji melinjo.
- 2) Memberikan informasi kepada masyarakat tentang pemberian dosis protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-AOP).
- 3) Sebagai dasar untuk penelitian-penelitian selanjutnya.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Melinjo (*Gnetum gnemon* Linn)

Melinjo (*Gnetum gnemon* Linn) atau dalam bahasa Sunda disebut Tangkil adalah suatu spesies tanaman berbiji terbuka (Gymnospermae) berbentuk pohon yang berasal dari Asia tropik, melanesia, dan Pasifik Barat. Melinjo dikenal pula dengan nama *belinjo*, *mlinjo* (bahasa Jawa), *tangkil* (bahasa Sunda) atau *bago* (bahasa Melayu dan bahasa Tagalog), Khalet (Bahasa Kamboja) (Cerianet, 2010).

Melinjo (*Gnetum gnemon* Linn) merupakan tanaman asli Indo- Malaya, milik keluarga Gnetacea (Kato, 2009; Kato, 2011). Ukuran dari pohon melinjo adalah sekitar 50 kaki tinggi dan sering ditemukan dalam hutan kering dan hutan basah di berbagai daerah. Area distribusi dari tumbuhan ini antara lain di Asia Tenggara dan Melanesia, Assam, Timur Laut India (Manner dan Elevitch, 2006). Khususnya di Indonesia, daerah distribusi dari tanaman ini meliputi di Andaman, Sumatera dan Pulau Jawa (Manner and Elevitch, 2006).

Penelitian sebelumnya yang sudah dilakukan pada melinjo menunjukkan bahwa melinjo menghasilkan senyawa antioksidan. Aktivitas antioksidan ini diperoleh dari konsentrasi protein tinggi, 9-10 persen dalam tiap biji melinjo. Protein utamanya berukuran 30 kilo Dalton yang amat efektif untuk menghabisi radikal bebas yang menjadi penyebab berbagai macam penyakit (Asri, 2010).

Ada beberapa senyawa bioaktif yang ditemukan di melinjo, seperti saponin, tanin, dan flavonoid (Kato *et al*, 2011; Santoso *et al*, 2010; Siswoyo *et al*, 2011). Senyawa ini telah diteliti memiliki potensi pemanfaatan sebagai obat atau antibodi, antimikroba, *pigmentsorevenanti inflammatoryagents* (Khan *et al*, 2003; Rauha *et al*, 2000; Uboh *et al*, 2010).

Selain itu melinjo juga merupakan antimikroba alami. Itu artinya protein melinjo juga bisa dipakai sebagai pengawet alami makanan sekaligus obat baru untuk

penyakit yang disebabkan oleh bakteri. Peptida Gg-AMP yang diisolasi dari biji melinjo diindikasikan punya potensi aktif menghambat beberapa jenis bakteri gram positif dan negatif (Kato *et al*, 2011).



Gambar 2.1. Tanaman Melinjo (*Gnetum gnemon Linn*).

2.1.1 Klasifikasi Tanaman Melinjo

Secara garis besar, klasifikasi tanaman melinjo (*Gnetum gnemon Linn*) menurut Honton (2004) dalam dunia tumbuh – tumbuhan adalah sebagai berikut:

- Kigdom : Plantae
- Divisi : Gnetophyta
- Subdivisi : Gnetophytina
- Kelas : Gnetopsida
- Subkelas : Gnetidae
- Ordo : Gnetales
- Famili : Gnetaceae
- Genus : Gnetum
- Spesies : Gnetum gnemon Linn

2.1.2 Karakteristik Tanaman Melinjo

Seperti umumnya tumbuhan tingkat tinggi, pohon melinjo juga dapat dibedakan atas akar, batang, daun, dan bunga. Melinjo yang tumbuh dari biji bersistem perakaran tunggang, seperti halnya tumbuhan Dicotyledone. Batang melinjo berkayu dan bercabang. Tinggi pohon ini antara 5 – 22 meter. Bentuk percabangannya sangat khas. Pohon melinjo berdaun rimbun. Bunga melinjo membentuk kerucut dengan karangan bunga melingkar. (Manner dan Elevitch, 2006).

2.1.3 Manfaat Tanaman Melinjo

Daun muda, perbungaan, tangkil, dan buah tua melinjo dimasak sebagai sayur (terutama sayur asem). Bijinya merupakan bagian yang terpenting, buahnya tidak lain dari biji yang terbungkus oleh kulit dalam yang kaku (kulit biji) dan kulit luar yang tipis dan dapat dimakan. Biji melinjo umumnya direbus atau dijadikan emping dan digoreng. Suatu macam serat yang berkualitas tinggi dihasilkan dari kulit batang bagian dalam, kulit ini dimanfaatkan sebagai tali panah yang terkenal di pulau Sumba, juga untuk tali pancing atau jaring, berkat ketahanannya terhadap air laut. Kayu melinjo tak ada manfaatnya yang khusus, mungkin alasannya ialah karena kambium sekundernya membentuk struktur batang yang tidak normal.(Asri, 2010).

2. 1.4 Kandungan Gizi Melinjo

Tabel 2.1 Kandungan Gizi Biji Melinjo (100 gr)

Kandungan	Biji Melinjo (100 gr)
Kalori	66,00 cal
Protein	5,00 gr
Lemak	0,70 gr
Karbohidrat	13,30 gr
Kalsium	163,00 mg
Fosfor	75,00 mg
Besi	2,80 mg
Vitamin A	1000,00 SI
Vitamin B1	0,10 mg
Vitamin C	100,00 mg
Air	80,00 gr

Sumber: Direktorat Gizi Depkes RI dalam (Haryoto, 1998).

2.1.5 Fisiologi Tanaman Melinjo

Pohon berumah dua yang selalu hijau dan berbatang lurus, tinggi dapat mencapai 5-10 m. Daun berhadapan, berbentuk jorong, urat daun sekunder saling bersambungan. Perbungaan majemuk soliter dan aksiler, melingkar di tiap nodus, panjang bunga 3-6 cm. Terdapat 5 - 8 bunga betina di tiap nodus, berbentuk bola. Buah seperti buah kacang, berbentuk jorong, bagian ujungnya runcing pendek, ketika masak warna buah berangsur-angsur akan berubah dari kuning, merah hingga keunguan. Satu biji dalam satu buah, buah besar dan kulit tengahnya keras berkayu. (Manner dan Elevitch, 2006).

2.1.6 Kandungan Kimia

Gnetum gnemon merupakan salah satu spesies tumbuhan famili *Gnetaceae* yang banyak tumbuh di beberapa daerah di Indonesia, yang di kenal dengan

tumbuhan melinjo, dari beberapa spesies tumbuhan famili *Gnetaceae* yang telah diteliti menunjukkan bahwa kandungan senyawa oligomer resveratrol yang ditemukan menunjukkan karakteristik yang berbeda dengan yang ditemukan pada famili *Dipterocarpaceae* (Haryoto, 1998).

Penelitian yang sudah dilakukan pada melinjo menunjukkan bahwa melinjo menghasilkan senyawa antioksidan. Aktivitas antioksidan ini diperoleh dari konsentrasi protein tinggi, 9-10 persen dalam tiap biji melinjo. Sampai saat ini, dokter biokimia *Osaka Prefecture University*, Jepang telah mengisolasi dua jenis protein yang menunjukkan aktivitas antioksidan tinggi. Dari seluruh bagian tumbuhan melinjo yang pernah diekstraknya, mulai dari daun, kulit batang, akar, sampai biji, ditemukan protein paling potensial adalah dari biji. Riset menunjukkan aktivitas antioksidan dari kandungan fenolik ini setara dengan antioksidan sintetik BHT (Butylated Hydroxytoluene) (Pudjiatmoko, 2007).

2.1.7 Habitat Tanaman Melinjo

Habitat tanaman melinjo tumbuh liar di hutan-hutan hujan pada ketinggian hingga 1200 m. Tempat-tempat beriklim kering umumnya membudidayakan tanaman ini. Tidak ada syarat tertentu terhadap faktor kualitas dan kedalaman tanah, namun kadar ikat air pada tanah atau irigasi perlu dilakukan selama musim kering (Cerianet, 2010).

2.1.8 Pemanfaatan Tanaman Melinjo

Melinjo jarang dibudidayakan secara intensif. Kayunya dapat dipakai sebagai bahan papan dan alat rumah tangga sederhana. Daun mudanya (disebut sebagai *so* dalam bahasa Jawa) digunakan sebagai bahan sayuran (misalnya pada sayur asem). "Bunga" (jantan maupun betina) dan bijinya yang masih kecil-kecil (*pentil*) maupun yang sudah masak dijadikan juga sebagai sayuran. Biji melinjo juga menjadi bahan baku emping (Cadiz RT and Florido HB, 2001).

2.2 Organ Hepar

Hepar merupakan organ terbesar dan memiliki fungsi yang sangat kompleks di dalam tubuh. Hepar sering menjadi organ sasaran terserangnya berbagai penyakit dikarenakan fungsi metabolisme yang sebagian besar terjadi di hepar. Hepar memiliki berbagai macam enzim yang berfungsi untuk memetabolisme senyawa xenobiotik (terutama sitokrom P -450) sehingga yang sebelumnya toksik menjadi tidak toksik bagi tubuh, larut air, dan mudah diekskresikan (Lu, 2006).

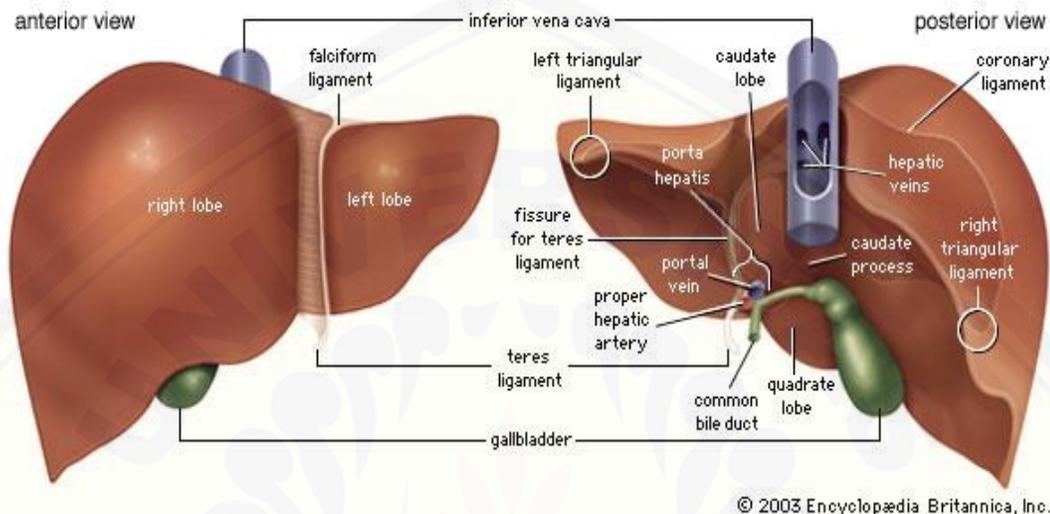
2.2.1 Anatomi Hepar

Hepar merupakan organ intestinal terbesar dengan berat antara 1,2 -1,8 kg. Hepar menempati sebagian besar kuadran kanan atas abdomen. Batas atas hepar berada sejajar dengan ruang interkostal V kanan dan batas bawah menyerong ke atas dari iga ix kanan ke iga vii kiri (PAPDI, 2006).

Permukaan anterior hepar yang cembung terdiri dari dua lobus yaitu lobus kanan dan kiri. Lobus kanan merupakan bagian terbesar sementara lobus kiri lebih kecil. Setiap lobus terdiri dari ribuan lobus kiri lebih kecil. Setiap lobus terdiri dari ribuan lobus yang merupakan unit fungsional (Dalimartha, 2001). Secara mikroskopis di dalam hepar manusia terdapat 50.000-10.000 lobuli, setiap lobulus terbentuk heksagonal yang terdiri atas sel-sel hepar (PAPDI, 2006).

Hepar terdiri dari sel parenkimal dan sel non-parenkimal. Sel parenkimal hepar biasa disebut hepatosit, meliputi kurang lebih 60% sel hepar sedangkan sisanya terdiri atas sel-sel epitelial sistem empedu dan sel-sel non parenkimal yang termasuk di dalamnya endotelium, sel *Kupferr*, dan sel *Stellata* yang terbentuk seperti bintang. Di antara lembaran hepatosit terdapat kapiler yang disebut sinusoid yang merupakan cabang vena porta dan arteri hepatica. Sinusoid hepar memiliki lapisan endotelial berpori terpisah dari hepatosit. Sel-sel lain yang terdapat dalam dinding sinusoid adalah sel *Kupferr* yang berfungsi menghancurkan bakteri dari benda asing lain di

dalam tubuh dan sel *Stellata* yang berfungsi penting dalam membantu pengaturan aliran darah sinusoidal (Guyton and Hall, 2008; PAPDI, 2006).



Gambar 2. 2 Permukaan Hepar

Sumber : Encyclopaedia Britannica, Inc (2003).

2.2.2 Fungsi Hepar

Hepar memiliki bermacam-macam fungsi. Ada empat macam pembagian fungsi hepar, antara lain fungsi metabolisme, sintesis, ekskresi, dan imunologi (PAPDI, 2006). Terkait metabolisme, hepar yang merupakan suatu kumpulan besar suatu reaktan kimia dengan laju metabolisme yang tinggi, saling memberikan substrat dan energi dari satu sistem metabolisme ke sistem yang lain, mengolah dan mensintesis berbagai zat yang diangkut ke daerah tubuh lain, dan melakukan fungsi metabolisme yang lain (Guyton and Hall, 2008).

a) Metabolisme karbohidrat

Dalam metabolisme karbohidrat, hepar terutama penting untuk mempertahankan konsentrasi glukosa darah normal. Penyimpanan glikogen memungkinkan hepar mengambil kelebihan glukosa dari darah, menyimpannya, dan

kemudian mengembalikannya kembali ke darah bila konsentrasi glukosa darah mulai turun terlalu rendah. Fungsi ini disebut fungsi penyangga glukosa hepar (Guyton and Hall, 2008). Glukoneogenesis juga penting untuk mempertahankan konsentrasi normal glukosa darah karena glukoneogenesis hanya terjadi secara bermakna apabila konsentrasi glukosa darah mulai menurun di bawah normal. Pada kondisi demikian, sejumlah besar asam amino dan gliserol dari trigliserida diubah menjadi glukosa, dengan demikian membantu mempertahankan kadar glukosa darah agar tetap normal (Ganong, 2006).

b) Metabolisme Lemak

Pemecahan lemak menjadi energi akan melalui berbagai tahapan. Pertama-tama lemak dipecah menjadi gliserol dan asam lemak, kemudian asam lemak dipecah oleh oksidasi beta menjadi radikal asetil berkarbon dua yang membentuk asetil Koenzim A (asetil Ko-A). Setelah itu asetil Ko-A memasuki siklus asam sitrat dan dioksidasi untuk membebaskan sejumlah energi dalam jumlah besar. Oksidasi beta terjadi pada semua bagian sel tubuh, namun secara cepat terjadi di hepar. Hepar tidak mampu menggunakan semua asetil Ko-A yang dibentuk, sebaliknya asetil Ko-A diubah menjadi kondensasi dua molekul asetil Ko-A menjadi asam asetoasetat. Asam asetoasetat merupakan asam dengan kelarutan tinggi yang melewati sel hepar masuk ke ekstrasel dan kemudian ditransport ke seluruh tubuh untuk diabsorpsi oleh jaringan lain. Kemudian jaringan ini mengubah asam asetoasetat menjadi asetil Ko-A dan kemudian mengoksidasinya dengan cara biasa (Guyton and Hall, 2008; Ganong, 2006).

Metabolisme kolesterol juga terjadi di dalam hepar. Kira-kira 80% kolesterol disintesis didalam hepar akan diubah menjadi garam empedu, yang kemudian disekresi kembali kedalam empedu, yang kemudian disekresi kembali kedalam empedu, sisanya diangkut dalam lipoprotein dan dibawa hepar dan terutama ditranspor dalam lipoprotein . Kedua fosfolipid dan kolesterol digunakan oleh sel untuk membentuk membran, struktur intrasel, dan bermacam-macam zat kimia yang penting bagi sel (Guyton and Hall, 2008).

c) Metabolisme protein

Fungsi hepar yang penting dalam metabolisme protein terkait deaminasi asam amino yang dibutuhkan sebelum asam amino dapat dipergunakan untuk energi atau diubah menjadi karbohidrat atau lemak. Sejumlah kecil deaminasi dapat terjadi di jaringan tubuh, terutama di ginjal (Guyton and Hall, 2008).

Pembentukan ureum oleh hepar bertujuan untuk mengeluarkan amonia dari tubuh. Sejumlah besar amonia dibentuk melalui proses deaminasi dan jumlahnya masih ditambah oleh pembentukan bakteri di dalam usus secara kontinu dan kemudian diabsorpsi ke dalam darah. Oleh karena itu, bila hepar tidak membentuk ureum, konsentrasi amonia plasma meningkat dengan cepat dan menimbulkan koma hepatic dan kematian. Kondisi lain misalnya penurunan aliran darah yang besar melalui hepar dapat menyebabkan jumlah amonia yang berlebihan dalam darah, suatu kondisi yang sangat toksik (Guyton and Hall, 2008).

Pada dasarnya, semua protein plasma, kecuali bagian dari gamma globulin, dibentuk oleh sel hepar. Hepar dapat membentuk protein plasma dari pada kecepatan maksimum 15 sampai 50 gram/hari. Dan apabila terjadi kehilangan protein plasma dapat menimbulkan mitosis sel hepar yang cepat dan pertumbuhan plasma sampai konsentrasi plasma kembali normal (Guyton and Hall, 2008).

d) Fungsi Metabolik Hepar yang Lain

Selain fungsi metabolik di atas, hepar juga memiliki fungsi metabolik lain, misalnya tempat penyimpanan vitamin dan porfirin. Vitamin yang paling banyak disimpan dalam hepar adalah vitamin A, tetapi sejumlah besar vitamin D dan vitamin B12 juga disimpan secara normal. Sebagian besar besi di dalam tubuh juga disimpan di hepar dalam bentuk *ferritin*. Sel hepar yang mengandung sejumlah besar protein yang disebut *apoferritin* dapat bergabung dengan besi, baik dalam jumlah sedikit ataupun banyak tersedia dalam cairan tubuh, besi akan berikatan dengan *apoferritin* dan membentuk *ferritin* untuk kemudian disimpan di dalam sel hepar (Guyton and Hall, 2008).

e) Fungsi Sintesis Dan Ekskresi

Terkait fungsi sintesis dan ekskresi, selain mensintesis urea, albumin, faktor pembekuan, dan lain –lain, hepar juga berperan dalam sintesis empedu. Empedu yang dihasilkan dialirkan ke dalam lambung untuk disimpan. Apabila seseorang mengkonsumsi makanan yang mengandung lemak maka empedu yang disimpan tadi akan dikeluarkan dan mengalir masuk ke dalam usus 12 jari (duodenum). Unsur utama empedu adalah air (97%), elektrolit, garam empedu, fosfolipid, kolesterol, dan pigmen empedu (bilirubin) (Guyton and Hall, 2008).

Hepar merupakan komponen sentral sistem imun. Sel *Kupffer* yang meliputi 15% dari massa hepar merupakan sel yang sangat penting dalam menanggulangi antigen berasal dari luar tubuh dan mempresintasikan antigen tersebut kepada limfosit. Selain itu, hepar juga memiliki fungsi detoksifikasi yang dilakukan dengan berbagai proses, terutama oleh enzim-enzim hepar terhadap zat-zat beracun baik dari luar maupun yang dihasilkan oleh tubuh. Dengan proses detoksifikasi, zat berbahaya akan diubah menjadi zat secara fisiologis tidak aktif (PAPDI, 2006).

2.3 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang mempunyai elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya dan dapat berdiri sendiri (Suryohudoyo, 2010). Pada metabolisme yang normal, tubuh menghasilkan partikel berenergi tinggi dalam jumlah kecil yang dikenal sebagai radikal bebas. Radikal bebas merupakan sekelompok bahan kimia baik berupa atom maupun molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan pada lapisan luarnya (Droge, 2002). Kebanyakan radikal bebas bereaksi secara cepat dengan atom lain untuk mengisi orbital yang tidak berpasangan, sehingga radikal bebas normalnya berdiri sendiri hanya dalam periode waktu yang singkat sebelum menyatu dengan atom lain. Simbol untuk radikal bebas adalah sebuah titik yang berada di dekat simbol atom ($R\cdot$). ROS (*Reactive Oxygen Species*) adalah senyawa pengoksidasi turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif yang terdiri atas kelompok radikal bebas dan kelompok nonradikal. Kelompok radikal bebas antara lain *superoxide anion* ($O_2\cdot^-$), *hydroxyl radicals* ($OH\cdot$), dan *peroxyl radicals*

(RO₂•). Yang nonradikal misalnya *hydrogen peroxide* (H₂O₂), dan *organic peroxides* (ROOH) (Simanjuntak, 2007).

Radikal bebas dan senyawa oksigen reaktif yang diproduksi dalam jumlah yang normal, penting untuk fungsi biologis, seperti sel darah putih yang menghasilkan H₂O₂ untuk membunuh beberapa jenis bakteri dan jamur serta pengaturan pertumbuhan sel, namun ia tidak menyerang sasaran spesifik, sehingga ia juga akan menyerang asam lemak tidak jenuh ganda dari membrane sel, organel sel, atau DNA, sehingga dapat menyebabkan kerusakan struktur dan fungsi sel (Winarsi, 2007).

Radikal bebas dapat dihasilkan dari hasil metabolisme tubuh dan faktor eksternal seperti asap rokok, hasil penyinaran ultra violet, zat kimiawi dalam makanan dan polutan lain. Penyakit yang disebabkan oleh radikal bebas bersifat kronis, yaitu dibutuhkan waktu bertahun-tahun untuk penyakit tersebut menjadi nyata. Contoh penyakit yang sering dihubungkan dengan radikal bebas adalah serangan jantung dan kanker. Untuk mencegah atau mengurangi penyakit kronis karena radikal bebas diperlukan antioksidan. Radikal bebas dapat dibentuk dari dalam sel oleh absorpsi tenaga radiasi (misalnya sinar ultra violet, sinar X) atau dalam reaksi reduksi oksidasi yang selama proses fisiologi normal atau mungkin berasal dari metabolisme enzimatik bahan-bahan kimia eksogen. Tenaga radiasi dapat melisiskan air dan melepaskan radikal seperti ion hidroksil dan H•. Radikal bebas lain ialah superoksida yang berasal dari reduksi molekul oksigen. Oksigen secara normal direduksi menjadi air, tetapi pada beberapa reaksi terutama yang menyangkut xantin oksidase, O₂ dapat terbentuk (Siti, 2009).

Sebenarnya, tubuh manusia dapat menetralkan radikal bebas ini, hanya saja bila jumlahnya terlalu berlebihan, maka kemampuan untuk menetralkannya akan semakin berkurang. Merokok misalnya adalah kegiatan yang secara sengaja memasukkan berbagai racun kimiawi yang bersifat radikal bebas ke dalam tubuh. Tubuh manusia didesain untuk menerima asupan yang bersifat alamiah, sehingga bila menerima masukan seperti asap rokok, akan berusaha untuk mengeluarkan berbagai

racun kimiawi ini dari tubuh melalui proses metabolisme, tetapi proses metabolisme ini pun sebenarnya menghasilkan radikal bebas. Pada intinya, kegiatan merokok sama sekali tidak berguna bagi tubuh, walau pun dapat ditemui perokok yang berusia panjang (Droge, 2002).

Radikal bebas yang mengambil elektron dari sel tubuh manusia dapat menyebabkan perubahan struktur DNA sehingga timbullah sel-sel mutan. Bila perubahan DNA ini terjadi bertahun-tahun, maka dapat menjadi penyakit kanker. Tubuh manusia, sesungguhnya dapat menghasilkan antioksidan tetapi jumlahnya sering sekali tidak cukup untuk menetralkan radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh. Atau sering sekali, zat pemicu yang diperlukan oleh tubuh untuk menghasilkan antioksidan tidak cukup dikonsumsi. Sebagai contoh, tubuh manusia dapat menghasilkan Glutation, salah satu antioksidan yang sangat kuat, hanya saja, tubuh memerlukan asupan vitamin C sebesar 1.000 mg untuk memicu tubuh menghasilkan glutathione ini. Keseimbangan antara antioksidan dan radikal bebas menjadi kunci utama pencegahan stres oksidatif dan penyakit-penyakit kronis yang dihasilkannya. (Simanjuntak, 2007).

Radikal bebas akan bereaksi dengan lemak, dan protein asam nukleat sehingga terjadi kerusakan lokal dan disfungsi organ tertentu. Lemak merupakan biomolekul yang sangat rentan terhadap serangan radikal bebas. Membran sel yang kaya akan sumber *poly unsaturated fatty acid* (PUFA), mudah sekali dirusak oleh bahan-bahan pengoksidasi. Proses demikian dinamakan peroksidasi lemak. Interaksi lemak dan radikal bebas yang menginduksi reaksi kerusakan berantai. Proses berantai ini menyebabkan kerusakan parah pada membran sel dan selaput organel, menimbulkan kehancuran serta lubang yang merupakan predileksi timbulnya kanker dan penetrasi bakteri (Siti, 2009).

Kerusakan hepar karena radikal bebas dari obat atau bahan-bahan kimia dapat terjadi melalui berbagai rute pemberian. Obat-obat tertentu memiliki efek toksik terhadap hepar. Contoh obat-obatan tersebut adalah parasetamol, oksifenasetin, alfa metildopa dan isoniazid telah dihubungkan dengan hepatotoksik kronik aktif

sementara halotan dan metrotoksat telah terlibat dalam berkembangnya sirosis. Sindroma yang menyerupai sirosis biliaris primer telah digambarkan menyertai terapi dengan klorpomazin, metaltestoteran, tolbutamid, dan obat lainnya (Schilling *et al.*, 2010).

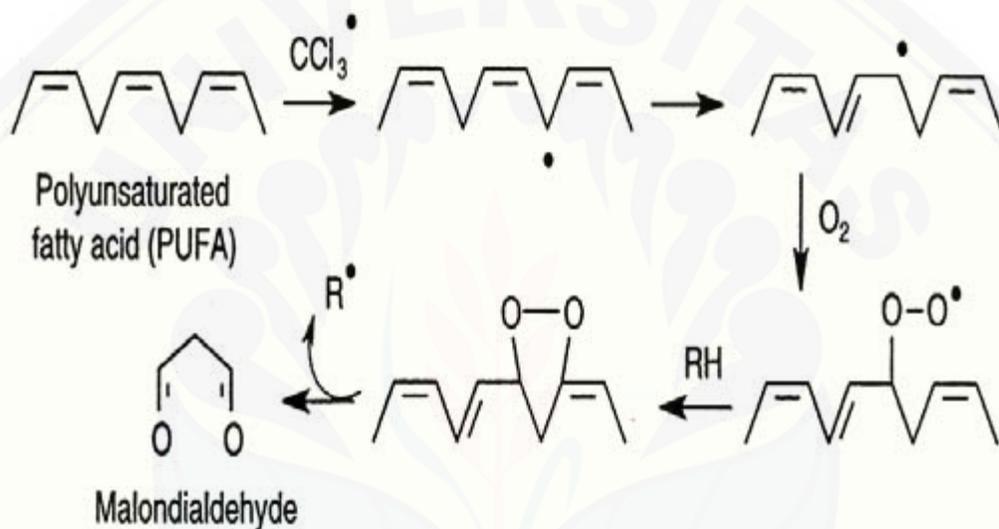
2.4 CCL₄

Karbon tetraklorida (CCl₄) adalah cairan yang mudah terbakar, jernih, tidak berwarna, sifat pelarutnya sama dengan klorofom. Dapat bercampur dengan alkohol, eter, benzen dan pelarut organik lainnya, tetapi praktis tidak larut dalam air. Harus disimpan dalam wadah tertutup dan kedap cahaya (Doerge, 2002).

Pertama kali dibuat tahun 1849 dan digunakan untuk anestesi, shampo kering dan obat cacing. Namun kegunaan dalam rumah tangga telah ditinggalkan karena toksisitasnya yang hebat dan hanya digunakan untuk industri, ilmu pengetahuan, dan penggunaan non rumah tangga (Sutanudjaja, 2009).

Ingesti CCl₄ secara oral dengan mudah diabsorpsi dari traktus gastrointestinal, berlangsung secara lambat dan tidak mudah diramalkan. Absorpsi ini mengalami peningkatan jika bersamaan dengan ingestasi lemak dan alkohol (Fauci *et al.*, 1998). CCl₄ dihimpun secara besar-besaran dalam lemak tubuh, hepar, dan sumsum tulang belakang. Pada hewan percobaan, penghirupan CCl₄ diekskresikan dalam 2-3 bulan, sekitar setengahnya hilang karena penguapan dan sisanya dikeluarkan sebagai urea dan metabolit lain dalam urin dan *feces* (Klassen, 2001). CCl₄ diaktifkan oleh enzim sitokrom P-450 menjadi radikal bebas yang reaktivitasnya tinggi. Pertama, CCl₄ diubah menjadi bentuk radikal triklorometil (CCl₃) dan kemudian menjadi radikal triklorometil peroksi (CCl₃O₂) yang sangat reaktif. Radikal ini dapat mengakibatkan peroksidasi PUFA (*poly unsaturated fatty acid*) yang terdapat pada membran sel, sehingga menyebabkan kerusakan pada sel (Sutanudjaja, 2009). Produk utama dari peroksidasi PUFA diproduksi melalui mekanisme radikal bebas. Proses ini diawali dengan inisiasi yang meliputi pengambilan atom H dari PUFA oleh oksigen bebas yang terdapat pada CCl₃O₂. Stabilitas bentuk dari produk awal ini ditentukan oleh

energi disosiasi ikatan antara C-H. Ikatan ganda metilen pada PUFA lebih mudah teroksidasi daripada ikatan pada *monosaturated fatty acid*. Reaksi selanjutnya adalah propagasi antara *pentadienil* radikal dengan atom oksigen. Hasil dari reaksi ini akan menjadi inisiator baru untuk bereaksi dengan PUFA yang lain sehingga menghasilkan produk radikal baru. Langkah selanjutnya adalah reaksi terminasi, yaitu kombinasi dua radikal menjadisuatu produk non radikal. Mekanisme peroksidasi PUFA dapat dilihat pada gambar 1



Gambar 1. Mekanisme Peroksidasi PUFA (Sativa, 2006).

2.5 Antioksidan

Antioksidan adalah zat penghambat reaksi oksidasi oleh radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan asam lemak tak jenuh, membran dinding sel, pembuluh darah, basa DNA, dan jaringan lipid sehingga menimbulkan penyakit. Antioksidan dapat menunda atau menghambat reaksi oksidasi oleh radikal bebas atau mentralkan dan menghancurkan radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan sel dan juga merusak biomolekul, seperti DNA, protein, dan lipoprotein di dalam tubuh yang akhirnya dapat memicu terjadinya penyakit dan penyakit degenerative (Droge, 2007).

Tubuh manusia tidak mempunyai cadangan antioksidan dalam jumlah berlebih, sehingga jika terjadi paparan radikal bebas maka tubuh membutuhkan antioksidan eksogen. Antioksidan juga dapat didefinisikan sebagai inhibitor yang bekerja menghambat oksidasi dengan bereaksi dengan radikal bebas reaktif. Antioksidan bekerja dengan cara menangkap radikal bebas, yaitu dengan menyumbangkan elektron ke radikal bebas reaktif membentuk senyawa yang lebih stabil. Dalam hepar, antioksidan memberikan perlindungan pada hepar secara langsung maupun tidak langsung. Secara langsung antioksidan melindungi sel hepar dari radikal bebas dengan mekanisme menghambat oksidasi radikal bebas. Secara tidak langsung, antioksidan menjaga fungsi hepar dengan menetralkan radikal bebas yang dapat mengganggu fungsi hepar misalnya dengan menetralkan radikal bebas yang dapat menghambat laju asupan nutrisi dan mineral yang dibutuhkan hepar untuk kelangsungan fungsi hepar (Sofia, 2005; Syafruddin, 2008).

Tubuh manusia menghasilkan senyawa antioksidan, tetapi jumlahnya seringkali tidak cukup untuk menetralkan radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh (Sofia, 2006, Hernan dan Raharjo, 2005). Sebagai contoh tubuh manusia menghasilkan *Glutation*, salah satu antioksidan yang sangat kuat, hanya tubuh memerlukan asupan vitamin C sebesar 1000 mg untuk memicu tubuh menghasilkan *glutation* ini. Kekurangan antioksidan dalam tubuh membutuhkan asupan dari luar. Bila mulai menerapkan pola hidup sebagai vegetarian akan sangat membantu dalam mengurangi resiko keracunan akibat radikal bebas. Keseimbangan antara antioksidan dan radikal bebas menjadi kunci utama pencegahan stres oksidatif dan penyakit-penyakit kronis yang dihasilkan (Sofia, 2006).

Menurut Simanjuntak (2007), berdasarkan sumbernya antioksidan dapat dibedakan menjadi dua, yaitu :

a) Antioksidan endogen

Antioksidan ini dihasilkan oleh tubuh manusia, misalnya superoksida dismutase (SOD), glutathion peroksidase, dan enzim katalase, SOD merupakan enzim yang bekerja bila ada pembatunya mineral seperti tembaga dan mangan. Sistem

glutation peroksidase terdiri dari beberapa komponen, yaitu enzim glutation peroksidase, glutation reduktase, kofaktor glutation (GSH), dan NADPH yang bersama-sama mengeliminasi hidrogen peroksida secara efektif. Enzim katalase bekerja dengan mengkatalisis perubahan berbagai macam peroksida dan radikal bebas menjadi oksigen dan air.

b) Antioksidan eksogen

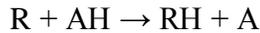
Antioksidan ini bersumber dari luar tubuh manusia. Senyawa pada tumbuhan banyak yang diketahui memiliki kemampuan dalam bereaksi dengan radikal bebas sehingga senyawa radikal menjadi lebih stabil. Senyawa polifenol diketahui memiliki aktivitas antioksidan, misalnya antosianin, flavonol, flavon, isoflavon, dan proantosianin. Beberapa polifenol diketahui bekerja dengan memutuskan ikatan rantai radikal bebas.

Dosis antioksidan yang diberikan bisa berpengaruh terhadap laju oksidasi. Pada konsentrasi rendah, antioksidan akan mencegah atau menghambat kerusakan akibat radikal bebas. Radikal-radikal antioksidan yang terbentuk pada reaksi tersebut lebih stabil dan mempunyai cukup energi untuk bereaksi dengan molekul lain membentuk radikal bebas yang baru (Siti, 2009). Pada konsentrasi tinggi, aktivitas antioksidan grup fenolik sering hilang, bahkan antioksidan dapat menjadi prooksidan. Prooksidan merupakan senyawa yang memicu terjadinya reaksi oksidasi dimana akan terbentuk radikal bebas baru yang menyebabkan terjadinya reaksi oksidasi dimana akan terbentuk radikal bebas baru yang menyebabkan terjadinya rantai kerusakan baru sehingga fungsi antioksidan menjadi tidak berguna lagi (Siti, 2009).

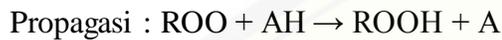
2.5.1 Mekanisme kerja antioksidan

Oksidasi dapat dihambat oleh berbagai macam cara diantaranya mencegah masuknya oksigen, penggunaan temperatur yang rendah, inaktivasi enzim yang mengkatalis oksidasi, mengurangi tekanan oksigen dan penggunaan pengemas yang sesuai. Cara lain untuk melindungi terhadap oksigen adalah dengan menggunakan bahan tambahan spesifik yang dapat menghambat oksidasi yang secara tepat disebut dengan penghambat oksidasi (*oxidation inhibitor*), tetapi baru-baru ini lebih sering

disebut antioksidan (Pokorni *et al.*, 2001). Penambahan antioksidan primer dengan konsentrasi rendah pada lipida dapat menghambat atau mencegah reaksi autoksidasi. Reaksi tersebut relatif stabil dan tidak mempunyai Inisiasi :



Radikal lipida



Mekanisme yang paling penting adalah reaksi antara antioksidan dengan radikal bebas (Murray, 2006). Biasanya antioksidan bereaksi dengan radikal bebas peroksil atau hidroksil yang terbentuk dari hidroperoksida yang berasal dari lipid. Senyawa antioksidan lain dapat menstabilkan hidroperoksida menjadi senyawa non radikal. Peruraian hidroperoksida dapat dikatalisis oleh logam berat akibatnya senyawa-senyawa dapat mengkelat logam juga termasuk antioksidan. Beberapa senyawa disebut sinergis karena senyawa tersebut dengan sendirinya tidak mempunyai aktivitas antioksidan akan tetapi senyawa tersebut dapat meningkatkan aktivitas antioksidan senyawa lain. Kelompok lain adalah senyawa-senyawa yang mampu menguraikan hidroperoksida melalui jalur non radikal sehingga senyawa ini dapat mengurangi kandungan radikal bebas (Pokorni *et al.*, 2001).

2.6 Glutation

Glutation adalah tripeptida (tiga protein dalam satu molekul) yaitu cystein, glutamin acid, and glycin. Glutation secara alami terdapat dan diproduksi dalam tubuh. Tetapi, seiring makin lanjut usia, makin berkurangnya kadar Glutation yang menyebabkan kesehatan optimal tidak tercapai, secara fisik, psikis, dan sosial (Murray *et al.*, 2009).

Glutation juga berperan sangat baik sebagai antioksidan dan antitoksin. Glutation ini merupakan salah satu antioksidan terbaik yang hanya diproduksi oleh tubuh secara alami dan bisa dengan mudah diperoleh dari asupan makanan sehari-hari yang dikonsumsi. Dalam Glutation ini terdapat 3 asam amino yakni *cycteine*, *glutamate*, dan juga *glysine*. Zat ini sangat dibutuhkan oleh tubuh karena tanpa

Glutation, antioksidan lainnya seperti vitamin C dan E tak akan mampu bekerja secara optimal. Glutation ini sering disebut sebagai master antioksidan yang mengatur dan memiliki efek terhadap antioksidan lainnya untuk memiliki fungsi sebagaimana mestinya. Tanpa peran Glutation, limfosit tidak akan menghasilkan antibodi untuk melawan ganasnya infeksi bakteri dan virus yang membahayakan tubuh. Fungsi dari Glutation antara lain adalah kulit yang menjadi kenyal, menghambat dan memudahkan kerutan pada kulit, adanya peningkatan kecerahan warna kulit di seluruh badan, menjaga kesehatan rambut dan kuku, serta melembutkan/menghaluskan tekstur kulit. Adanya penurunan kadar Glutation dalam tubuh sangat dipengaruhi dengan bertambahnya usia seseorang. Penurunan kadar Glutation tersebut sangat berdampak pada penurunan sistem kekebalan tubuh dalam melawan radikal bebas dan racun sehingga tubuh akan lebih mudah terserang penyakit (Murray *et al.*, 2009).

2.7 Diagnosis Enzimatik hepar

Kerusakan pada sel hepar dapat diketahui melalui parameter-parameter fungsi dengan mengamati zat-zat dalam peredaran darah yang dibentuk oleh sel-sel hepar yang rusak atau mengalami nekrosis. Diagnosis enzimatik hepar sering menjadi satu-satunya petunjuk ke arah penyakit hepar yang lebih dini (Handharyani, 2007).

Ada beberapa indikasi dalam dilakukannya uji pemeriksann biokimia hepar. Misalnya riwayat pemeriksaan adanya penyakit, baik itu karena *jaundice*, riwayat penyalahgunaan alkohol, keracunan obat-obatan (misalnya paracetamol), tanda-tanda terjadinya penyakit hepar kronis, termasuk asites, dan riwayat keluarga hemokromatosis. Indikasi lain termasuk skrining populasi akan terinfeksi virus yang menyebar luas, penyakit non-hepatik yang berefek pada fungsi hepar, dan pengawasan obat-obatan (misalnya valproat atau *methotrexate*) (Panjaitan, 2007).

Hepar mampu mensekresikan enzim-enzim transminase di saat sel-selnya mengalami gangguan. Kadar transminase yang tinggi biasanya menunjukkan kelainan dan nekrosis hepar. Enzim-enzim tersebut masuk dalam peredaran darah. Beberapa

uji pemeriksaan biokimia hepar yang sering dilakukan meliputi kadar SGOT dan SGPT, LDH (laktat dehidrogenase), alkali fosfatase, GGT, bilirubin serum. Salah satu petunjuk penting adanya kerusakan hepar adalah kadar alkali fosfatase (Coates, 2011).

Alkali fosfatase merupakan enzim yang berperan dalam mempercepat hidrolisis fosfat organik dengan melepaskan fosfat anorganik. Enzim ini terdapat dalam banyak jaringan, terutama di hepar, tulang, mukosa usus, dan plasenta. Peningkatan ALP terjadi akibat adanya kolestasis, dan pada obstruksi intra maupun ekstrabiliar enzim ini akan meningkat 3-10 kali dari nilai normal sebelum timbul ikterus. Dari hasil yang diperoleh pada penelitian sebelumnya terlihat bahwa dengan pemberian CCl₄ 0,1 ml/kg BB kadar enzim ALP di dalam darah hewan coba meningkat dibanding kontrol, namun perubahan kadar enzim ini tidak terlalu mencolok dan secara statistik juga dinyatakan tidak berbeda ($p > 0,05$). Artinya, pemberian CCl₄ tidak mempengaruhi aliran empedu ekstra dan intrabiliar. Pada pemberian CCl₄ 1 ml/kg BB terjadi peningkatan kadar enzim ALP hampir dua kali lipat dibanding kontrol, bahkan pada pemberian 10 ml CCl₄/kg BB kemampuan hepar dalam mensintesis enzim ini sudah sangat terganggu akibat terjadinya kerusakan sel hepar yang luas dan berat (Panjaitan, 2007).

Fosfatase alkali (alkaline phosphatase, ALP) merupakan enzim yang diproduksi terutama oleh epitel hepar dan osteoblast (sel-sel pembentuk tulang baru), enzim ini juga berasal dari usus, tubulus proksimalis ginjal, plasenta dan kelenjar susu yang sedang membuat air susu. Fosfatase alkali disekresi melalui saluran empedu. Meningkat dalam serum apabila ada hambatan pada saluran empedu (kolestasis). Tes ALP terutama digunakan untuk mengetahui apakah terdapat penyakit hepar (hepatobiliar) atau tulang (Sutedjo, 2007).

Pada orang dewasa sebagian besar dari kadar ALP berasal dari hepar, sedangkan pada anak-anak sebagian besar berasal dari tulang. Jika terjadi kerusakan ringan pada sel hepar, mungkin kadar ALP agak naik, tetapi peningkatan yang jelas terlihat pada penyakit hepar akut. Begitu fase akut terlampaui, kadar serum akan

segera menurun, sementara kadar bilirubin tetap meningkat. Peningkatan kadar ALP juga ditemukan pada beberapa kasus keganasan (tulang, prostat, payudara) dengan metastase dan kadang-kadang keganasan pada hepar atau tulang tanpa metastase (Kosasih, *et al* 2008).

Kadar ALP dapat mencapai nilai sangat tinggi (hingga 20 x lipat nilai normal) pada sirosis biliar primer, pada kondisi yang disertai struktur hepar yang kacau dan pada penyakit-penyakit radang, regenerasi, dan obstruksi saluran empedu intrahepatik. Peningkatan kadar sampai 10 x lipat dapat dijumpai pada obstruksi saluran empedu ekstrahepatik (misalnya oleh batu) meskipun obstruksi hanya sebagian. Sedangkan peningkatan sampai 3 x lipat dapat dijumpai pada penyakit hepar oleh alcohol, hepatitis kronik aktif, dan hepatitis oleh virus (Kosasih *et al.*, 2008).

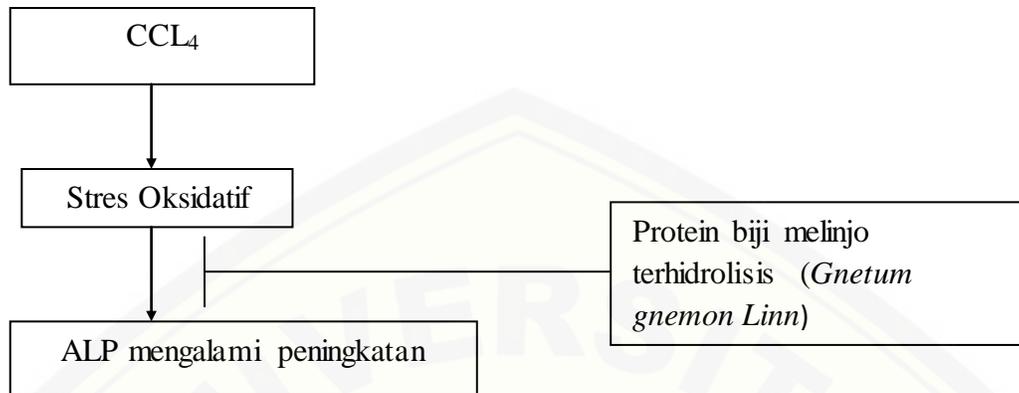
Pada kelainan tulang, kadar ALP meningkat karena peningkatan aktifitas osteoblastik (pembentukan sel tulang) yang abnormal, misalnya pada penyakit Paget. Jika ditemukan kadar ALP yang tinggi pada anak, baik sebelum maupun sesudah pubertas, hal ini adalah normal karena pertumbuhan tulang (fisiologis). Elektroforesis bisa digunakan untuk membedakan ALP hepar atau tulang. Isoenzim ALP digunakan untuk membedakan penyakit hepar dan tulang, ALP1 menandakan penyakit hepar dan ALP2 menandakan penyakit tulang. Jika gambaran klinis tidak cukup jelas untuk membedakan ALP hepar dari isoenzim-isoenzim lain, maka dipakai pengukuran enzim-enzim yang tidak dipengaruhi oleh kehamilan dan pertumbuhan tulang. Enzim-enzim itu adalah : 5'nukleotidase (5'NT), leusine aminopeptidase (LAP) dan gamma-GT. Kadar GGT dipengaruhi oleh pemakaian alcohol, karena itu GGT sering digunakan untuk menilai perubahan dalam hepar oleh alcohol daripada untuk pengamatan penyakit obstruksi saluran empedu (Kosasih *et al.*, 2008).

Metode pengukuran kadar ALP umumnya adalah kolorimetri dengan menggunakan alat (mis. fotometer/spektrofotometer) manual atau dengan analizer kimia otomatis. Elektroforesis isoenzim ALP dilakukan untuk membedakan ALP hepar dan tulang. Bahan pemeriksaan yang digunakan berupa serum atau plasma

heparin (LeFever,2007.). Nilai normal ALP 30-120u/l. Peningkatan Kadar pada obstruksi empedu (ikterik), kanker hepar, sirosis sel hepar, hepatitis, hiperparatiroidisme, kanker (tulang, payudara, prostat), leukemia, penyakit Paget, osteitis deforman, penyembuhan fraktur, myeloma multiple, osteomalasia, kehamilan trimester akhir, arthritis rheumatoid (aktif), ulkus, pengaruh obat albumin IV, antibiotic (eritromisin, linkomisin, oksasilin, penisilin), kolkisin, metildopa (Aldomet), alopurinol, fenotiazin, obat penenang, indometasin (Indocin), prokainamid, beberapa kontrasepsi oral, tolbutamid, isoniazid, asam paraaminosalisilat. Penurunan kadar pada hipotiroidisme, malnutrisi, sariawan/skorbut (kekurangan vit C), hipofosfatasia, anemia pernisiiosa, isufisiensi plasenta, pengaruh obat oksalat, fluoride, propranolol (Inderal) (LeFever, 2007).

2.8 Kerangka Konseptual

Kerangka konseptual pada Gambar 2.4 menjelaskan bahwa CCl₄ dimetabolisme dalam retikulum endoplasmik hepar oleh sitokrom P-450 2E1 (CYP2E1) menjadi radikal bebas triklorometil (CCl₃*) yang dapat memicu terjadinya kondisi stres oksidatif. Triklorometil dengan oksigen akan membentuk radikal triklorometilperoksi yang dapat menyerang lipid membran endoplasmic retikulum dengan kecepatan yang melebihi radikal bebas triklorometil. Selanjutnya, triklorometilperoksi menyebabkan peroksidasi lipid dan cedera sel hepar yang ditandai dengan peningkatan kadar ALP. Protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-AOP) berperan sebagai antioksidan mencegah kerusakan sel-sel hepar sehingga diharapkan mampu mencegah peningkatan kadar alkali fosfatase.



Keterangan :

- = merangsang
—| = menghambat

Gambar 2.4 Kerangka konseptual penelitian

2.9 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah:

- Protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-AOP) dapat mencegah peningkatan enzim alkali fosfatase pada tikus wistar yang diinduksi CCL₄.
- Terdapat pengaruh perbedaan pemberian dosis protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-AOP) dalam mencegah peningkatan kadar enzim alkali fosfatase pada tikus wistar yang diinduksi CCL₄.

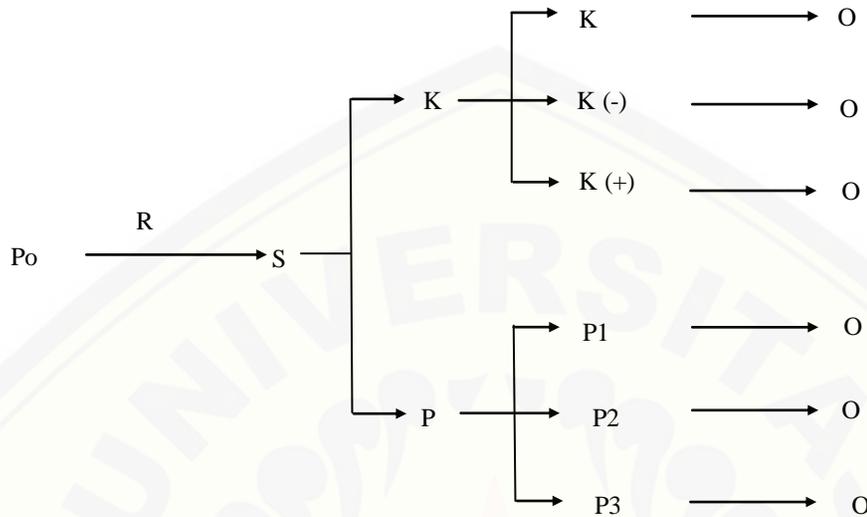
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui suatu gejala atau pengaruh yang timbul akibat adanya perlakuan tertentu (Notoatmodjo, 2005). Penelitian eksperimental memiliki tujuan utama untuk menyelidiki kemungkinan saling hubungan sebab akibat dengan cara mengadakan intervensi atau mengenakan perlakuan kepada satu atau lebih kelompok eksperimen, kemudian hasil dari intervensi tersebut dibandingkan dengan kelompok yang tidak dikenakan perlakuan (kelompok kontrol). Jenis penelitian yang digunakan adalah *True Experimental Laboratories* (Notoatmodjo, 2005).

3.2 Rancangan penelitian

Rancangan penelitian adalah *Post Test Only Control Group Design*. Rancangan ini termasuk penelitian *True Experimental*. Jenis rancangan penelitian ini adalah memilih kelompok penelitian yang dilakukan secara random baik kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan, setelah dipilih maka kelompok perlakuan dilakukan intervensi dan kelompok kontrol tidak, setelah itu baru diukur dilakukan posttest untuk dibandingkan kedua kelompok (Hidayat, 2010). Rancangan penelitian ditunjukkan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Rancangan penelitian

Keterangan

- Po : Populasi normal diet
- R : Randomisasi
- S : sampel normal diet
- K : Kelompok kontrol normal diet
- K (-) : Kelompok kontrol negatif dengan pemberian CCL₄ 1,5 ml/kgBB
- K (+) : Kelompok kontrol positif dengan pemberian Sigma-Aldrich® yang mengandung L-Glutation reduced minimum 99% dan CCL₄ 1,5 ml/kgBB
- P1 : Kelompok perlakuan dengan pemberian larutan protein biji melinjo terhidrolisis (*Gnetum gnemon Linn.*) dosis 10 mg/kgBB dan CCL₄ 1,5 ml/kgBB
- P2 : Kelompok perlakuan dengan pemberian larutan protein biji melinjo terhidrolisis (*Gnetum gnemon Linn.*) dosis 20 mg/kgBB dan CCL₄ 1,5 ml/kgBB
- P3 : Kelompok perlakuan dengan pemberian larutan protein biji melinjo terhidrolisis (*Gnetum gnemon Linn.*) dosis 30 mg/kgBB dan CCL₄ 1,5 ml/kgBB
- O : Pengukuran aktivitas alkali fosfatase (ALP) pada hari ke-8

3.3 Jumlah Sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian adalah tikus wistar. Sampel penelitian yang digunakan memiliki kriteria: tikus putih strain wistar, berbadan sehat, jenis kelamin jantan, berat badan 170-250 gram, usia 2-3 bulan (dewasa). Pemilihan sampel dilakukan dengan cara *simple random sampling*. Setelah dilakukan pemilihan, sampel dibagi menjadi 6 kelompok. Menurut Saidah (2009) penelitian eksperimen dengan rancangan acak lengkap, acak kelompok atau faktorial secara sederhana untuk estimasi jumlah pengulangan atau besar sampel dalam penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus Federer yaitu $(n-1)(t-1) \geq 15$.

Keterangan :

n : jumlah sampel tiap kelompok perlakuan

t : jumlah kelompok perlakuan

jika , $t=6$

maka $(n-1)(6-1) \geq 15$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

jumlah sampel yang digunakan minimal 4 ekor untuk tiap perlakuan.

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Departemen Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Jember untuk identifikasi Protein Biji melinjo (*Gnetum gnemon Linn.*), Laboratorium Biomedik Fisiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk melakukan kontrol dan perlakuan terhadap hewan coba, dan Laboratorium Parahita untuk uji pengukuran ALP. Penelitian ini dilakukan dari bulan Maret sampai Oktober 2013.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan adalah : (a) timbangan tikus; (b) rotavator; (c) gelas ukur dan *beaker glass*; (d) maserator; (e) kertas saring; (f) sonde; (g) tabung reaksi dan rak; (h) corong glass; (i) mikropipet 100-1000ul; (j) sentrifuge; (k) sput; (l) valkon dan mikrotube; (m) alat bedah minor; (n) *freeze dried*; (o) mortir.

3.5.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: (a) protein hidrolisis biji melinjo *Gnetum gnemon Linn* (Gg-AOP); (b) CCL₄ (Carbontetraclorida); (c) *Glutathione* (GSH); (d) Vitamin C; (e) Aquadest; (f) *cloroform*; (g) reagen alkali fosfatase; (h) 0,5 NaOH; (i) 0,5N HCL.

3.6 Variabel Penelitian

3.6.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah volume protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-AOP) yaitu 10 mg/kgBB, 20mg/kgBB dan 30mg/kgBB.

3.6.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar alkali fosfatase (ALP) pada tikus wistar.

3.6.2 Variabel Kendali

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah:

- a. Frekuensi pemberian CCL₄
- b. Frekuensi pemberian protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-AOP)

3.7 Definisi Operasional

3.7.1 Protein Biji Melinjo Hidrolisis (*Gnetum gnemon Linn.*)

Protein Gg-AOP adalah protein yang diperoleh dari ekstraksi biji melinjo (*Gnetum gnemon Linn*) yang telah melalui proses pengeringan, kemudian serbuk yang dihasilkan dilarutkan kedalam aquadest (perbandingan 1:3). Tahap selanjutnya, dilakukan pengisolasian protein dengan metode *isoelectricpresipitation* dan ditambahkan enzim alkalase (pembuatan ekstrak biji melinjo dan protein hidrolisis dapat dilihat di 3.10.1 dan 3.10.2). diambil volumenya sebesar 10 ul, 20ul, 30 ul. Larutan tersebut diberikan selama 7 hari pada masing-masing kelompok tikus.

3.7.2 Enzim Alkali Fosfatase

Alkali Fosfatase adalah enzim yang diproduksi terutama oleh epitel hepar dan osteoblas serta disekresikan melalui saluran empedu. Pemeriksaan kadar ALP menggunakan *Roche/Hitachi cobas c systems* dengan darah yang dibutuhkan sebanyak 3 ml yang diambil ventrikel kanan jantung tikus. Darah disentrifugasi dan diambil serum sebanyak 10 μ l dan dicampur dengan reagen ALP 500 μ l, kemudian dinilai *absorbance test* dengan *Colorimetric Assay*. Nilai normal kadar ALP tikus adalah 87-190 ($\pm 9,54$) U/L.

3.7.3 Dosis Larutan CCL₄

Dosis larutan CCL₄ yang digunakan adalah 1,5 ml/KgBB karena dosis tersebut mampu merusak sel-sel hati sehingga mengalami degenerasi dan nekrosis. CCL₄ diberikan pada dengan menggunakan sonde lambung yang diberikan sekali setelah perlakuan proteksi selama 7 hari.

3.7.4 Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus galur wistar berjenis kelamin jantan dengan berat badan sekitar 170-250 gram dan usia berkisar 2-3 bulan. Pemeliharaan tikus jantan galur wistar ditempatkan dalam kandang dengan diberi makanan dan minuman *ad libitum* sebelum diberi perlakuan.

3.8 Prosedur Kerja

3.8.1 Pembuatan Protein Hidrolisis Biji Melinjo

Bahan baku yang digunakan adalah biji melinjo berwarna merah penuh yang diperoleh dari daerah Jember. Kulit biji melinjo dihilangkan dan biji dikeringkan pada oven dengan suhu 40°C selama 18 jam. Biji kering dihilangkan lapisan yang kedua secara manual. Biji kering lapisan ketiga dihancurkan menjadi serbuk, kemudian disaring dengan menggunakan penyaring berukuran 100 mesh. Lemak pada tepung biji melinjo dihilangkan secara refluks dengan menggunakan n-Heksana dengan perbandingan 1:5 selama 3 jam diulang sebanyak 3 kali. Setelah dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, serbuk biji melinjo dilarutkan menggunakan air distilasi yang sudah diatur pH-nya antara 8-9 dengan menggunakan 2 N NaOH. Bahan yang tidak larut dipisahkan dengan menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Bagian terlarut dipisahkan dan selanjutnya diatur pH antara 8-9. Dilakukan lagi pemisahan dengan menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Protein yang dihasilkan dipresipitasikan dengan mengatur pH 4 menggunakan 1 N HCl, kemudian dibiarkan untuk mengendap pada suhu 4°C selama 24 jam dan selanjutnya dilakukan pemisahan dengan menggunakan sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Hasil endapan yang diperoleh dicuci 3 kali dengan air distilat pH 4. Protein yang terendapkan dilarutkan dengan air distilat dan diatur pH sampai 8 dengan menggunakan 2 N NaOH. Protein yang diperoleh dikeringkan dingin (*freeze dried*). (Siswoyo *et al.*, 2012).

Produksi protein terhidrolisis (protein Gg-AOP) dilakukan dengan menghidrolisis *isolate* protein (protein Gg-AOP) dengan menggunakan alkalase dengan perbandingan 0.2% (E/S) pada kondisi suhu 50°C pada pH 8 selama 7-8 jam, disertai pengadukan secara kontinu. Proses hidrolisis Gg-AOP oleh alkalase menghasilkan produk berupa campuran peptida dan asam-asam amino (Gg-AOP) melalui pemecahan ikatan peptida. Inaktivasi enzim dilakukan melalui inkubasi hidrolisat pada suhu 80°C selama 10 jam. Selanjutnya protein terhidrolisis yang terbentuk dipisahkan secara sederhana dengan sentrifugasi. Supernatan hidrolisat dipekatkan dengan cara pengeringan dingin hingga menjadi serbuk. Proses pengeringan dingin dapat mengatasi perubahan karakteristik hidrolisat yang tidak diinginkan, mencegah terjadinya penyusutan padatan dengan mempertahankan bentuk dan dimensi aslinya, meningkatkan stabilitas selama penyimpanan, mencegah kehilangan flavor, dan menghambat pertumbuhan bakteri (Siswoyo *et al.*, 2012).

3.8.2 Penentuan Daya Hepatotoksik CCL₄

Enam ekor tikus wistar jantan usia 2-3 bulan dengan berat sekitar 170-200 gram telah diadaptasikan selama 1 minggu dengan diberi makanan standart dan minuman. Masing –masing tikus diberi CCL₄ secara oral dengan volume 1,5 ml/kgBB pada waktu yang berbeda-beda (tanpa perlakuan;0 jam;12 jam;24 jam;48 jam;72 jam). Selanjutnya dilakukan pengukuran terhadap kadar alkali fosfatase dari darah tikus kemudian dilihat pada waktu berapa kadar alkali fosfatase (ALP) meningkat secara signifikan.

3.8. 3 Perlakuan Terhadap Hewan Coba

Sejumlah 34 ekor tikus jantan galur wistar ditempatkan dalam kandang dengan di beri makanan standar dan minum *ad libitum*. Setelah diadaptasikan selama tujuh hari, tikus dibagi dalam 6 kelompok terdiri dari 4 ekor yang dipilih secara acak. Masing-masing kelompok terdiri lima ekor yang di pilih secara acak. Setiap kelompok

kemudian diberikan perlakuan sekali sehari selama 8 hari dengan kriteria pemberian sebagai berikut.

1. Kelompok K : tikus diberi diet normal selama 7 hari
2. Kelompok K(-) : tikus diberikan diet normal selama 7 hari dan diberi CCL4 1,5 ml/kgBB secara peroral pada hari ke-7
3. Kelompok K (+) : tikus diberikan Sigma-Aldrich® yang mengandung *L-Glutation Reducedminimum* 99% dengan dosis selama 7 hari dan diberi dan diberi CCL4 1,5 ml/kgBB secara peroral pada hari ke-7
4. Kelompok PI : tikus diberikan protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-AOP) 10 mg/kgBB selama 7 hari dan diberi CCL4 1,5 ml/kgBB secara peroral pada hari ke-7
5. Kelompok P2 : tikus diberikan protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-AOP) 20 mg/kgBB selama 7 hari dan diberi CCL4 1,5 ml/kgBB secara peroral pada hari ke-7
6. Kelompok P3 : tikus diberikan protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-AOP) 30 mg/kgBB selama 7 hari dan diberi CCL4 1,5 ml/kgBB secara peroral pada hari ke-7

3.8.5 Pemeriksaan Kadar Alkali Fosfatase

Pemeriksaan kadar ALP dilakukan di Laboratorium Klinik Swasta Jember dengan menggunakan *Roche/Hitachi cobas c systems* rekomendasi dari *International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)*. Sampel yang digunakan yaitu (1) Serum, (2) Plasma: Li-heparin plasma. Prinsip pengujiannya menggunakan *Colorimetric Assay* yaitu dengan adanya ion magnesium dan zinc, p-nitrofenil fosfat akan dipecah oleh fosfatase menjadi fosfat dan p-nitrofenol. *ALP* p-nitrofenil fosfat + H₂O fosfat + p-nitrofenol. P-nitrofenol yang dihasilkan berbanding lurus dengan aktivitas ALP katalitik. Kadar ALP ditentukan dengan mengukur peningkatan absorbansinya.

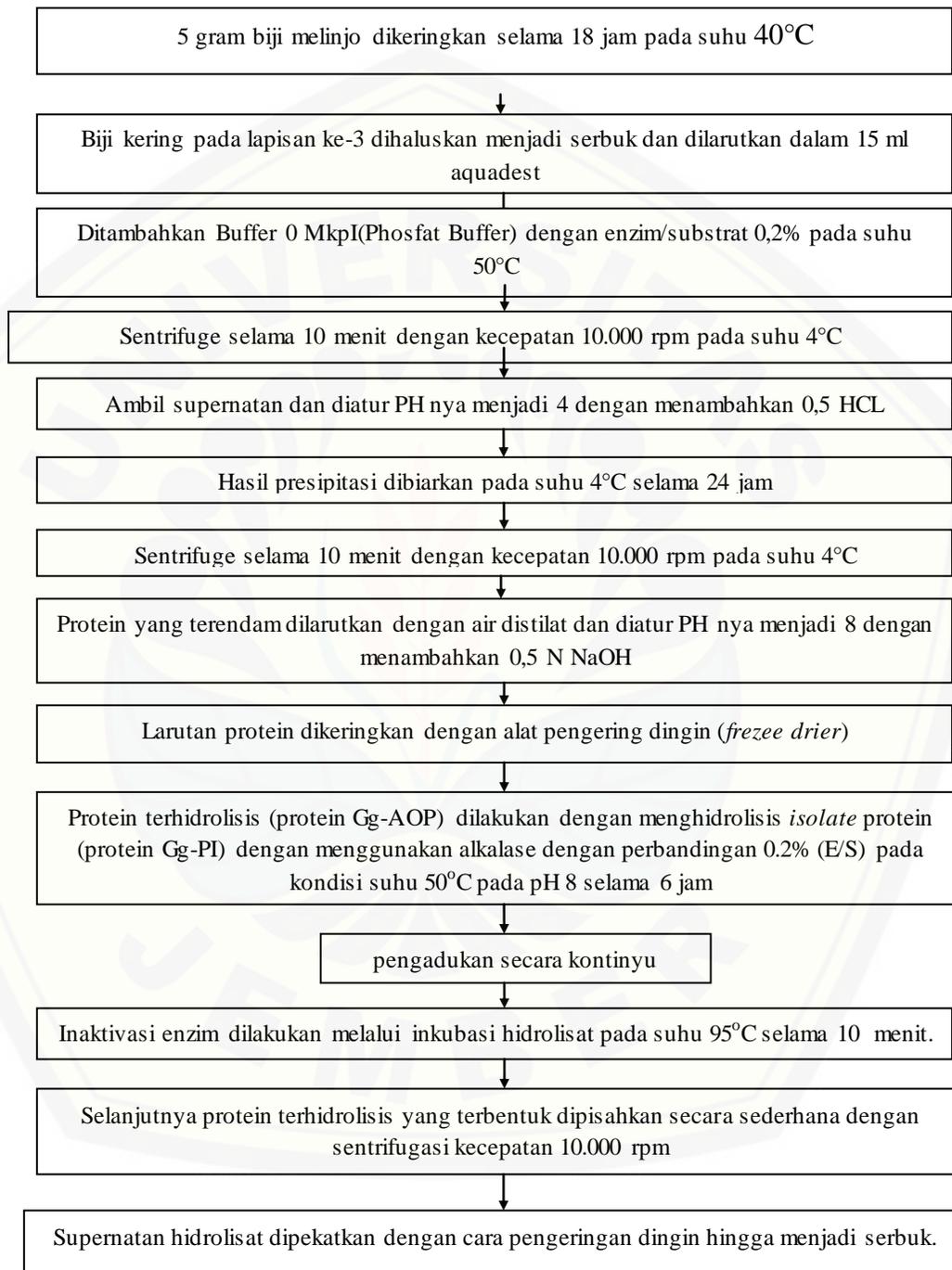
Sampel sebelum dilakukan pengujian di sentrifus dan diambil serumnya. Reagen yang digunakan yaitu 2-amino-2-metil-1-propanol: 1,724 mol/L, pH 10,44 (30°C); magnesium asetat: 3,83 mmol/L; zinc sulfat: 0,766 mmol/L; N-(2-hidoksietil)-etilenediami triacetic acid: 3,83 mmol/L dan p-nitrofenil fosfat: 132,8 mmol/L, pH 8,44 (30°C). Hasil dari kadar ALP dinyatakan dalam satuan unit/liter (U/L) dan jika menggunakan *Roche/Hitachi cobas c systems* akan dikonversikan dengan rumus $(U/L \times 0,0167 = \mu\text{kat/L})$. Nilai normal ALP pada tikus berkisar antara 87-190 ($\pm 9,54$) U/L.

3.9 Analisis Data

Analisis data secara statistik pada penelitian ini menggunakan software khusus statistik. Data yang diperoleh di lakukan uji normalitas dan homogenitas varians $p > 0,005$. Jika data yang di peroleh homogen, maka dilanjutkan uji *One Way ANOVA* dengan angka kepercayaan 95% ($p < 0,05$). Jika data yang diperoleh terdapat perbedaan nyata antara kelompok kontrol dan perlakuan, maka dilanjutkan dengan uji *LSD (Least Significantly Different)* dengan angka kepercayaan 95% ($p < 0,05$). Apabila data yang diperoleh tidak homogen, maka dilakukan uji *Kruskal Wallis* dengan angka kepercayaan 95% ($p < 0,05$) dan apabila terdapat perbedaan makan di lanjutkan dengan uji *Mann Whitney* (Hidayat, 2010).

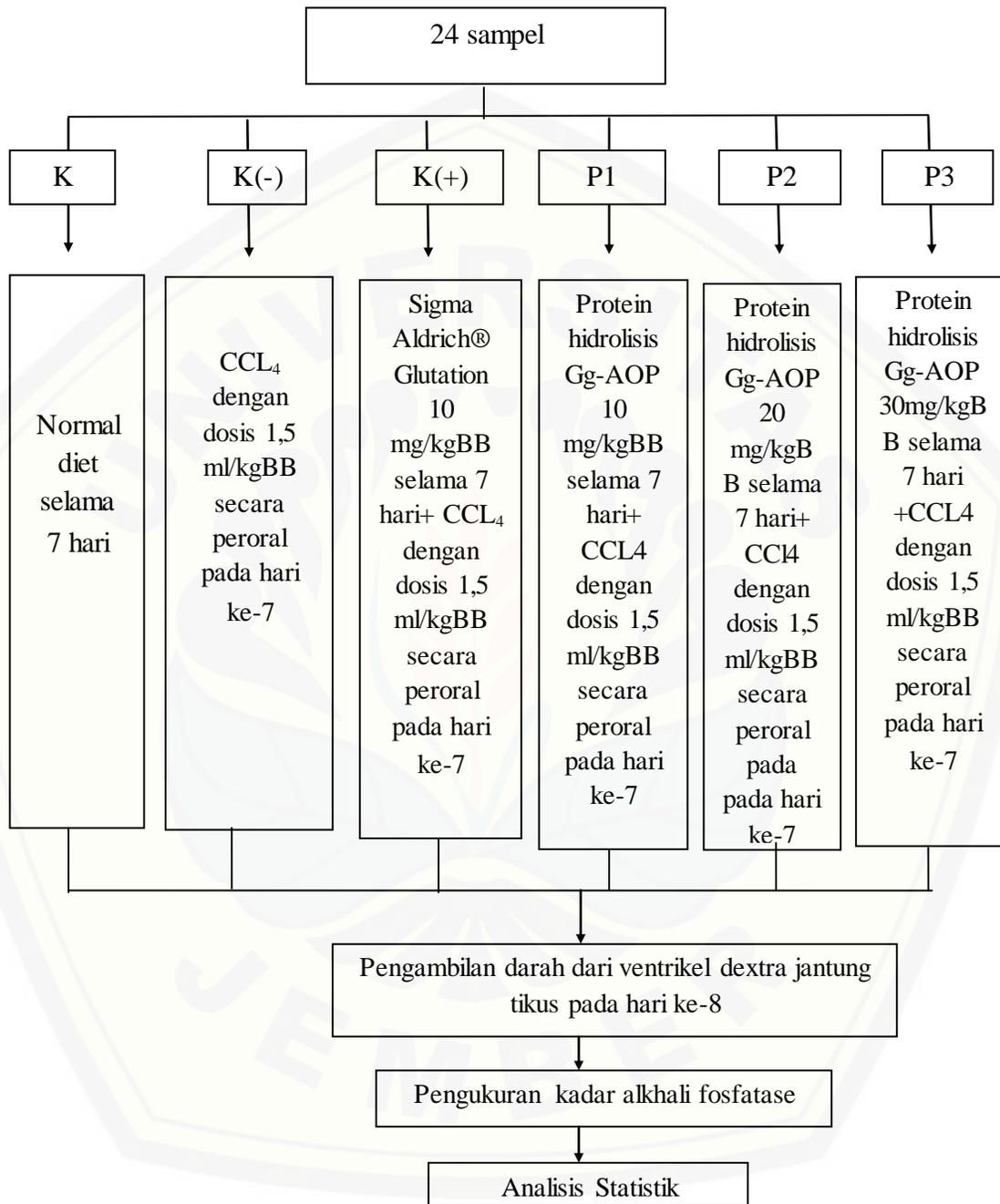
3.10 Alur penelitian

3.10.1 Skema Pembuatan Ekstrak dan Pengisolasian Protein Hidrolisis Biji Melinjo



Gambar.3.2 Skema Pembuatan Estrak dan Pengisolasian Protein Hidrolisis Biji Melinjo

3.10.2 Skema Perlakuan Terhadap Hewan Coba



Gambar 3.3 Skema Perlakuan Hewan Coba