



**UJI EFEKTIVITAS PROTEIN BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon L.*)  
TERHIDROLISIS SEBAGAI HEPATOPROTEKTOR TERHADAP  
RADIKAL BEBAS DALAM MENCEGAH PENINGKATAN KADAR SGOT  
DAN SGPT TIKUS WISTAR YANG DIINDUKSI CCL<sub>4</sub>**

**SKRIPSI**

Oleh

**Nurul Wahidah Adeatma  
NIM 102010101074**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2014**



**UJI EFEKTIVITAS PROTEIN BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon L.*)  
TERHIDROLISIS SEBAGAI HEPATOPROTEKTOR TERHADAP  
RADIKAL BEBAS DALAM MENCEGAH PENINGKATAN KADAR SGOT  
DAN SGPT TIKUS WISTAR YANG DIINDUKSI CCL<sub>4</sub>**

**SKRIPSI**

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

Oleh

**Nurul Wahidah Adeatma  
NIM 102010101074**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2014**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT atas limpahan rahmat, hidayah, dan inayah-Nya yang tidak pernah putus, beserta Nabi Muhammad SAW yang selalu jadi panutan dalam menapaki setiap tangga kehidupan;
2. Orang tuaku tercinta, Ibunda Syamsinar S.SOS dan Ayahanda Ahmad S.SOS.M.AP, 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. Guru-guruku tercinta yang telah mendidik dengan penuh kesabaran mulai dari Taman Kanak-kanak hingga Perguruan Tinggi;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

**MOTO**

Sesungguhnya bersama kesulitan itu ada kemudahan "Inna ma'al usri yusrooh"  
(Terjemahan Surat al-Insan ayat 6)\*)



---

\*) Yayasan Penyelenggara Penterjemah Al-Qur'an. 1989. *Al-Qur'an dan Terjemahnya*. Surabaya: Mahkota

## PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Nurul Wahidah Adeatma

NIM : 102010101074

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul: *Uji Efektivitas Protein Biji Melinjo (Gnetum gnemon L.) Terhidrolisis sebagai Hepatoprotektor terhadap Radikal Bebas dalam Mencegah Peningkatan Kadar SGOT dan SGPT Tikus Wistar yang Diinduksi CCl<sub>4</sub>* 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,

Nurul Wahidah Adeatma  
NIM 102010101074

**SKRIPSI**

**UJI EFEKTIVITAS PROTEIN BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon L.*)  
TERHIDROLISIS SEBAGAI HEPATOPROTEKTOR TERHADAP  
RADIKAL BEBAS DALAM MENCEGAH PENINGKATAN KADAR SGOT  
DAN SGPT TIKUS WISTAR YANG DIINDUKSI CCL<sub>4</sub>**

Oleh

Nurul Wahidah Adeatma  
NIM 102010101074

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 L.) Terhidrolisis Sebagai Hepatoprotektor Terhadap Radikal Bebas dalam Mencegah Peningkatan Kadar SGOT dan SGPT Tikus Wistar yang Diinduksi CCl<sub>4</sub>* 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,

dr. Ali Santosa, Sp.PD  
NIP. 195909041987011001

Penguji III,

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

Penguji II,

dr. Dini Agustina, M.Biomed  
NIP. 19830812008122003

Penguji IV,

dr. Hairrudin, M.Kes  
NIP. 19751011200312100 8

Mengesahkan,  
Ketua Fakultas Kedokteran Universitas Jember

dr. Enny Suswati, M.Kes  
NIP. 197002141999032001

## RINGKASAN

**Uji Efektivitas Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Terhidrolisis sebagai Hepatoprotektor terhadap Radikal Bebas dalam Mencegah Peningkatan Kadar SGOT dan SGPT Tikus Wistar Yang Diinduksi CCl<sub>4</sub>; Nurul Wahidah Adeatma: 102010101074; 63 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.**

Hati adalah organ intestinal terbesar dalam tubuh dengan berat 1,2 - 1,8 kg dan pusat metabolisme dengan fungsi yang sangat kompleks, diantaranya hati berperan untuk aktivitas sintesis, katabolik dan detoksifikasi. Berdasarkan peranannya ini, hati berpotensi mengalami kerusakan karena terpapar bahan kimia, toksik, dan bahan lainnya. Salah satu yang menyebabkan kerusakan hati akibat bahan kimia adalah Karbon tetraklorida (CCl<sub>4</sub>). Karbon tetraklorida digunakan sebagai model induktor terjadinya kerusakan hati akibat radikal bebas yang ditandai dengan peningkatan kadar SGOT dan SGPT. Dalam proses perlindungan hati yang disebabkan oleh radikal bebas diperlukan suatu proteksi berupa antioksidan. Salah satu tanaman yang memiliki aktivitas antioksidan secara *in vitro* adalah Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.). Pengembangan teknologi atau inovasi dalam meningkatkan aktifitas dari protein biji melinjo melalui rekayasa atau hidrolisis protein secara kimia, fisik, dan biologi (enzimatik).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek protein Gg-AOP biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhidrolisis dalam mencegah peningkatan kadar SGOT dan SGPT tikus wistar yang diinduksi CCl<sub>4</sub>. 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 CCl<sub>4</sub> 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 CCl<sub>4</sub> 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 diberikaan CCl<sub>4</sub> 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 SGOT dan SGPT. Kemudian data dianalisis dengan menggunakan *Kruskal Wallis* dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*.

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa protein Gg-AOP terhidrolisis mampu mencegah peningkatan kadar SGOT dan SGPT tikus wistar yang diinduksi CCl<sub>4</sub>. Protein Gg-AOP terhidrolisis dosis 30 mg/kgBB memiliki efek paling kuat dalam mencegah peningkatan kadar SGOT dan SGPT.

## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat ALLAH SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul *Uji Efektivitas Protein Biji Melinjo (Gnetum gnemon Linn.) Terhidrolisis sebagai Hepatoprotektor terhadap Radikal Bebas dalam Mencegah Peningkatan Kadar SGOT dan SGPT Tikus Wistar yang Diinduksi CCl<sub>4</sub>*. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. dr. Enny Suswati, M.Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas segala fasilitas dan kesempatan yang diberikan selama menempuh pendidikan kedokteran di Universitas Jember;
2. Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D., selaku Dosen Pembimbing I dan dr. Hairrudin, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing II yang telah banyak membantu dan meluangkan waktu, pikiran dan perhatiannya untuk membimbing penulisan skripsi;
3. dr. Sugiyanta, M.Ked., selaku Dosen Pembimbing Akademik dan koordinator KTI yang telah menyetujui penyusunan skripsi ini;
4. dr. Ali Santoso, Sp.PD., selaku tim penguji I dan dr. Dini Agustina, M.Biomed, selaku tim penguji II yang telah meluangkan waktu untuk menguji skripsi ini;
5. Orang tuaku dan adik-adikku tercinta yang telah memberikan dorongan dan doa demi terselesaikannya skripsi ini;
6. Program Insentif Riset Sinergis Nasional (SINas) Kemenristek RI yang telah mendanai penelitian ini;
7. Sahabat-sahabatku Ika, Ria, Nila, Yeni, Tari, Mbak Icha, Mas Dian terima kasih atas dukungan dan nasehat-nasehatnya;

8. Anggota Laboratorium Analisis Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Jember yang senantiasa menerima dan mendukung dengan baik;
9. Teman-teman angkatan 2010 yang selalu saling mendukung dan menjadi teman seperjuangan demi mendapatkan gelar sarjana kedokteran;
10. Teknisi Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, terimakasih atas bantuan dan kerja samanya selama penelitian;
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 12 Mei 2014

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	i
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	vi
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>PRAKATA</b> .....	x
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xvi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xvii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1. Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2. Rumusan Masalah</b> .....	4
<b>1.3. Tujuan Penelitian</b> .....	4
<b>1.4. Manfaat Penelitian</b> .....	5
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
<b>2.1 Melinjo (<i>Gnetum gnemon. L</i>)</b> .....	6
2.1.1. Taksonomi .....	6
2.1.2. karakteritis tanaman .....	7
2.1.3. Kandungan kimia .....	8
2.1.4. Kandungan Nutrisi .....	8
<b>2.2 Hati</b> .....	9

2.2.1 Anatomi .....	10
2.2.2 Fungsi Hati .....	11
<b>2.3 Radikal Bebas</b> .....	14
2.3.1. CCl <sub>4</sub> Sumber Radikal Bebas .....	18
<b>2.4 Antioksidan</b> .....	20
2.4.1 Sumber Antioksidan .....	21
2.4.2 Mekanisme kerja Antioksidan.....	23
<b>2.5 Gluthation</b> .....	24
<b>2.6 Diagnosis Enzimatik Hati</b> .....	26
2.6.1 Serum Glutamic Oxaloacetic Trasminase (SGOT).....	27
2.6.2 Serum Piruvat Oxaloacetic Trasminase (SGPT).....	28
<b>2.7 Kerangka Konseptual Penelitian</b> .....	30
<b>2.8 Hipotesis Penelitian</b> .....	31
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	32
<b>3.1 Jenis Penelitian</b> .....	32
<b>3.2. Rancangan Penelitian</b> .....	32
<b>3.3. Jumlah Sampel</b> .....	34
<b>3.4 Tempat dan Waktu Penelitian</b> .....	35
<b>3.5 Alat dan Bahan</b> .....	35
3.5.1 Alat .....	35
3.5.2 Bahan .....	35
<b>3.6 Variabel Penelitian</b> .....	35
3.6.1 Variabel Bebas.....	35
3.6.2 Variabel Terikat.....	36
3.6.3 Variabel Kendali.....	36
<b>3.7 Definisi Operasional</b> .....	36
<b>3.8 Prosedur Kerja</b> .....	37

3.8.1 Pembuatan Biji Melinjo Terhidrolisis .....	37
3.8.2 Penentuan Daya hepatotoksik CCl <sub>4</sub> .....	39
3.8.3 Perlakuan Terhadap Hewan Coba .....	39
3.8.5 Pemeriksaan Kadar SGOT dan SGPT .....	40
<b>3.9 Analisis Data</b> .....	42
<b>3.10 Alur Penelitian</b> .....	43
3.10.1 Skema Pembuatan Ekstrak dan Pengisolasian .....	
Protein hidrolisis Gg-AOP .....	43
3.10.2 Skema Perlakuan Terhadap Hewan Coba.....	44
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	45
<b>4.1 Hasil Penelitian</b> .....	45
4.1.1 Hasil Pemeriksaan Kadar SGOT dan SGPT .....	45
4.1.2 Analisis Data.....	47
<b>4.2 Pembahasan</b> .....	50
<b>BAB 5. PENUTUP</b> .....	55
<b>5.1 Kesimpulan</b> .....	55
<b>5.2 Saran</b> .....	55
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	

**DAFTAR TABEL**

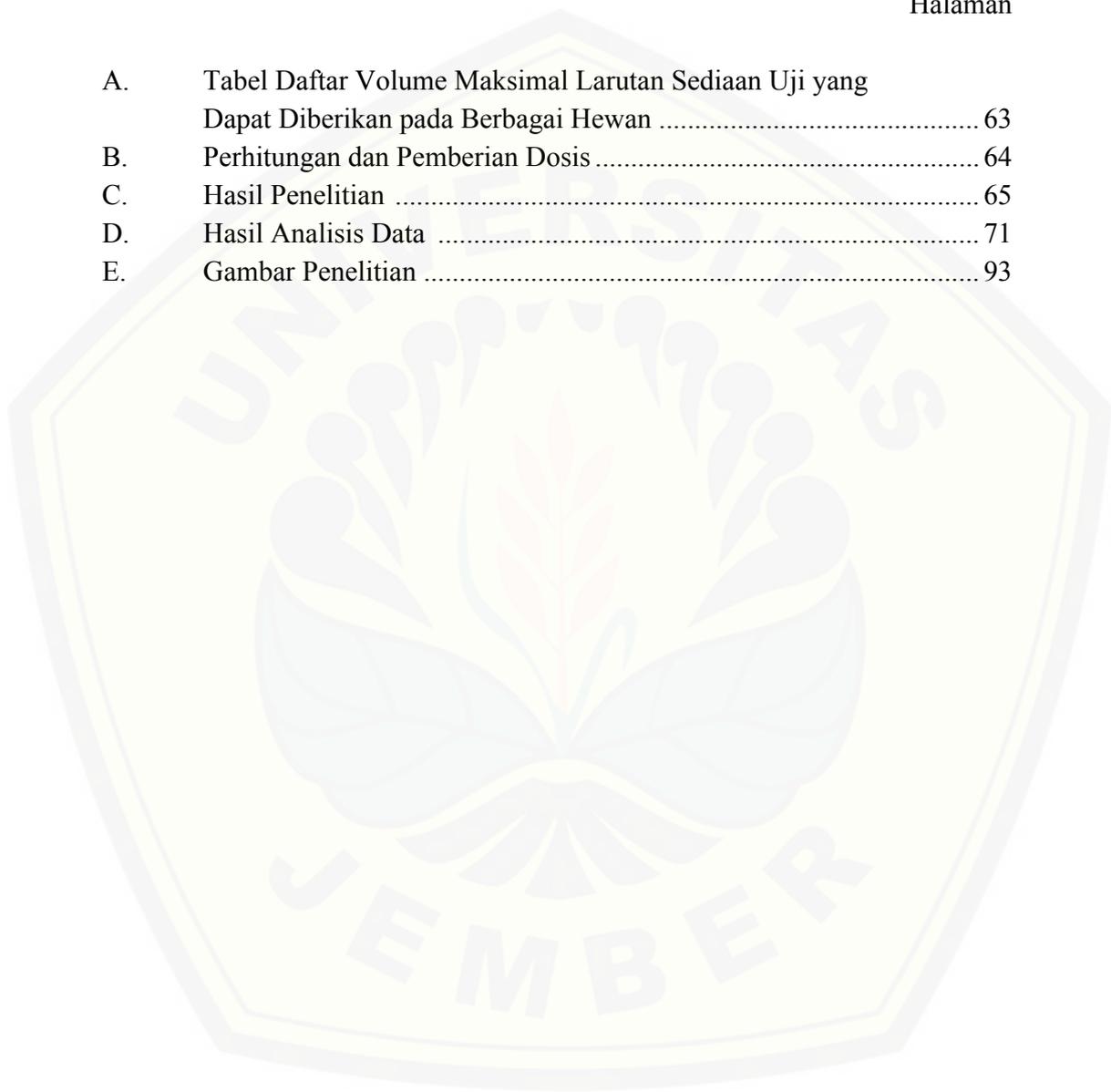
	Halaman
2.1 Kandungan Gizi Biji Melinjo .....	9
4.1 Rata-rata Kadar SGOT dan SGPT .....	45
4.2 Presentase Pencegahan Kenaikan kadar Rata-rata SGOT dan SGPT .....	47
4.3 Hasil Uji Mann-Whitney Kadar SGOT .....	48
4.4 Hasil Uji Mann-Whitney Kadar SGPT .....	49

**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1 Tanaman Melinjo ( <i>Gnetum gnemon</i> L.) .....	6
2.2 Mekanisme Peroksidasi .....	19
2.3 Kerangka Konseptual Penelitian .....	30
3.1 Rancangan Penelitian .....	43
3.2 Skema Pembuatan Ekstrak dan Pengelolaan Protein Gg-AOP .....	44
3.3 Skema Perlakuan Hewan Coba .....	46
4.1 Grafik Perbandingan Nilai Rata-rata Kadar SGOT dan SGPT Tikus .....	44

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
A. Tabel Daftar Volume Maksimal Larutan Sediaan Uji yang Dapat Diberikan pada Berbagai Hewan .....	63
B. Perhitungan dan Pemberian Dosis .....	64
C. Hasil Penelitian .....	65
D. Hasil Analisis Data .....	71
E. Gambar Penelitian .....	93



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Hati adalah organ pencernaan terbesar di tubuh dengan berat 1,2 - 1,8 kg dan merupakan pusat metabolisme tubuh dengan fungsi yang sangat kompleks (PAPDI, 2006). Hati memiliki berbagai macam fungsi, Fungsi utama hati adalah pembentukan dan ekskresi empedu. Selain itu, hati juga memiliki fungsi dalam metabolisme karbohidrat, protein, lemak, hormon, dan zat kimia asing (Guyton and Hall, 2008).

Kerusakan hati dapat disebabkan oleh infeksi maupun aktifitas senyawa kimia yang masuk kedalam tubuh dengan berbagai macam mekanisme. Kerusakan hati diawali dengan meningkatnya steatosis dan fibrosis pada hati, jika kondisi kronis dapat menyebabkan kematian. Fungsi detoksifikasi sangatlah penting dan dikatalisis oleh enzim-enzim hati melalui reaksi oksidasi, reduksi, hidrolisis, atau konjugasi zat-zat yang berbahaya dan mengubahnya menjadi zat yang secara fisiologi tidak aktif (Prince dan Wilson, 2005).

Senyawa kimia yang menyebabkan kerusakan hati salah satunya adalah Karbon tetraklorida ( $\text{CCl}_4$ ), sifat toksik  $\text{CCl}_4$  telah terbukti dari beberapa penelitian, bahwa dosis yang kecil sekalipun dapat menimbulkan efek pada berbagai organ tubuh termasuk susunan saraf pusat, hepar, ginjal, dan peredaran darah. Efek toksik  $\text{CCl}_4$  yang paling terlihat adalah pada hepar walaupun juga merusak organ-organ lain. Kerusakan pada sel hepar akibat obat-obatan dan zat kimia dapat berupa nekrosis sel hepar (hepatosit), kolestasis, gangguan sintesis protein, dan terjadinya akumulasi lemak dalam sel (steatosis). Pada prinsipnya kerusakan sel hepar akibat pemberian  $\text{CCl}_4$  disebabkan oleh pembentukan radikal bebas, peroksidasi lemak dan penurunan aktivitas enzim-enzim antioksidan (Simanjuntak, 2007).

Karbon tetraklorida ( $\text{CCl}_4$ ) dimetabolisme oleh sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) didalam retikulum endoplasmik hati menjadi radikal bebas triklorometil ( $\text{CCl}_3^*$ ).

Triklorometil dengan oksigen akan membentuk radikal triklorometilperoksi yang dapat menyerang lipid membran retikulum endoplasmik dengan kecepatan yang melebihi radikal bebas triklorometil. Selanjutnya, triklorometilperoksi menyebabkan peroksidasi lipid sehingga mengganggu homeostasis  $\text{Ca}^{2+}$  dan akhirnya menyebabkan kematian sel. Keadaan ini dapat mengakibatkan gangguan fungsi hepar dan homeostasis metabolisme (Panjaitan *et al.*, 2007).

Radikal bebas didefinisikan sebagai molekul atau senyawa yang mempunyai satu atau lebih elektron bebas yang tidak berpasangan. Elektron dari radikal bebas yang tidak berpasangan reaktif dan mudah menarik elektron dari molekul lain, reaksi radikal bebas dapat menyebabkan terjadinya reaksi berantai. Radikal bebas dapat dinetralkan dengan antioksidan. Antioksidan menghambat oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif yang relatif aktif stabil (Sofia, 2004). Konsumsi antioksidan diperlukan untuk proses perlindungan hati dari zat-zat hepatotoksik, dan mengikat radikal bebas yang berlebihan. Banyak obat-obatan alami atau herbal yang memiliki senyawa antioksidan yang telah direkomendasikan sebagai pencegahan dan pengobatan penyakit hati akibat radikal bebas (Valco *et al.*, 2006).

Antioksidan adalah senyawa yang melindungi sel melawan radikal bebas seperti radikal superoksida, radikal hidroksil, radikal alkoksil, radikal peroksil, nitrogen dioksida, dan peroksinitrit. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif (Chevion *et al.*, 2003)

Gangguan fungsi hati dapat dideteksi dengan pemeriksaan fungsi hati, salah satunya adalah pemeriksaan kadar *Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase (SGOT)* dan *Serum Glutamic pyruvic Transaminase (SGPT)*. Peningkatan kadar SGOT dan SGPT biasanya mengarah pada perlukaan hepatosit dan inflamasi (PAPDI, 2006). Kenaikan kadar SGOT dan SGPT dapat disebabkan oleh sel-sel hati

yang kaya akan transaminase mengalami nekrosis. Enzim tersebut kemudian masuk ke dalam darah sehingga kadar enzim dalam serum meningkat (Sutanudjaja, 2009).

Kedua aminotransferase tersebut normalnya ada dalam darah dalam konsentrasi rendah kurang dari 30-40 IU/L (Kaplan, 1993). Dari beberapa studi yang telah dilakukan, SGOT dan SGPT dapat meningkat kadarnya 10-500 kali lipat (Zimmermann dan Maddrey, 1993).

Dalam proses perlindungan hati dari zat-zat hepatotoksik, diperlukan suatu proteksi tambahan melalui konsumsi antioksidan untuk mengikat radikal bebas yang berlebihan yang dapat mengganggu mekanisme pencegahan kerusakan hati secara alami. Banyak obat-obatan alami atau herbal yang memiliki senyawa antioksidan dan telah direkomendasikan sebagai pencegahan dan pengobatan penyakit hati akibat radikal bebas (Hermawan, 2009).

Penggunaan obat-obatan herbal sebagai *complementary and Alternative Medicines (CAM)* sudah menjadi terobosan di dunia kesehatan moderen. Gerakan *back to nature* atau kembali ke alam yang dilakukan masyarakat meningkatkan peranan tanaman obat dalam pola konsumsi masyarakat. Ada banyak bahan pangan yang dapat menjadi sumber antioksidan alami, misalnya : rempah-rempah, teh, sereal, sayur-sayuran dan protein (Sarastani, 2002).

Salah satu sumber antioksidan berasal dari tanaman melinjo, diketahui mengandung senyawa antioksidan yang cukup tinggi, sehingga sangat reaktif terhadap radikal bebas penyebab berbagai macam penyakit. Selain itu melinjo juga berpotensi sebagai antimikroba alami yang artinya melinjo juga bisa dipakai sebagai pengawet alami makanan sekaligus obat untuk penyakit yang disebabkan oleh bakteri (Kato *et al.*, 2007).

Beberapa kandungan dari biji melinjo yaitu kalori, lemak, karbohidrat, air, kalsium, dan protein. Protein adalah polipeptida yang sangat penting untuk pertumbuhan dan pemeliharaan sel tubuh (Belinda *et al.*, 2009).

Dari hasil penelitian sebelumnya melaporkan bahwa protein dari biji melinjo mempunyai potensi aktif sebagai antioksidan. Komposisi kandungan biji melinjo

(*Gnetum gnemon L*) terdiri dari 58% pati, 16,4% lemak, 9-10% protein dan 1% phenolik, kandungan protein pada biji melinjo sebagai sumber protein fungsional alami. Dari hasil penelitian diharapkan ini dilakukan pengembangan teknologi atau inovasi dalam meningkatkan hasil dari protein melinjo dengan melakukan rekayasa atau terhidrolisis protein secara kimia, fisik, dan biologi (enzimatik) sehingga upaya untuk memperoleh dan memproduksi protein generasi baru dari *Gnetum gnemon L* terhidrolisis dengan aktifitas tinggi dapat dilakukan (Siswoyo, 2007).

Berdasarkan latar belakang urain diatas, diperlukan suatu penelitian mengenai uji efektivitas protein biji melinjo (*Gnetum gnemon L*) terhidrolisis sebagai hepatoprotektor terhadap kadar SGOT dan SGPT tikus wistar yang diinduksi CCL<sub>4</sub>.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah protein (Gg-AOP) ekstrak biji melinjo (*Gnetum gnemon L*) terhidrolisis dapat digunakan dalam mencegah peningkatan kadar SGOT dan SGPT pada tikus wistar yang di induksi CCL<sub>4</sub> ?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

### 1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui efek protein ekstrak biji melinjo (*Gnetum gnemon L*) terhidrolisis dalam mencegah peningkatan kadar SGOT dan SGPT pada tikus wistar yang di induksi CCL<sub>4</sub>

### 1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh perbedaan pemberian dosis protein Gg-AOP dalam melindungi hepar terhadap radikal bebas yang diakibatkan pemberian CCl<sub>4</sub>.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah

- 1) Menambah wawasan dan pengetahuan dibidang penggunaan nutrisitikal mengenai manfaat biji melinjo terhidrolisis.
- 2) Memberikan informasi kepada masyarakat tentang protein biji melinjo (*Gnetum gnemon L.*) terhidrolisis sebagai alternatif hepatoprotektor yang disebabkan oleh radikal bebas.
- 3) Sebagai dasar untuk penelitian-penelitian selanjutnya.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tanaman Melinjo (*Gnetum gnemon L.*)

Di Indonesia, melinjo merupakan tanaman yang tumbuh tersebar dimana-mana, banyak ditemukan di tanah-tanah pekarangan rumah penduduk pedesaan dan halaman-halaman penduduk di kota. Tanaman melinjo (*Gnetum gnemon L.*) termasuk tumbuhan berbiji terbuka (*Gymnospermae*), tidak terbungkus daging tetapi terbungkus kulit luar. Bila tidak dipangkas, tanaman melinjo bisa mencapai ketinggian 25 m dari permukaan tanah. Tanaman melinjo dapat tumbuh pada tanah-tanah liat atau lempung, berpasir dan berkapur, tetapi tidak tahan terhadap tanah yang tergenang air atau yang berkadar asam tinggi dan dapat tumbuh dari ketinggian 0 - 1.200 mdpl. Lahan yang akan ditanami melinjo harus terbuka atau terkena sinar matahari (Asri, 2010).



Gambar2.1 Tanaman melinjo (Verheij, et al., 1992)

#### 2.1.1 Klasifikasi Ilmiah Tanaman Melinjo (*Gnetum gnemon L.*)

Melinjo merupakan tumbuhan yang termasuk ke dalam suku/famili *Gnetaceae* dan merupakan tumbuhan berbiji terbuka (*Gymnospermae*). Tanaman melinjo dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Regnum : *Plantae*

Divisi : *Spermatophyta* (tumbuhan berbiji)

Sub Divisi : *Gymnospermae* (berbiji terbuka)

Kelas : *Gnetopsida*  
Ordo : *Gnetales*  
Famili : *Gnetaceae*  
Genus : *Gnetum*  
Spesies : *Gnetum gnemon L.*

(Tjitrosoepomo, 2004).

### 2.1.2 Karakteristik Tanaman

Tanaman *Gnetum gnemon L.* Berasal dari Assam (India utara bagian selatan) menyebar ke bagian selatan melalui Melanesia menuju Fiji. Tanaman ini terdapat di Assam, Cambodia, Vietnam, Thailand, Malaysia, Tanjung dan kepulauan Malaya, Fiji, Papua New Guinea, kepulauan Solomon (Santa Anna), and Vanuatu (Pentecost, Ambae, Maewo, Torres Islands). Tanaman ini biasanya di temukan sepanjang sungai dan aliran sungai kecil, baik sebagai tanaman peliharaan maupun ekosistem alami. *Gnetum gnemon* juga merupakan tanam asli Vanuatu walaupun jarang dan Samoa. Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) atau dalam bahasa Sunda disebut Tangkil adalah suatu spesies tanaman berbiji terbuka (Gymnospermae) berbentuk pohon yang berumah dua (*dioecious*, ada individu jantan dan betina). Melinjo dikenal pula dengan nama *belinjo*, *mlinjo* (bahasa Jawa), *tangkil* (bahasa Sunda) atau *bago* (bahasa Melayu dan bahasa Tagalog) (Anonim, 2009).

Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) merupakan tumbuhan berukuran kecil sampai sedang yang dapat mencapai tinggi 10-15 meter dan diameter batang mencapai 40 cm. Cabang pohon melinjo (*Gnetum gnemon*) terlihat jelas membengkak dibagian dasar. Pohon melinjo (*Gnetum gnemon*) berukuran kecil dengan batang utama berbentuk lurus (Manner *et al.*, 2006).

Daun melinjo (*Gnetum gnemon*) berwarna hijau tua, mengkilat, halus, tajam di kedua ujungnya, tersusun berseberangan, dan bervariasi dalam ukuran dan bentuknya. Ukuran panjang daun yaitu 10-20 cm dan lebarnya 4-7 cm. Bentuk daun

yaitu elips dan segiempat agak oval. Cabang tumbuh terus dan berbunga sepanjang tahun (Manner *et al.*, 2006).

Buah melinjo (*Gnetum gnemon*) berwarna kuning, berubah menjadi merah atau oranye kemerahan saat sudah matang, berbentuk ovoid, panjang 1-3,5 cm. kulit buahnya tipis (lihat Gambar 2.3). Di Indonesia, melinjo (*Gnetum gnemon*) berbuah 3 kali dalam setahun, yaitu pada bulan Maret-April, Juni-Juli, dan September-Oktober (Cadiz and Florido, 2001).

### 2.1.3 Kandungan kimia

Tanaman *Gnetum gnemon* L 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 di temukan menunjukkan karakteristik yang berbeda dengan yang di temukan pada famili Dipterocarpaceae (Sri, 2006).

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, doktor biokimia dari 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*) (Adolf *et al.*, 2011).

### 2.1.4 Kandungan Nutrisi

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. Protein utamanya

berukuran 30 kilo Dalton yang amat efektif untuk menghabiskan radikal bebas yang menjadi penyebab berbagai macam penyakit. 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 yang diisolasi dari biji melinjo diindikasikan punya potensi aktif menghambat beberapa jenis bakteri gram positif dan negatif (Siswoyo, 2010).

Tabel 2.1 Kandungan Gizi Melinjo

<b>Kandungan Unsur Gizi</b>	<b>Daun Melinjo</b>	<b>Biji Melinjo</b>	<b>Tangkil</b>
Kalori (kal)	99	345	66
Protein (g)	5,0	12,0	5,0
Lemak (g)	1,3	1,5	1,7
Karbohidrat (g)	21,3	71,5	13,3
Air (g)	70,8	13,0	80,0
Vitamin A (SI)	10.000,00	0	1.000,00
Kalsium	219	100	163

Sumber: Direktorat Gizi Departemen Kesehatan RI (1996).

## 2.2 Organ Hati

Hati merupakan organ yang cukup besar dan penting pada tubuh kita. Bagian yang penting pada hati ini terdiri dari hepatosit, yang merupakan sel epitel dengan konfigurasi yang unik. Pada dasarnya liver ini merupakan kelenjar eksokrin, oleh karena mensekresi cairan empedu yang di alirkan ke dalam duodenum. Selain itu juga merupakan kelenjar endokrin dan penyaring darah. Hati juga memiliki berbagai macam enzim yang berfungsi untuk memetabolisme senyawa xenobiotik (terutama sitokrom-450) sehingga senyawa yang sebelumnya toksin menjadi tidak terlalu toksin bagi tubuh, larutan air, dan mudah di ekskresikan (Lu, 2010).

### 2.2.1 Anatomi Hati

Hati adalah organ yang terbesar yang terletak disebelah kanan atas rongga perut dibawah diafragma. Beratnya 1.500 gr atau 2,5 % dari berat badan orang dewasa normal. Pada kondisi hidup berwarna merah tua karena kaya akan persediaan darah. Hati terbagi menjadi lobus kiri dan lobus kanan yang dipisahkan oleh ligamentum falciforme. Lobus kanan hati lebih besar dari lobus kirinya dan mempunyai 3 bagian utama yaitu : lobus kanan atas, lobus caudatus, dan lobus quadratus. Setiap lobus dibagi menjadi lobuli. Setiap lobulus merupakan badan heksagonal yang terdiri atas lempeng-lempeng sel hati berbentuk kubus mengelilingi vena sentralis. Diantara lempengan terdapat kapiler yang disebut sinusoid yang dibatasi sel kupffer. Sel kupffer berfungsi sebagai pertahanan hati (Price, 2006). Sistem biliaris dimulai dari kanalikulus biliaris, yang merupakan saluran kecil dilapisi oleh mikrovili kompleks disekililing sel hati. Kanalikulus biliaris membentuk duktus biliaris intralobular, yang mengalirkan empedu ke duktus biliaris didalam traktus porta (Chandrasoma *et al.*, 2006).

Hati disuplai oleh dua pembuluh darah yaitu :

- a. Vena porta hepatica yang berasal dari lambung dan usus, yang kaya akan nutrien seperti asam amino, monosakarida, vitamin yang larut dalam air, dan mineral.
- b. Arteri hepatica, cabang dari arteri kuliaka yang kaya akan oksigen. Cabang-cabang pembuluh darah vena porta hepatica dan arteri hepatica mengalirkan darahnya ke sinusoid.

Hematosit menyerap nutrien, oksigen, dan zat racun dari darah sinusoid. Didalam hematosit zat racun akan dinetralkan sedangkan nutrien akan ditimbun atau dibentuk zat baru, dimana zat tersebut akan disekresikan ke peredaran darah tubuh.

### 2.2.2 Fungsi Hati

Hati memiliki bermacam-macam fungsi. Ada empat macam pembagian fungsi hati antara lain fungsi metabolisme, sintesis, ekskresi, dan imunologi (PAPDI, 2006). Terkait metabolisme, hati 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 ( Guyton and Hall, 2008).

a) Metabolisme Karbohidrat

Dalam metabolisme karbohidrat hepar mempunyai fungsi spesifik, antara lain:

- a) Menyimpan glikogen.
- b) Mengubah galaktosa dan fruktosa menjadi glukosa.
- c) Tempat proses terjadinya glikogenesis, glikogenolisis, dan glukoneogenesis.
- d) Membentuk senyawa kimia penting dari hasil dari usul perantara metabolisme karbohidrat (Harrison, 2005).

Hasil pencernaan akhir karbohidrat dalam saluran pencernaan hampir selalu dalam bentuk glukosa, fruktosa, dan galaktosa dengan glukosa rata-rata 80% dari keseluruhan. Setelah penyerapan dari saluran pencernaan, sebagian fruktosa dan hampir semua galaktosa dengan segera diubah menjadi glukosa. Fruktosa sebagian diubah menjadi glukosa sewaktu diabsorpsi melalui sel epitel pencernaan ke dalam darah porta. Sebagian besar fruktosa yang tersisa dan terutama seluruh galaktosa kemudian diubah menjadi glukosa oleh hepar. Hepar penting untuk mempertahankan konsentrasi glukosa darah normal. Sebagai contoh penyimpanan glikogen memungkinkan hepar mengambil kelebihan glukosa dari darah, menyimpannya dan kemudian mengembalikan kembali ke darah bila konsentrasi glukosa darah mulai menurun terlalu rendah. Proses ini dinamakan glikogenesis yang berarti proses pembentukan glikogen. Sedangkan pemecahan glikogen untuk menghasilkan glukosa kembali ke dalam sel disebut glikogenolisis (Guyton and Hall, 2008).

Glukoneogenesis dalam hepar juga berfungsi untuk mempertahankan konsentrasi normal glukosa, karena glukoneogenesis hanya meningkat apabila konsentrasi glukosa darah mulai menurun dibawah normal. Pada keadaan demikian, sejumlah besar asam amino diubah menjadi glukosa, dengan demikian memberikan

jalan sehingga dapat mempertahankan konsentrasi glukosa darah relatif normal (Guyton and Hall, 2008).

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 KoA 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 hati. Hati tidak mampu menggunakan semua asetil Ko-A diubah menjadi kondensasi dua molekul asetil Ko-A menjadi asam asetoasetat. Asam Asetoasetat merupakan asam dengan kelarutan tinggi yang melewati sel hati masuk ke ekstra sel dan kemudian masuk di transpor ke seluruh tubuh untuk diabsorpsi oleh jaringan lain. Kemudian jaringan ini mengubah asam asetoasetat menjadi asetil Ko-A dan kemudian mengoksidasinya dengan cara biasa (Sherwood, 2012).

Metabolisme kolesterol juga terjadi didalam hati. Kira-kira 80% kolesterol yang disintesis didalam hati akan diubah menjadi garam empedu, yang kemudian disekresi kembali ke dalam empedu, sisanya diangkut dalam lipoprotein dan dibawa oleh darah menuju keseluruhan jaringan tubuh. 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 hati yang penting dalam metabolisme protein terkait deaminasi asam amino yang dibutuhkan sebelum asam amino dapat dipergunakan untuk energi atau diubah mejadi karbohidrat atau lemak. Sejumlah kecil deaminasi dapat terjadi di jaringan tubuh lain, terutama di ginjal (Guyton and Hall, 2008).

Pembentukan ureum oleh hati bertujuan untuk mengeluarkan amonia dari tubuh. Sejumlah besar amonia dibentuk melalui proses deaminasi dan jumlahnya masih ditambah oleh pembentukan bakteri didalam usus secara kontinu dan kemudian diabsorpsi ke dalam darah. Oleh karena itu, bila hati tidak membentuk ureum. Konsentrasi amonia plasma meningkat dengan cepat dan menimbulkan koma hepatic dan kematian. Kondisi lain misalnya penurunan aliran darah yang besar melalui hati 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 hati. Hati dapat membentuk protein plasma pada kecepatan maksimum 15 sampai 50gram/hari. Dan apabila terjadi kehilangan protein plasma dapat menimbulkan mitosis sel hati yang cepat dan pertumbuhan hati menjadi besar, hal ini digandakan oleh kecepatan pengeluaran protein plasma sampai konsentrasi plasma kembali normal (Ganong, 2005).

Hati juga mampu untuk membentuk suatu asam amino tertentu dan juga membentuk suatu senyawa kimia lain yang penting dari asam amino. Misalnya, yang disebut asam amino non-esensial dapat disintesis semuanya dalam hati (Sherwood, 2012).

d) Fungsi Metabolik Hati yang lain

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

e) Fungsi Sintesis dan Imun

Terkait fungsi sintesis dan ekskresi, selain mensintesis urea, albumin, faktor pembekuan, dan lain-lain, hati juga berperan dalam sintesis empedu. Empedu yang dihasilkan dialirkan ke dalam kantung empedu untuk disimpan. Apabila seseorang mengonsumsi makanan mengandung lemak maka empedu yang disimpan tadi akan dikeluarkan dan mengalir masuk ke dalam usus 12 jari (duodenum). Usus utama empedu adalah air (97%), elektrolit, garam empedu, fosfolipid, kolesterol, dan pigmen empedu (bilirubin).

Hati merupakan komponen sentral sistem imun. Sel Kupffer yang meliputi 15% dari massa hati merupakan sel yang sangat penting dalam menanggulangi antigen yang berasal dari luar tubuh dan mempresentasikan antigen tersebut kepada limfosit. Selain itu, hati juga memiliki fungsi detoksifikasi yang dilakukan dengan berbagai proses, terutama oleh enzim-enzim hati terhadap zat-zat beracun baik dari luar maupun yang dihasilkan oleh tubuh. Dengan proses detoksifikasi, zat berbahaya akan diubah menjadi zat secara fisiologi tidak aktif (PAPDI, 2006:416-417).

Gangguan fungsi hati terjadi karena terjadi peningkatan bilirubin total hati. Kegagalan dan gangguan dalam proses detoksikasi dapat diketahui dengan meningkatnya kadar enzim-enzim transaminase, yaitu *serum Glutamate oxaloacetat Transaminase (SGOT)* dan *Serum Glutamate Pyruvate Transaminase (SGPT)*. Enzim tersebut penting diantaranya untuk diagnostik karena dialirkan ke pembuluh darah vena dan aktivitasnya dapat diukur atau tingkat keparahannya (Ganong, 2005). Konsentrasi enzim ini akan meningkat drastis apabila timbul beberapa macam kerusakan hati, seperti hepatitis kronis, sirosis, alkoholik, dan tumor hati (Stockhm and Scott, 2008).

### 2.3 Radikal bebas

Radikal bebas merupakan molekul atau atom apa saja yang tidak stabil karena memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas ini berbahaya karena amat reaktif mencari pasangan elektronnya. Radikal bebas yang

terbentuk dalam tubuh akan menghasilkan radikal bebas yang baru melalui reaksi berantai yang akhirnya jumlahnya terus bertambah. Selanjutnya menyerang sel-sel tubuh sehingga akan terjadi kerusakan jaringan (Sibuea, 2004). Tubuh secara terus menerus membentuk radikal oksigen dan spesies reaktif lainnya, terutama dihasilkan oleh netrofil, makrofag dan sistem xantin oksidase (Khlifi *et al.*, 2005). Radikal bebas ini dibentuk melalui mekanisme metabolisme normal (Desmarchelier *et al.*, 2005).

Reaksi pembentukan radikal bebas merupakan mekanisme biokimia tubuh normal yang terjadi melalui reaksi yang langsung memutuskan ikatan atau melalui transfer elektron (Halliwell and Gutteridge, 2000). Radikal bebas lazimnya hanya bersifat perantara yang bisa dengan cepat diubah menjadi substansi yang tidak lagi membahayakan bagi tubuh. Namun, apabila radikal bebas bertemu dengan enzim atau asam lemak tak jenuh ganda, maka merupakan awal dari kerusakan sel. Radikal mampu menarik atom hidrogen dari suatu molekul disekitarnya. Pengaruh radiasi ionisasi terhadap materi biologi akan menghasilkan radikal bebas hidroksil dan radikal bebas lainnya, seperti radikal hidrogen yang siap berinteraksi dengan biomolekul-biomolekul lain yang saling berdekatan (Middleton *et al.*, 2000).

Radikal bebas menurut dr.pendyala G, sumber radikal bebas terbagi atas dua bagian yaitu sumber eksogen dan sumber endogen.

a) Sumber eksogen:

Pencemaran udara, penipisan lapisan ozon, sumber radiasi, bahan kimia, toksin, asap rokok, mikroorganisme yang patalogik, sinar UV yang akan meningkatkan kadar radikal bebas secara mendadak, sebagian obat seperti anastesi dan pestisida serta pelarut yang digunakan untuk industri merupakan sumber eksogen radikal bebas.

b) Sumber endogen :

Sumber yang berasal dari proses metabolik yang normal dalam tubuh manusia, lebih 90% oksigen di produksi dari proses metabolik tubuh yaitu melalui:

- a) Proses oksidasi makann dalam menghasilkan tenaga di mitokondria yang dikenal sebagai electro transport chain dan akan memproduksi radikal bebas superoxide anion ( $O_2$ ).
- b) Sel darah putih seperti neutrofil secara khusus memproduksi radikal bebas yang digunakan dalam pertahanan pejamu untuk menghancurkan patogen yang menyerang.
- c) Sejumlah obat yang memiliki efek oksidasi pada sel dan menyebabkan produksi radikal bebas.
- d) Radikal bebas yang terbentuk sebagai perantara dan diperlukan dalam berbagai reaksi enzim.
- e) Proses oksidasi xanthin (senyawa yang di temukan disebagian besar jaringan tubuh dan cairan bertindak sebagai enzim yang terlibat dalam mengkatalis perubahan hypoxanthine kepada xanthine dan seterusnya kepada uric acid yang menghasilkan hydrogen peroxide).
- f) Reaksi yang melibatkan besi dan logam lain.
- g) Olaraga yaitu latihan yang lebih lama dan lebih intensif, oksigen akan banyak dikonsumsi. Sementara oksigen adalah mutlak penting untuk produksi energi, tetapi terdapat juga oksigen yang akhirnya akan membentuk radikal bebas.

Keadaan stres oksidatif biasanya terjadi bila jumlah radikal bebas dalam tubuh lebih tinggi dari jumlah sistem antioksidan. Stres oksidatif yang ditimbulkan oleh radikal bebas tersebut ditentukan dengan mengukur salah satu parameter berupa malondialdehid (MDA). Bila kadar MDA tinggi dalam plasma, maka dapat dipastikan sel mengalami stres oksidatif, Sumber radikal bebas yang dihasilkan dari luar tubuh yang dapat menimbulkan stres oksidasi adalah  $CCL_4$  (Valco *et al.*, 2006).

Diketahui hampir semua zat yang diabsorpsi oleh usus diangkut menuju hati. Hati merupakan kelenjar terbesar dan terberat dalam tubuh, menerima darah tidak saja dari sistem arterial, tetapi sebagian besar darah berasal dari sistem vena. Oleh karena itu hati memiliki kesempatan pertama untuk metabolisme senyawa yang

berasal dari saluran cerna, termasuk bahan toksis yang diserap, sehingga hati akan lebih muda mengalami kerusakan (Nurjana, 2009).

Mekanisme terbentuknya radikal bebas dapat dimulai oleh banyak hal, baik yang bersifat endogen maupun eksogen. Reaksi selanjutnya adalah peroksidasi lipid membran dan sitosol yang mengakibatkan terjadinya serangkaian reduksi asam lemak sehingga terjadi kerusakan membran dan organ sel (Schilling *et al.*, 2010).

Peroksidasi (otooksidasi) lipid bertanggung jawab tidak hanya pada kerusakan makanan, tapi juga menyebabkan kerusakan jaringan *in vivo* karena dapat menyebabkan kanker, penyakit inflamasi, aterosklerosis, dan efek merusak tersebut akibat produksi radikal bebas ( $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$ ,  $\text{OH}\cdot$ ) pada proses pembentukan peroksida dari asam lemak. Peroksida lipid merupakan reaksi berantai yang memberikan pasokan radikal bebas secara terus-menerus yang menginisiasi peroksidasi lebih lanjut. Proses secara keseluruhan dapat di gambarkan sebagai berikut :

- a) Inisiasi
 
$$\text{ROOH} + \text{Logam}^{(n)} \rightarrow \text{ROO}\cdot + \text{H}^+$$

$$\text{X}\cdot + \text{RH} \rightarrow \text{R}\cdot + \text{XH}$$
- b) Propagasi
 
$$\text{R}\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{ROO}\cdot$$

$$\text{ROO}\cdot + \text{RH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{R}\cdot$$
- c) Terminasi
 
$$\text{ROO}\cdot + \text{ROO}\cdot \rightarrow \text{ROOR} + \text{O}_2$$

$$\text{ROO}\cdot + \text{R}\cdot \rightarrow \text{ROOR}$$

$$\text{R}\cdot + \text{R}\cdot \rightarrow \text{RR}$$

Dalam kimia organik, peroksida adalah suatu gugus fungsional dari sebuah molekul organik yang mengandung ikatan tunggal oksigen-oksigen ( $\text{R-O-O-R}'$ ) jika salah dari R atau R' merupakan atom hidrogen, maka senyawa itu disebut hidroperoksida ( $\text{R-O-O-H}$ ), karena prekursor molekul dari proses inisiasi adalah hidroksiperoksida ( $\text{ROOH}$ ), peroksida lipid merupakan reaksi berantai yang sangat

berpotensi memiliki efek menghancurkan untuk mengontrol dan mengurangi peroksida lipid, di gunakan senyawa bersifat antioksidan (Nurjana S, 2009).

### 2.3.1 Karbon Tetraklorida ( $\text{CCl}_4$ ) Sumber Radikal Bebas

Karbon tetraklorida ( $\text{CCl}_4$ ) adalah cairan yang mudah terbakar, jernih, tidak berwarna, sifat pelarutnya sama dengan kloroform. Dapat bercampur dengan alkohol, eter, benzen dan pelarut organik lainnya, tetapi praktis tidak larut dalam air. Harus disimpan dalam wadah tertutup dan kedap cahaya (Dorge W, 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 (Klassen *et al.*, 2001).

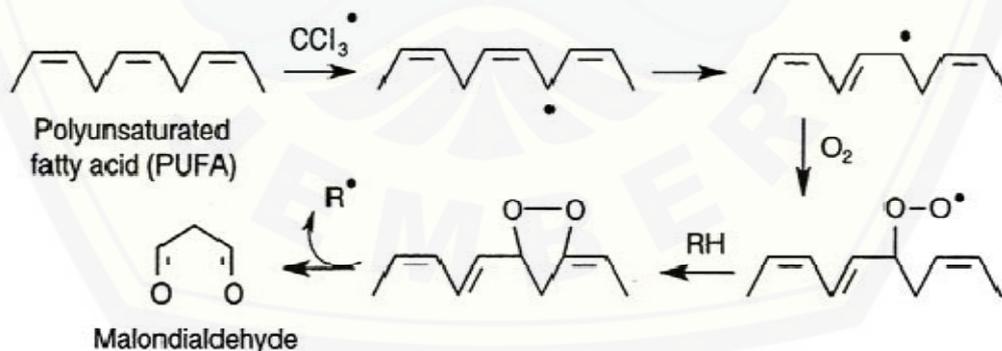
Ingesti  $\text{CCl}_4$  secara oral dengan mudah diabsorpsi dari traktus gastrointestinal, berlangsung secara lambat dan tidak mudah diramalkan. Absorpsi ini mengalami peningkatan jika bersamaan dengan ingesti lemak dan alkohol (Fauci *et al.*, 1998).  $\text{CCl}_4$  dihimpun secara besar-besaran dalam lemak tubuh, hati, dan sumsum tulang belakang. Pada hewan percobaan, penghirupan  $\text{CCl}_4$  diekskresikan dalam 2-3 bulan, sekitar setengahnya hilang karena penguapan dan sisanya dikeluarkan sebagai urea dan metabolit lain dalam urin dan *feces* (Klassen *et al.*, 2001).

Karbon tetraklorida ( $\text{CCl}_4$ ) merupakan xenobiotik yang lazim digunakan untuk menginduksi peroksidasi lipid dan keracunan. Dalam endoplasmik retikulum hati  $\text{CCl}_4$  dimetabolisme oleh sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) menjadi radikal bebas triklorometil ( $\text{CCl}_3$ ). Triklorometil dengan oksigen akan membentuk radikal triklorometilperoksi yang dapat menyerang lipid membran endoplasmik retikulum dengan kecepatan yang melebihi radikal bebas triklorometil. Selanjutnya triklorometilperoksi menyebabkan peroksidasi lipid sehingga mengganggu homeostasis  $\text{Ca}^{2+}$ , dan akhirnya menyebabkan kematian sel (Hodgson and Levi, 2004).

Efek  $\text{CCl}_4$  pada hepatosit tergantung pada dosis dan waktu pemaparan. Kerusak sel hati akibat pemberian karbon tetraklorida adalah akibat pembentukan

radikal bebas, peroksidasi lemak dan penurunan aktifitas enzim-enzim antioksidan (Shahjahanan *et al.*, 2004).

Karbon tetraklorida ( $\text{CCl}_4$ ) diaktifkan oleh enzim sitokrom P-450 menjadi radikal bebas yang reaktivitasnya tinggi. Pertama,  $\text{CCl}_4$  diubah menjadi bentuk radikal triklorometil ( $\text{CCl}_3\bullet$ ) dan kemudian menjadi radikal triklorometil peroksi ( $\text{CCl}_3\text{O}_2\bullet$ ) yang sangat reaktif. Radikal ini dapat mengakibatkan peroksidasi PUFA (*poly unsaturated fatty acid*) yang terdapat pada membran sel, sehingga menyebabkan kerusakan pada sel (Hodgson and Levi, 2004). 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  $\text{CCl}_3\text{O}_2\bullet$ . 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



Gambar 2.2 Mekanisme Peroksidasi PUFA (Hodgson and Levi, 2004)

Pemberian  $\text{CCl}_4$  dalam dosis tinggi dapat merusak retikulum endoplasmik, mengakumulasi lipid, mengurangi sintesis protein, mengacaukan proses oksidasi, menurunkan berat badan, menyebabkan pembengkakan hati sehingga berat hati menjadi bertambah, dan pemberian jangka panjang dapat menyebabkan nekrosis sentrilobular serta degenerasi lemak (Ari *et al.*, 2008).

Penyusun utama membran sel adalah lipid, protein, dan karbohidrat. Lipid yang menyusun membran adalah fosfolipid. Fosfolipid merupakan molekul yang bersifat amfipatik, artinya memiliki daerah hidrofilik dan hidrofobik. Keberadaan dua lapis fosfolipid mengakibatkan membran memiliki permeabilitas selektif, tetapi protein juga ikut menentukan sebagian besar fungsi spesifik membran. Membran plasma dan membran organel memiliki ragam protein yang spesifik (Panjaitan *et al.*, 2007).

Molekul lipid dan molekul protein pada membran tidak terikat secara kovalen, melainkan melalui interaksi nonkovalen yang kooperatif. Asam lemak penyusun membran sel khususnya asam lemak rantai panjang tak jenuh (PUFAs) amat rentan terhadap radikal bebas. khususnya pada asam lemak tak jenuh atau PUFA di hati (Panjaitan *et al.*, 2007).

## 2.4 Antioksidan

### a) Pengertian antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat spesies oksigen reaktif/spesies nitrogen reaktif dan juga radikal bebas sehingga antioksidan dapat mencegah penyakit-penyakit yang dihubungkan dengan radikal bebas seperti kanker, kardiovaskuler, dan penuaan (Helliwell and Gutteridge, 2000).

### b) Penggolongan antioksidan

Tubuh memiliki sistem pertahanan interna terhadap radikal bebas. Sistem pertahanan tersebut di kelompokkan menjadi 3 golongan :

- 1) Antioksidan primer, (antioksidan endogen/antioksidan enzimatis). Contohnya superoksida dismutase(SOD), katalase dan glutathion peroksidase. Enzim-enzim ini mampu menekan atau menghambat pembentukan radikal bebas dengan cara memutus reaksi berantai dan mengubahnya menjadi produk lebih stabil. Reaksi ini disebut sebagai *chain-breaking-antioxidant*.
- 2) Antioksidan sekunder (antioksidan eksogen atau antioksidan non enzimatis). Contoh antioksidan sekunder ialah vitamin E, vitamin C,  $\beta$ -karoten, isoflavon, asam urat, bilirubin, dan albumin. Senyawa-senyawa ini dikenal sebagai penangkap radikal bebas (*scavenger free radical*).
- 3) Antioksidan tersier, misalnya enzim *DNA-repair* dan *metionin sulfoksidareduktase* yang berperan dalam perbaikan biomolekul yang dirusak oleh radikal bebas (Winarsi, 2005). Senyawa antioksidan sintesis seperti *butil hidroksi anisol* (BHA) dan *butilhidroksi toluen* (BHT) bukan merupakan solusi untuk kontrol positif yang baik, sebab pada pemaparan yang lama diketahui dapat mempengaruhi genetika sel-sel tubuh (Pourmorad *et al.*, 2006).

#### 2.4.1 Sumber antioksidan

Antioksidan sangat beragam jenisnya. Berdasarkan sumbernya antioksidan dibagi dalam dua kelompok, yaitu antioksidan sintetik (antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia) dan antioksidan alami (antioksidan hasil ekstraksi bahan alami).

##### a) Antioksidan sintetik

Diantara beberapa contoh antioksidan sintetik yang diijinkan untuk makanan, ada lima antioksidan yang penggunaannya meluas dan menyebar di seluruh dunia, yaitu *butil hidroksi anisol* (BHA), *butil hidroksi toluen* (BHT), *propil galat*, *tert-butil hidroksi quinon* (TBHQ) dan *tokoferol*. Antioksidan tersebut merupakan antioksidan alami yang telah diproduksi secara sintesis untuk tujuan komersial (Pokorny *et al.*, 2001).

b) Antioksidan alami

Antioksidan alami didalam makanan dapat berasal dari:

- 1) Senyawa antioksidan yang sudah ada dari satu atau dua komponen makanan.
- 2) Senyawa antioksidan yang terbentuk dari reaksi-reaksi selama proses pengolahan.
- 3) Senyawa antioksidan yang diisolasi dari sumber alami dan ditambahkan ke makanan.

Kebanyakan senyawa antioksidan yang diisolasi dari sumber alami adalah berasal dari tumbuhan. Kingdom tumbuhan, Angiosperm memiliki kira-kira 200.000 sampai 300.000 spesies dan dari jumlah ini kurang lebih 400 spesies yang telah dikenal dapat menjadi bahan pangan manusia. Isolasi antioksidan alami telah dilakukan dari tumbuhan yang dapat dimakan, tetapi tidak selalu dari bagian yang dapat dimakan. Antioksidan alami terbesar dibeberapa bagian tanaman, seperti pada kayu, kulit kayu, akar, daun, buah, biji, dan serbuk sari (Pokorny *et al.*, 2001).

Senyawa antioksidan alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, *tokoferol* dan asam-asam organik polifungsional. Golongan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan meliputi flavon, flavonol, isoflavon, kateksin, flavonol dan kalkon. Sementara turunan asam sinamat meliputi asam kafeat, asam ferulat, asam klorogenat, dan lain-lain. Senyawa antioksidan polifenolik ini adalah multifungsional dan dapat bereaksi sebagai:

- a) Pereduksi
- b) Penangkap radikal bebas
- c) Pengkelat logam
- d) Peredam terbentuknya singlet oksigen

Kira-kira 2% dari seluruh karbon yang difotosintesis oleh tumbuhan diubah menjadi flavonoid atau senyawa yang berkaitan erat dengannya, sehingga flavonoid merupakan salah satu golongan fenol alam terbesar. Lebih lanjut disebutkan bahwa sebenarnya flavonoid terdapat dalam semua tumbuhan hijau, sehingga pastilah

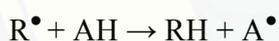
ditemukan pula pada setiap ekstrak tumbuhan. Kebanyakan dari golongan dan senyawa yang berkaitan erat dengannya memiliki sifat-sifat antioksidan baik didalam lipid cair maupun dalam makanan berlipid (Pokorny *et al.*, 2001).

#### 2.4.2 Mekanisme Kerja Antioksidan

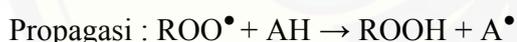
Oksidasi dapat dihambat oleh berbagai macam cara diantaranya mencegah masuknya oksigen, penggunaan temperatur yang rendah, inaktivasi enzim yang mengkatalis oksidasi, mengurangi tekanan oksigen dan penggunaan pengemas yang sesuai. Cara lain untuk melindungi terhadap oksigen adalah dengan menggunakan bahan tambahan spesifik yang dapat menghambat oksidasi yang secara tepat disebut dengan penghambat oksidasi (*oxidation inhibitor*), tetapi baru-baru ini lebih sering disebut antioksidan (Pokorny *et al.*, 2001).

Penambahan antioksidan primer dengan konsentrasi rendah pada lipid dapat menghambat atau mencegah reaksi autoksidasi. Reaksi tersebut relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipid lain membentuk radikal lipid baru.

Inisiasi :



Radikal lipid



Mekanisme yang paling penting adalah reaksi antara antioksidan dengan radikal bebas, 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 nonradikal. 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

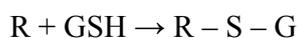
antioksidan senyawa lain. Kelompok lain adalah senyawa-senyawa yang mampu menguraikan hidroperoksida melalui jalur non radikal sehingga senyawa ini dapat mengurangi kandungan radikal bebas (Pokorny *et al.*, 2001).

## 2.5 Gluthation

Gluthation adalah suatu tripeptida yang terdiri dari asam glutamat, sistein, dan glisin. Ditemukan di jaringan mamalia dan khususnya sangat berkonsentrasi di hati dan merupakan sumber tiol non protein didalam sel. Asam glutamat terkait dalam ikatan isopeptide (melalui gugus  $\gamma$ -karboksil nya) ke sistein, yang akan membentuk linkage peptida dengan glisin. Glutathion dapat dioksidasi oleh pembentukan ikatan disulfida antara dua residu sistein, dan formulir ini dilambangkan GSSG, sementara (*reduced*) glutathion dilambangkan GSH. Ketika *Gluthation* digunakan sebagai reduktor substrat seluler, harus dibuat ulang meminimalkan NADPH dengan menggunakan Enzim glutathion reduktase (Shelly,2009). GSH berada di sitosol 90%, mitokondria 10% dan sebagian kecil ada di retikulum endoplasma GSH memiliki beberapa yaitu :

- a) Detoksifikasi elektrolit
- b) Menetralkan radikal bebas
- c) Mempertahankan status tiol penting dari protein
- d) Menyediakan reservoir untuk sistein
- e) Modulasi proses seluler seperti sintesis DNA-mikrotubular

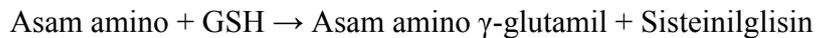
Dalam metabolisme xenobiotik, Gluthation memiliki peranan pada reaksi konjugasi yang menyebabkan xenobiotik menjadi lebih larut air dan akhirnya diekskresikan melalui urine atau empedu. Xenobiotik yang mengalami konjugasi dengan Gluthation adalah xenobiotik elektrofilik yang berpotensi toksik (misalnya, karsinogen tertentu). Proses pengkonjugasian xenobiotik elektrofilik dengan GSH nukleofilik dapat dilihat pada reaksi yang telah diringkas sebagai berikut:



R adalah xenobiotik elektrofilik. Enzim yang mengatalisis reaksi ini disebut glutathion S transferase yang terdapat dalam jumlah besar di sitosol hepar dan dalam jumlah lebih sedikit di jaringan lain. Di jaringan manusia terdapat beragam glutathion S-transferase yang memperlihatkan spesifitas substrat yang berbeda dan dapat dipisahkan dengan menggunakan teknik elektroforesis dan teknik lainnya.

Jika xenobiotik yang berpotensi toksik tidak dikonjugasikan dengan GSH, xenobiotik tersebut akan bebas berikatan secara kovalen dengan DNA, RNA, atau protein sel sehingga dapat menyebabkan kerusakan sel serius. Oleh karena itu, GSH merupakan mekanisme pertahanan penting terhadap senyawa toksik, misalnya obat dan karsinogen tertentu. Jika kadar GSH di suatu jaringan, seperti hepar menurun (seperti dapat terjadi pada pemberian senyawa tertentu yang bereaksi dengan GSH kepada tikus), jaringan tersebut terbukti lebih rentan terhadap cedera akibat berbagai bahan kimia, yang dalam keadaan normal dikonjugasikan dengan GSH. Konjugat Gluthation mengalami metabolisme lebih lanjut sebelum diekskresikan. Gugus glutamil dan glisin yang berasal dari glutathion dikeluarkan oleh enzim spesifik, dan sebuah gugus asetil (diberikan oleh asetil-KoA) ditambahkan ke gugus amino pada residu sisteinil yang tersisa. Senyawa yang terbentuk adalah asam merkapturat, suatu konjugat L-asetilsistein, yang kemudian diekskresikan dalam urine (Murray *et al.*, 2009).

Gluthation memiliki fungsi penting lain pada sel manusia selain peranannya dalam metabolisme xenobiotik. Ikut serta dalam dekomposisi hidrogen peroksida, yang berpotensi toksik dalam reaksi yang dikatalisis oleh glutathion peroksidase, glutathion reduktan intrasel penting yang membantu mempertahankan gugus SH esensial enzim dalam keadaan tereduksi dan memiliki keterlibatan dalam anemia hemolitik akibat defisiensi glukosa 6-fosfat dehidrogenase. Pada pengangkutan asam amino tertentu yang menembus membran di ginjal, diduga terdapat suatu siklus metabolik yang melibatkan GSH sebagai pembawa. Reaksi pertama dalam siklus tersebut diperlihatkan dibawah ini:



Reaksi ini membantu memindahkan asam amino tertentu menembus membran plasma. Asam amino tersebut kemudian dihidrolisis dari kompleksnya dengan GSH dan GSH tersebut disintesis dari sisteinilglisin. Enzim yang mengatalisis reaksi di atas adalah  $\gamma$ -glutamil-transferase (GGT). Enzim ini terdapat di dalam membran plasma sel tubulus ginjal dan sel duktulus empedu, dan di dalam retikulum endoplasma hepatosit. Enzim ini memiliki nilai diagnostik karena pada berbagai penyakit hepatobiliaris terjadi pelepasan enzim ini ke dalam darah yang berasal dari sel hati (Pompella *et al.*, 2007).

## 2.6 Diagnosis Enzimatik Hati

Kerusakan pada sel hati dapat diketahui melalui parameter-parameter fungsi dengan mengamati zat-zat dalam peredaran darah yang dibentuk oleh sel-sel hati yang rusak atau mengalami nekrosis. Diagnosis enzimatik hati sering menjadi satu-satunya petunjuk ke arah penyakit hati yang lebih dini (Widmann, 1995).

Ada beberapa indikasi dalam dilakukannya uji pemeriksaan biokimia hati. Misalnya riwayat pemeriksaan adanya penyakit hati, baik itu karena *jaundice*, riwayat penyalahgunaan alkohol, obat-obatan, atau bahan kimia, tanda-tanda terjadinya penyakit hati kronis, termasuk asites, dan riwayat keluarga hemokromatosis. Indikasi lain termasuk skrining populasi akan infeksi virus yang menyebar luas, penyakit non hepatic yang berefek pada fungsi hati, dan pengawasan obat-obatan (misalnya valproat atau *methotrexate*) (Coates, 2011).

Beberapa uji pemeriksaan biokimia hati yang sering dilakukan meliputi SGOT dan SGPT, LDH (*Laktat Dehidrogenase*), alkali fosfatase, *Gamma Glutamyl Transpeptidase* (GGT), bilirubin serum, asam empedu, alfa fetoprotein, albumin dan globulin serum. Beberapa diantaranya penting untuk diagnosis karena dialirkan ke pembuluh darah sehingga aktivitasnya dapat diukur dan diketahui adanya penyakit

hati dan tingkat keparahannya. Salah satu petunjuk penting adanya kerusakan hati adalah kadar SGOT dan SGPT (Kosasih *et al.*, 2008).

#### 2.6.1 Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase (SGOT)

*Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase (SGOT)* atau juga dinamakan *Aspartat Aminotransferase (AST)* merupakan enzim yang dijumpai dalam otot jantung dan hati, sementara dalam konsentrasi sedang dijumpai pada otot rangka, ginjal dan pankreas. Konsentrasi rendah dijumpai dalam darah, kecuali jika terjadi cedera seluler, kemudian dalam jumlah banyak dilepaskan ke dalam sirkulasi (Kosasih *et al.*, 2008). Pada penyakit hati, kadarnya akan meningkat 10 kali lebih dan akan tetap demikian dalam waktu yang lama (Kosasih *et al.*, 2008).

*Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase (SGOT)* umumnya diperiksa secara fotometri atau spektrofotometri, semiotomatis menggunakan fotometer, spektrofotometer, atau secara otomatis menggunakan *chemistry analyzer* (Kosasih *et al.*, 2008). Kadar normal SGOT untuk dewasa 0-37 U/L pada laki-laki dan 0-31 U/L pada perempuan. Sedangkan kadar normal SGOT tikus putih adalah  $141 \pm 67,4$  U/L (Mitruka, 1981). Kadar SGOT meningkat pada kerusakan hepatoseluler akut, infark miokard, kolaps sirkulasi, pankreatitis akut, mononukleosis infeksiosa yang mengalami peningkatan > 5 kali nilai normal (peningkatan tinggi); obstruksi saluran empedu, aritmia jantung, gagal jantung kongestif, tumor hati (metastasis atau primer), *distrophia muscularis* yang mengalami peningkatan 3-5 kali nilai normal (peningkatan sedang); perikarditis, sirosis, infark paru, delirium tremens, *cerebrovascular accident (CVA)* yang mengalami peningkatan sampai 3 kali. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi temuan laboratorium:

- a. Injeksi pre intra-muscular (IM) dapat meningkatkan kadar SGOT.
- b. Hemolisis sampel darah.
- c. Obat-obatan dapat meningkatkan kadar: antibiotik (ampisilin, karbenisilin, klindamisin, kloksasilin, eritromisin, gentamisin, linkomisin, nafsilin, oksasilin, polisilin, tetrasiklin), vitamin (asam folat, piridoksin, vitamin A), narkotika

- (kodein, morfin, meperidin), antihipertensi (metildopa/aldomet, guanetidin), metramisin, preparat digitalis, kortison, flurazepam (Dalmane), indometasin (Indosin), isoniazid (INH), rifampin, kontrasepsi oral, teofilin.
- d. Salisilat dapat menyebabkan kadar serum positif atau negatif palsu (Kosasih *et al.*, 2008).

### 2.6.2 Serum Glutamat Piruvat Transaminase (SGPT)

*Serum Glutamic Pyruvic Transaminase* (SGPT) atau juga dinamakan *Alanin Aminotransferase* (ALT) merupakan enzim yang banyak ditemukan pada sel hati serta efektif untuk mendiagnosis destruksi hepatoseluler. Enzim ini dalam jumlah yang kecil dijumpai pada otot jantung, ginjal, dan otot rangka. Pada umumnya nilai tes SGPT lebih tinggi dari SGOT pada kerusakan parenkim hati akut, sedangkan pada proses kronis didapat sebaliknya. SGPT/ALT serum umumnya diperiksa secara fotometri atau spektrofotometri, secara semi otomatis atau otomatis (Kosasih *et al.*, 2008; Sutedjo, 2007).

Kadar normal SGPT pada dewasa adalah 0-42 U/L untuk laki-laki dan 0-32 U/L untuk perempuan. Sedangkan kadar normal SGPT tikus putih adalah  $12,6 \pm 4,40$  U/L (Mitruka, 1981). Kadar SGPT meningkat pada hepatitis viral akut, nekrosis hati yang mengalami peningkatan > 20 kali normal; infeksi mononuklear, hepatitis kronis aktif, sumbatan empedu ekstra hepatic, sindrom Reye, dan infark miokard yang mengalami peningkatan 3-10 kali normal (SGOT>SGPT); pankreatitis, perlemakan hati, sirosis *Laennec*, sirosis biliaris yang mengalami peningkatan 1-3 kali normal (Sutedjo, 2007). Faktor yang dapat mempengaruhi temuan laboratorium:

- a. Trauma pada proses pengambilan sampel akibat tidak sekali tusuk kena dapat meningkatkan kadar.
- b. Hemolisis sampel darah.
- c. Obat-obatan dapat meningkatkan kadar: antibiotik (klindamisin, karbenisilin, eritromisin, gentamisin, linkomisin, mitramisin, spektinomisin, tetrasiklin), narkotika (meperidin/demerol, morfin, kodein), antihipertensi (metildopa,

guanetidin), preparat digitalis, indometasin (Indosin), salisilat, rifampin, flurazepam (Dalmane), propranolol (Inderal), kontrasepsi oral (progestin-estrogen), heparin.

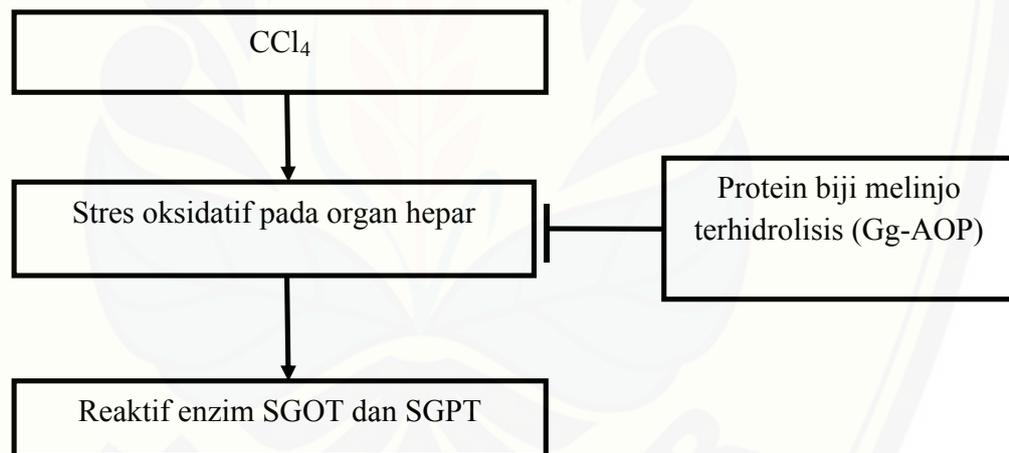
d. Salisilat dapat meningkatkan atau menurunkan kadar (Kosasih *et al.*, 2008).

Produk yang biasanya diukur sebagai bagian dari tes fungsi hati (Horrison, 2000) :

- a) ALT (alanin aminotransferase) atau SGPT (Serum Glutamic Pyruvic Transaminase)
- b) AST (aspartat aminotransferase) atau SGPT (serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase)
- c) Alkaline fosfatase
- d) GGT (gamma-glutamyl transpeptidase, atau gamma GT)
- e) Bilirubin
- f) Albumin

## 2.7 Kerangka Konseptual

Kerangka konseptual pada Gambar 2.3 menjelaskan bahwa karbontetraklorida ( $\text{CCl}_4$ ) dalam retikulum endoplasmik hati oleh sitokrom P-450 2E1 (CYP2E1) menjadi bentuk radikal bebas triklorometil ( $\text{CCl}_3$ ) selanjutnya  $\text{CCl}_3$  akan menginduksi terjadinya peroksidasi lipid yang akan menyebabkan kerusakan membran dan cedera sel hati. Kerusakan sel-sel hati menyebabkan enzim-enzim hati (SGOT dan SGPT) keluar ke ekstrasel dan meningkat di sirkulasi. Protein terhidrolisis biji melinjo *Gnetum gnemon* L. (Gg-AOP) berperan sebagai antioksidan dan mencegah kerusakan sel-sel hati sehingga diharapkan mampu mencegah peningkatan kadar SGOT dan SGPT



Gambar 2.3 Kerangka Konseptual penelitian

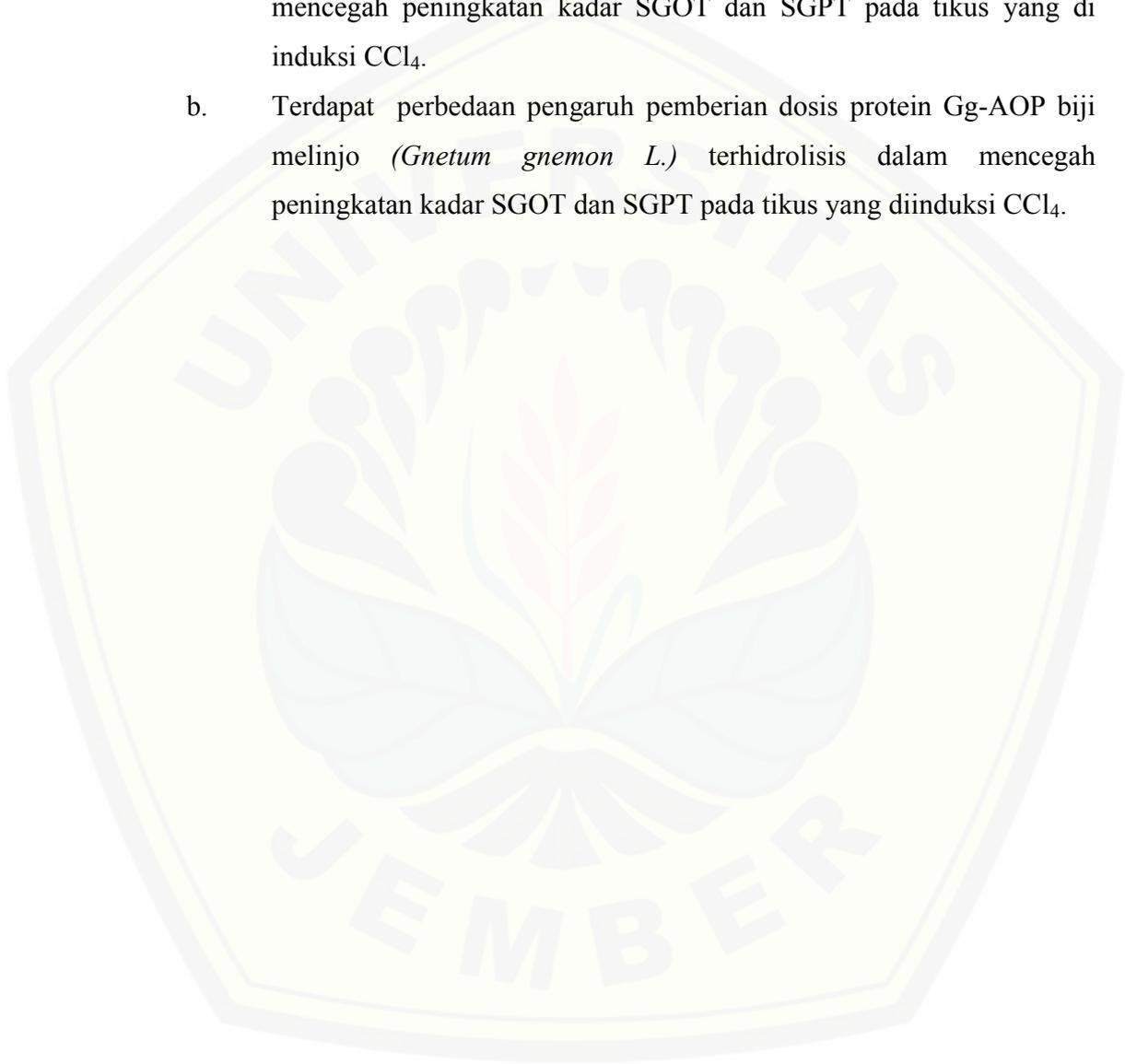
### Keterangan :

- : merangsang  
—| : menghambat

## 2.8 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah :

- a. Protein Gg-AOP biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhidrolisis dapat mencegah peningkatan kadar SGOT dan SGPT pada tikus yang di induksi CCl<sub>4</sub>.
- b. Terdapat perbedaan pengaruh pemberian dosis protein Gg-AOP biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhidrolisis dalam mencegah peningkatan kadar SGOT dan SGPT pada tikus yang diinduksi CCl<sub>4</sub>.



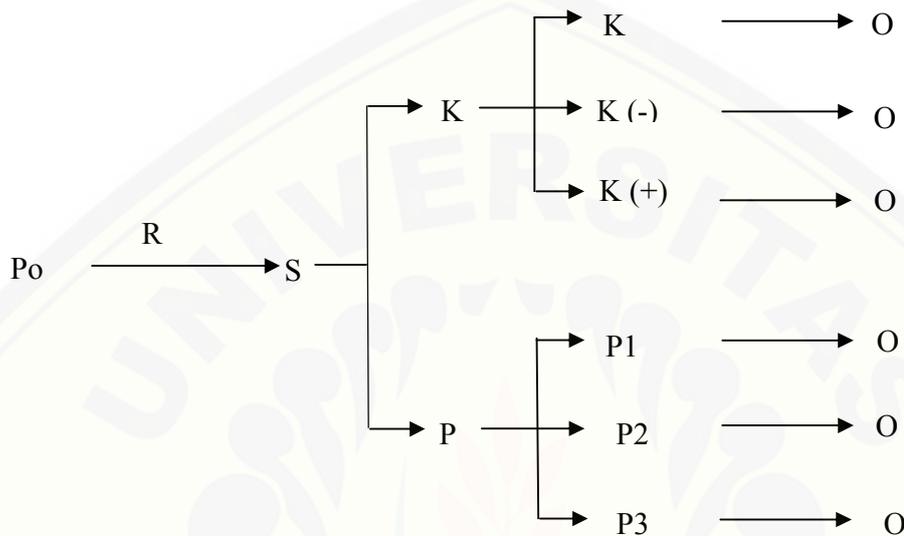
## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui suatu gejala atau pengaruh yang timbul sebagai akibat dari adanya perlakuan tertentu. Penelitian eksperimental memiliki tujuan utama yaitu 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 eksperimental yang digunakan *True experimental* (Notoatmodjo, 2005).

### 3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Post Test Only Control Group Design*. Rancangan ini mengukur pengaruh perlakuan (intervensi) pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan kelompok tersebut dengan kelompok kontrol (Notoatmodjo, 2005). Sampel yang telah di terhidrolisis dan dirandomisasi. baik pada kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol, sehingga kelompok-kelompok tersebut dianggap sama sebelum dilakukan perlakuan (Notoatmodjo, 2005). Rancangan penelitian ditampilkan 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 CCl<sub>4</sub> 1,5 ml/kgBB  
 K (+) : kelompok kontrol positif dengan pemberian Glutathion dan CCl<sub>4</sub> 1,5 ml/kgBB  
 P1 : kelompok perlakuan dengan pemberian larutan protein biji *Gnetum gnemon* L terhidrolisis (Gg-AOP) 10 mg/kgBB dan CCl<sub>4</sub> 1,5 ml/kgBB  
 P2 : kelompok perlakuan dengan pemberian larutan protein biji *Gnetum gnemon* L terhidrolisis (Gg-AOP) 20 mg/kgBB dan CCl<sub>4</sub> 1,5 ml/kgBB  
 P3 : kelompok perlakuan dengan pemberian larutan protein biji *Gnetum gnemon* L terhidrolisis (Gg-AOP) 30 mg/kgBB dan CCl<sub>4</sub> 1,5 ml/kgBB  
 O : pengukuran aktivitas alkali fosfatase SGOT dan SGPT pada hari ke-8

### 3.3 Sampel

Pemilihan sampel dipilih dengan menggunakan teknik *simple random sampling* yang kemudian dibagi menjadi 6 kelompok. Menurut Hidayat (2010) 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  $(n-1)(p-1) \geq 15$ .

Keterangan :

n : jumlah sampel

p : jumlah perlakuan

jika  $p=6$

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$n \geq 4$$

Jumlah sampel yang digunakan minimal 4 ekor untuk tiap perlakuan. Pada penelitian ini di gunakan 30 ekor tikus dengan melebihi satu sampel untuk masing-masing kelompok. Jadi, masing-masing kelompok menggunakan 5 sampel.

Sampel penelitian diambil secara acak dari populasi dengan kriteria sebagai berikut.

- Tikus galur Wistar (*Rattus norvegicus*)
- Umur 2-3 bulan
- Jenis kelamin jantan
- Berat badan 170-250 gram
- Kondisi fisik sehat

### 3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Analisis Tanaman Departemen Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Jember untuk identifikasi Protein Gg-AOP biji melinjo (*Gnetum gnemon L.*) terhidrolisis, Laboratorium Biomedik fisiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk melakukan kontrol dan perlakuan terhadap hewan coba, dan Laboratorium Parahita untuk uji pengukuran kadar enzim SGOT dan SGPT. Penelitian ini dilakukan bulan Maret-Oktober 2013.

### 3.5 Alat dan Bahan

#### 3.5.1 Alat

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

#### 3.5.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: (a) serbuk protein Gg-AOP biji melinjo (*Gnetum Gnemon L*) terhidrolisis; (b) CCL<sub>4</sub>(Carbontetraclorida); (c)*Gluthation* (GSH ; (d) cloroform; (e) Aquadest; (f)enzim SGOT dan SGPT tikus wistar; (g) Buffer fosfat; (h) 0,5 NaOH; (i) 0,5 HCl.

### 3.6 Variabel Penelitian

#### 3.6.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis protein Gg-AOP biji melinjo (*Gnetum gnemon L.*) terhidrolisis.

### 3.6.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar enzim SGOT dan SGPT pada tikus jantan wistar.

### 3.6.3 Variabel Kendali

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah:

- a. Jenis tikus (tikus galur Wistar).
- b. Berat badan tikus (170-250 gram).
- c. Umur tikus ( 2 – 3 bulan).
- d. Frekuensi pemberian protein Gg-AOP biji melinjo (*Gnetum Gnemon L.*) terhidrolisis.
- e. Frekuensi pemberian CCL<sub>4</sub>.

## 3.7 Defisi Operasional

### 3.7.1 Larutan CCL<sub>4</sub>

Dosis larutan CCL<sub>4</sub> yang digunakan adalah 1,5 ml/KgBB karena dosis tersebut dalam 24 jam mampu merusak sel-sel hati sehingga mengalami degenerasi dan nekrosis. CCL<sub>4</sub> diberikan pada tikus dengan menggunakan sonde lambung yang diberikan sekali setelah perlakuan proteksi selama 7 hari.

### 3.7.2 Protein Gg-AOP biji melinjo (*Gnetum gnemon L.*) terhidrolisis.

Protein Gg-AOP adalah protein yang diperoleh dari ekstraksi biji melinjo (*Gnetum gnemon L.*) yang telah melalui proses pengeringan, kemudian serbuk yang dihasilkan dilarutkan kedalam aquades (perbandingan 1:3). Tahap selanjutnya, dilakukan pengisolasian protein dengan metode *isoelectric presipitation* dan ditambahkan enzim alkalase (pembuatan ekstrak biji melinjo dan protein terhidrolisis dapat dilihat di 3.8.1 dan 3.8.2). diambil volumenya sebesar 10 µl, 20µl dan 30µl. Larutan tersebut diberikan selama 7 hari pada masing-masing kelompok tikus.

### 3.7.3 Hewan coba

Hewan coba digunakan dalam penelitian ini adalah tikus dari strain Wistar berjenis kelamin jantan dengan rata-rata berat badan 170 – 250 gram berusia berkisar 2-3 bulan dan pemeliharaan tikus galur wistar ditempatkan dalam kandang dengan diberi makanan standar dan minuman ad libitum sebelum diberikan perlakuan.

### 3.7.4. Kadar Enzim SGOT dan SGPT

Pemeriksaan kadar SGOT dan SGPT menggunakan metode *Rochel/Hitachi cobas c systems* dengan darah yang dibutuhkan sebanyak 3, 1 yang diambil ventrikel kanan jantung tikus. Alat yang digunakan *Auto Analyzer COBAS Mira plus (Rochel)* dengan reagenya dari Rochle.

*Serum Glutamic Oxaloacetix Transminase (SGOT)* merupakan enzim yang dijumpai dalam otot jantung dan hati, sementara dalam konsentrasi sedang dijumpai pada otot rangka, ginjal dan pankreas. Konsentrasi rendah dijumpai dalam darah, kecuali jika terjadi cedera seluler, kemudian dalam jumlah banyak dilepaskan ke dalam sirkulasi. Hasil dari kadar SGOT dinyatakan dalam satuan unit/liter (U/L) dan jika menggunakan *Rochel/Hitachi cobas c systems* akan dikonversi dengan rumus ( $U/L \times 0,00167 = \mu\text{kat/L}$ ).

*Serum Glutamic Pyruvic Transaminase (SGPT)* merupakan enzim yang banyak ditemukan pada sel hati serta efektif untuk mendiagnosis destruksi hepatoseluler. Enzim ini dalam jumlah yang kecil dijumpai pada otot jantung, ginjal dan otot rangka. Hasil dari kadar SGPT dinyatakan dalam satuan unit/liter (U/L) dan jika menggunakan *Rochel/ Hitachi cobas c systems* akan dikonversi dengan rumus ( $U/L \times 0,0167 = \mu\text{kat/L}$ ).

## 3.8 Prosedur Kerja

### 3.8.1 Pembuatan Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon L*) Terhidrolisis

Bahan baku yang digunakan adalah biji melinjo berwarna merah penuh yang diperoleh dari daerah Jember. Kulit biji melinjodihilangkan dan biji dikeringkan

pada oven dengan suhu 40°C selama 18 jam. Biji kering dihilangkan lapisan yang kedua secara manual. Biji kering lapisan 3 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 7-8. Dilakukan lagi pemisahan dengan menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Protein yang dihasilkan dipresipitaskan 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 (Siswoyo et al., 2012)

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.,2012).

Produksi protein terhidrolisis (protein Gg-AOP) dilakukan dengan menghidrolisis *isolate* protein (protein Gg-PI) dengan menggunakan alkalase dengan perbandingan 0.2% (E/S) pada kondisisuhu 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 95°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).

### 3.8.2 Penentuan Daya Hepatotoksik CCl<sub>4</sub>

6 ekor tikus wistar jantan usia 2 – 3 bulan dengan berat berkisar 170-250 gram yang telah diadaptasikan selama 1 minggu dengan diberi makanan standart dan minuman. Masing-masing tikus diberi CCl<sub>4</sub> secara oral dengan volume 1,5 ml/kgBB pada waktu yang berbeda-beda (tanpa perlakuan, 0 jam, 12 jam, 24jam, 48jam, dan 72 jam). Selanjutnya dilakukan pengukuran terhadap kadar SGOT dan SGPT dari darah tikus kemudian dilihat pada jam ke berapa kadar SGOT dan SGPT dari darah tikus kemudian dilihat pada jam ke berapa kadar SGOT dan SGPT meningkat secara signifikan dan stabil.

### 3.8.3 Perlakuan Terhadap Hewan Coba

Sejumlah 35 ekor tikus jantan galur wistar di tempatkan dalam kandang dengan diberi makanan standar dan minum *ad libitum*. Setelah diadaptasikan selama beberapa hari, tikus dibagi dalam tujuh kelompok. Masing-masing kelompok terdiri lima ekor yang dipilih secara acak. Setiap kelompok kemudian diberikan perlakuan sekali sehari selama tujuh hari dengan kriteria pemberian sebagai berikut.

- a. Kelompok K : tikus diberi aquades selama 7 hari
- b. Kelompok K (-) : tikus diberi aquades selama 7 hari dan diberi CCl<sub>4</sub> 1,5 ml/kgBB secara peroral pada hari ke-7
- c. Kelompok K (+) : tikus diberi *L-Glutathion reduced minimum 99%* (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) dosis 10 mg/kgBB selama 7 hari dan diberi CCl<sub>4</sub> 1,5 ml/kgBb secara peroral pada hari ke-7
- d. Kelompok P1 : tikus diberi protein Gg-AOP 10 mg/kgBB selama 7 hari dan diberi CCl<sub>4</sub> 1,5 ml/kgBB secara peroral pada hari ke-7

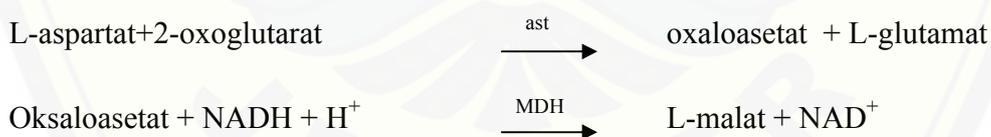
- e. Kelompok P2 : tikus diberi protein Gg-AOP 20 mg/kgBB selama 7 hari dan diberi CCl<sub>4</sub> 1,5 ml/kgBB secara peroral pada hari ke-7
- f. Kelompok P3 : tikus diberi protein Gg-AOP 30 mg/kgBB selama 7 hari dan diberi CCl<sub>4</sub> 1,5 ml/kgBB secara peroral pada hari ke-7

Pada hari ke-8 sejumlah 24 ekor tikus (4 ekor tikus tiap kelompok) dikorbankan dengan cara pembiusan menggunakan larutan *cloroform*. Kemudian diambil darah dari jantung (ventrikel kanan) untuk diukur kadar SGOT dan SGPT.

#### 3.8.4 Pemeriksaan Kadar SGOT dan SGPT

##### a) Pemeriksaan kadar SGOT

Pemeriksaan kadar SGOT dilakukan di laboratorium Klinik Swasta jember dengan menggunakan metode *Rochel/Hitachi cobas c systems* rekomendasi dari *international Federation of Clinical Chemistry* (IFCC). Sampel yang digunakan yaitu (1) Serum, (2) Plasma; Li-heparin atau K2-EDTA plasma. Prinsip pengujiannya dimana AST (SGOT) dalam sampel mengkatalisis transfer gugus amino antara L-aspartat dan 2-oxoglutarat membentuk oxaloasetat dan L-glutamat. Oksaloasetat kemudian bereaksi dengan NADH, dengan adanya malat dehidrogenase (MDH) membentuk L-malat dan NAD<sup>+</sup>

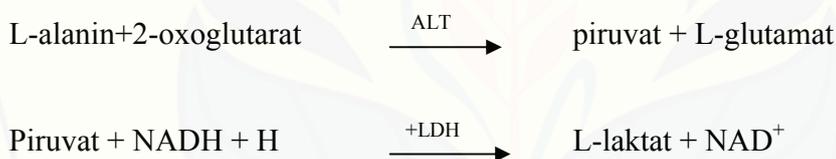


Laju oksidasi NADH berbanding lurus dengan aktivitas AST katalitik. Kadar ALT ditentukan dengan mengujur penurunan absorbansinya. Reagen yang digunakan adalah TRIS buffer; 264 mmol/L, pH 8,1 (25oC); L-aspartat: 792 mmol/L; albumin (bovine): 0,25%; MDH (mikroorganisme):  $\geq 48$   $\mu\text{kat/L}$ ; pengawet, dan 2-Oxoglutarat: 94 mmol/L; NADH: 1,7 mmol/L; pengawet.

Hasil dari kadar AST dinyatakan dalam satuan unit/liter (U/L) dan jika menggunakan Rochel/Hitachi cobas c systems akan dikonversi dengan rumus (U/L x 0,00167 =  $\mu$ kat/L).

b) Pemeriksaan kadar SGPT

Pemeriksaan kadar SGPT dilakukan di laboratorium Klinik Swasta Jember dengan menggunakan metode *Rochel/Hitachi cobas c system* rekomendasi dari *International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)*. Sampel yang digunakan yaitu (1) Serum (bebas dari hemolisis), (2) Plasma (bebas dari hemolisis): Li-heparin atau K2-EDTA plasma. Prinsip pengujiannya dimana ALT (SGPT) mengkatalisis reaksi antara L-alanin dan 2-oxoglutarat. Piruvat yang dihasilkan direduksi dengan NADH dalam reaksi katalisis oleh laktat dehidrogenase (LDH) sehingga terbentuk L-laktat dan  $\text{NAD}^+$ .



Laju oksidasi NADH berbanding lurus dengan aktivitas ALT katalitik. Kadar ALT ditentukan dengan mengukur penurunan absorbansinya. Reagen yang digunakan adalah TRIS buffer: 224 mmol/L, pH 7,6 (25°C); L-alanin: 1120 penstabil; pengawet, dan 2-Oxoglutarat: 94 mmol/L; NADH: 1,7 mmol/L; zat penstabil; bahan tambahan.

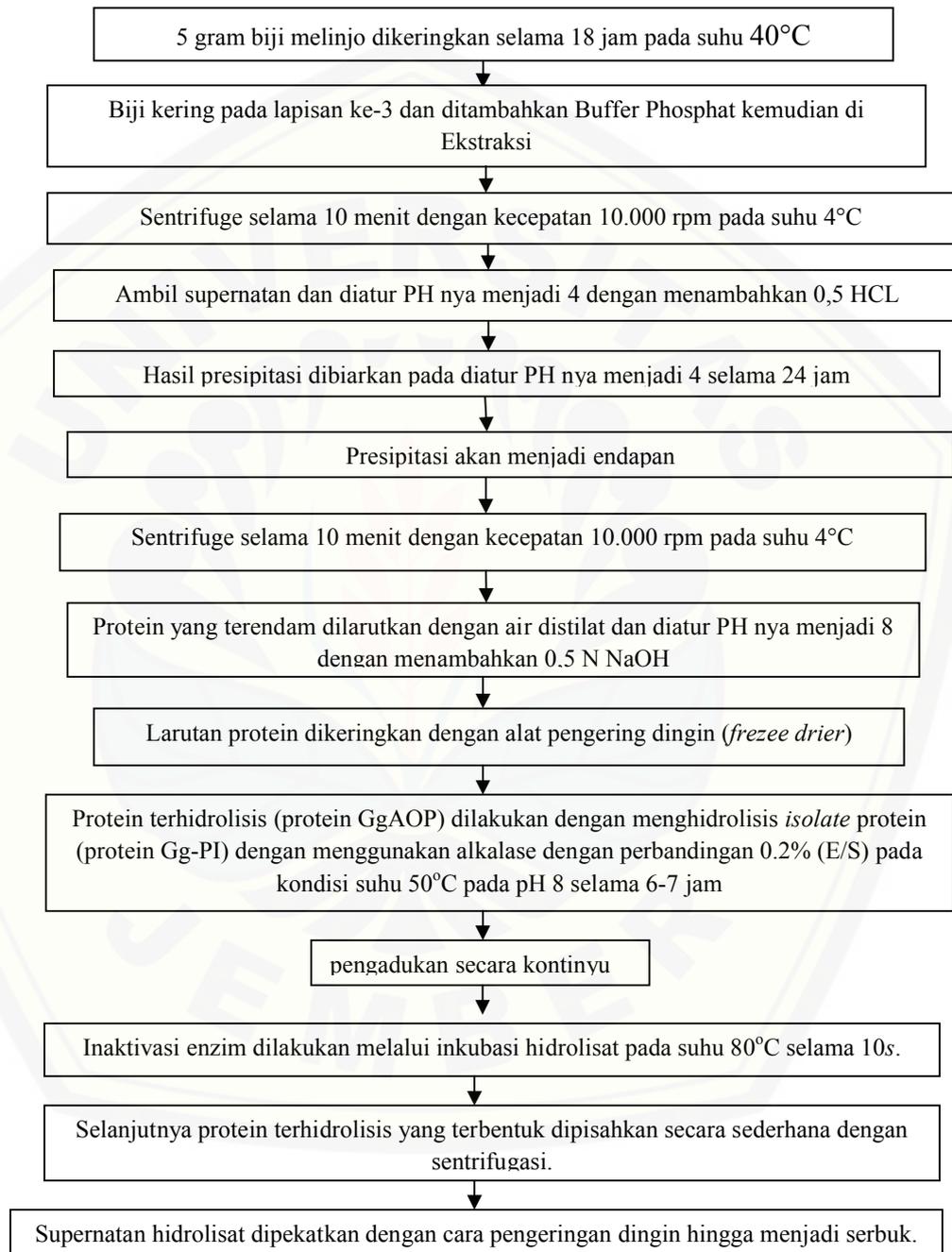
Hasil dari kadar ALT dinyatakan dalam satuan unit/liter (U/L) dan jika menggunakan *Rochel/Hitachi cobas c systems* akan dikonversi dengan rumus (U/L x 0,0167 =  $\mu$ kat/L).

### 3.9 Analisis Data

Analisis data secara statistik pada penelitian ini menggunakan software khusus statistik. Data yang diperoleh dilakukan uji normalitas dan homogenitas varians  $p > 0,005$ . Jika data yang diperoleh 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 di peroleh tidak homogen, maka dilakukan uji *Kruskal Wallis* dengan angka kepercayaan 95% ( $p < 0,05$ ) dan apabila terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*.

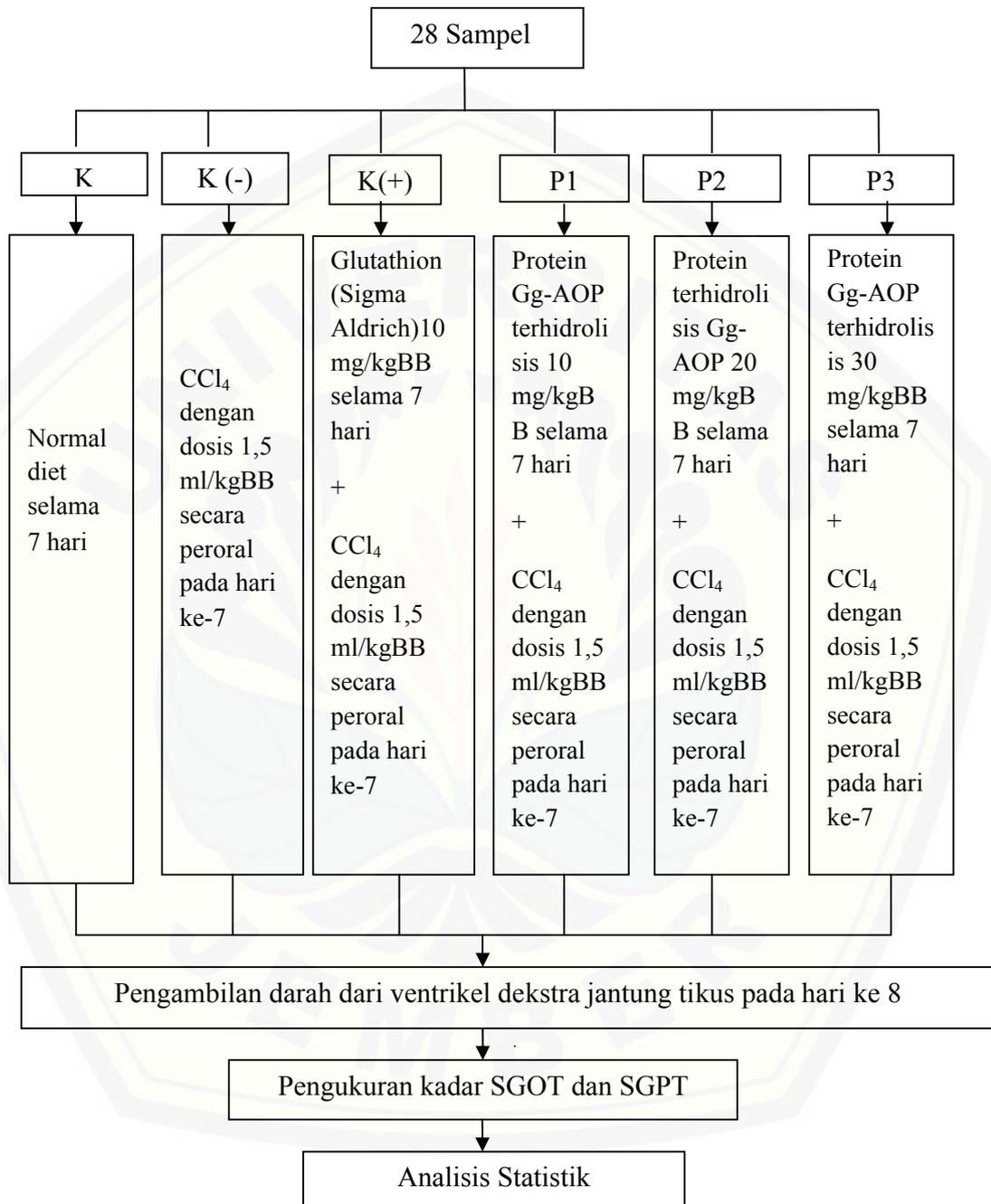
### 3.10 Alur Penelitian

#### 3.10.1 Skema Pembuatan Ekstrak dan Pengisolasian Protein Hidrolisis Biji Melinjo



Gambar 3.1 Skema Pembuatan Ekstrak dan pengelolaan Protein Gg-AOP

## 3.10.2 Skema Perlakuan Terhadap Hewan Coba



Gambar 3.3 Skema Perlakuan Hewan Coba