

**PENGARUH PEMBERIAN TEPUNG TEMPE DAN KEDELAI
REBUS GROBOGAN TERHADAP PROFIL
IMUNOHISTOKIMIA ANTIOKSIDAN SOD PADA JARINGAN
HATI TIKUS PERCOBAAN**

DENTY SARASWATI



**DEPARTEMEN ANATOMI FISIOLOGI DAN FARMAKOLOGI
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2016**

PERNYATAAN MENGENAI SKRIPSI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi berjudul Pengaruh Pemberian Tepung Tempe dan Kedelai Rebus Grobogan Terhadap Profil Imunohistokimia Antioksidan SOD pada Jaringan Hati Tikus Percobaan adalah benar karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir disertasi ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Agustus 2016

Denty Saraswati
NIM B04120006

ABSTRAK

DENTY SARASWATI. Pengaruh Pemberian Tepung Tempe dan Kedelai Rebus Grobogan terhadap Profil Imunohistokimia Antioksidan SOD pada Jaringan Hati Tikus Percobaan. Dibimbing oleh TUTIK WRESDIYATI dan MADE ASTAWAN.

Kedelai sebagai sumber protein mempunyai kandungan isoflavon tinggi yang berfungsi sebagai antioksidan untuk menetralkan radikal bebas. Kedelai mengandung antigizi seperti antitripsin, hemaglutinin, asam fitat, dan oligosakarida. Sehingga perlu untuk dilakukan pengolahan terlebih dahulu. Salah satu produk olahan kedelai yang banyak dikonsumsi adalah tempe. Tempe dibuat dari kedelai dengan cara difermentasi menggunakan kapang *Rhizopus* sp. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD jaringan hati tikus yang diberi perlakuan tepung tempe dan kedelai rebus grobogan. Percobaan dilakukan pada 15 ekor tikus galur *Sprague Dawley* yang dibagi ke dalam lima kelompok, yaitu (I) kasein sebagai kontrol, (J) tepung tempe 10%, (K) tepung tempe 20%, (L) tepung kedelai 10%, dan (M) tepung kedelai 20%. Penelitian ini dilakukan selama 90 hari (EFSA 2011). Antioksidan Cu, Zn-SOD dapat dideteksi melalui teknik pewarnaan imunohistokimia pada jaringan hati tikus. Hasil penelitian menunjukkan pemberian pakan tepung tempe dan tepung kedelai rebus meningkatkan nilai kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD secara nyata pada jaringan hati dibandingkan dengan kasein. Kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD pada jaringan hati tikus yang diberi perlakuan tepung tempe 10% paling tinggi secara sangat nyata ($p < 0,01$) dibandingkan dengan kelompok lainnya.

Kata kunci: kedelai grobogan, tempe, imunohistokimia, SOD, hati

ABSTRACT

DENTY SARASWATI. The Effect of Tempe Flour and Soybean Flour Grobogan against Immunohistochemistry Profile Antioxidants SOD in Rat Liver. Supervised by TUTIK WRESDIYATI and MADE ASTAWAN.

Soybean as a source of protein has a high isoflavone content. Isoflavone is an antioxidants that can neutralize free radicals. Soybean contains anti-nutrient such as antitrypsin, hemagglutinin, phytic acid, and oligosaccharides. So the soybean needs to be processed to minimize anti-nutrients. One of processed soy products is tempe. Tempe made by fermented soybean using *Rhizopus* sp. The purpose of this study was to observe the antioxidant content of Cu, Zn-SOD in liver tissue of rats treated tempe flour and flour of grobogan soybean. The experiment used 15 Sprague Dawley rats that were divided into five groups; (I) casein as a control, (J) tempe flour 10%, (K) tempe flour 20%, (L) soybean flour 10%, and (M) soybean flour 20%. This study was conducted for 90 days (EFSA 2011). Antioxidants Cu, Zn-SOD content was analysis using immunohistochemical technique on rat liver tissue. The results indicate feeding tempe and boiled soybean flour increases the content of the antioxidant which content of Cu, Zn-SOD that significantly found in liver tissue compared to that of casein. The highest content of Cu, Zn-SOD in liver tissue exist in group of rats, especially that fed by 10% tempe flour ($p < 0.01$) among the other groups.

Keywords: grobogan soybean, tempe, immunohistochemistry, SOD, liver

**PENGARUH PEMBERIAN TEPUNG TEMPE DAN KEDELAI
REBUS GROBOGAN TERHADAP PROFIL
IMUNOHISTOKIMIA ANTIOKSIDAN SOD PADA JARINGAN
HATI TIKUS PERCOBAAN**

DENTY SARASWATI

Skripsi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan
pada
Fakultas Kedokteran Hewan

**DEPARTEMEN ANATOMI FISIOLOGI DAN FARMAKOLOGI
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2016**

Judul Skripsi : Pengaruh Pemberian Tepung Tempe dan Kedelai Rebus
Grobogan terhadap Profil Imunohistokimia Antioksidan SOD pada Jaringan Hati
Tikus Percobaan

Nama : Denty Saraswati
NIM : B04120006

Disetujui oleh



Prof Drh Tutik Wresdyati, PhD PAVet

Pembimbing I



Prof Dr Ir Made Astawan, MS

Pembimbing II

Diketahui oleh



Prof Drh Agus Setiyono, MS PhD APVet
Wakil Dekan Bidang Akademik dan Kemahasiswaan
Fakultas Kedokteran Hewan IPB

Tanggal Lulus:

09 AUG 2016

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah *subhanahu wa ta'ala* atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Judul yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan Januari 2015 adalah Pengaruh Pemberian Tepung Tempe dan Kedelai Rebus Grobogan terhadap Profil Imunohistokimia Antioksidan SOD pada Jaringan Hati Tikus Percobaan.

Terima kasih penulis ucapkan kepada Prof Drh Tutik Wresdiyati, PhD, PAVet dan Prof Dr Ir Made Astawan, MS selaku dosen pembimbing yang begitu sabar dalam mengarahkan dalam penyelesaian tulisan ini. Terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (DIKTI) Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang telah mendanai sebagian penelitian ini melalui Penelitian Strategis Aplikatif (PSA) tahun 2016 atas nama Prof Dr Ir Made Astawan, MS.

Di samping itu, penulis sampaikan ucapan terimakasih kepada Staf Pengajar Histologi Drh Adi Winarto, PhD, PAVet dan Dr Drh I Ketut Mudite Adnyane, MSi PAVet. Kepada bapak Iwan dan bapak Maman sebagai Staf di Laboratorium Histologi. Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada keluarga tercinta (Bapak, Ibu, dan Mbak Wanda) atas segala doa dan kasih sayangnya. Kepada Nadia, Apriliyan, Eka, Icel, dan Puput sebagai satu tim dalam penelitian ini. Terima kasih juga untuk Muamar Darda yang selalu memberikan support dan bantuan. Terakhir saya ucapkan terima kasih untuk seluruh teman-teman di FKH 49 "Astrocyte".

Penulis menyadari bahwa masih terdapat kesalahan dan kekurangan dalam penulisan karya ilmiah ini. Kritik dan saran sangat diharapkan oleh penulis. Semoga karya ilmiah ini bermanfaat.

Bogor, Agustus 2016

Denty Saraswati

DAFTAR ISI

ABSTRAK	ii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xii
PENDAHULUAN	1
Latar Belakang	1
Tujuan Penelitian	2
Manfaat Penelitian	2
TINJAUAN PUSTAKA	2
Kedelai Grobogan	2
Tempe	2
Radikal Bebas	3
Antioksidan	3
Hati	4
Teknik Pewarnaan Imunohistokimia	4
METODE	5
Tempat dan Waktu Penelitian	5
Alat dan Bahan Penelitian	5
Prosedur Penelitian	5
Analisis Data	7
HASIL DAN PEMBAHASAN	8
SIMPULAN	11
DAFTAR PUSTAKA	12
LAMPIRAN	15
RIWAYAT HIDUP	19

DAFTAR TABEL

1 Kandungan Cu, Zn-SOD pada jaringan hati tikus perlakuan	9
2 Jumlah sel hati pada berbagai tingkat kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD jaringan hati tikus perlakuan	9

DAFTAR GAMBAR

1 Foto mikrograf berbagai tingkat kandungan antioksidan Cu,Zn-SOD pada jaringan hati tikus yang diwarnai secara imunohistokimia	8
2 Foto mikrograf jaringan hati tikus perlakuan yang diwarnai secara imunohistokimia terhadap kandungan antioksidan Cu,Zn-SOD	10

DAFTAR LAMPIRAN

1 Hasil analisis statistik profil kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD pada jaringan hati tikus berbagai perlakuan	15
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Salah satu bahan pangan yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia adalah kedelai. Kebutuhan kedelai di Indonesia mencapai 2,2 juta ton/tahun dan 1,3 juta ton di antaranya digunakan untuk produksi tempe (Astawan *et al.* 2015a; Astawan *et al.* 2015b). Kedelai lokal memiliki beraneka ragam varietas seperti grobogan, anjasmara, dan agromulyo (Astawan *et al.* 2013). Kedelai grobogan merupakan jenis kedelai yang banyak ditanam di Kabupaten Grobogan, Jawa Tengah. Kedelai ini memiliki keunggulan bobot biji yang besar, bulat berwarna kuning, dan polong yang sudah masak tidak mudah pecah (Astawan *et al.* 2013; DINPERTAN 2014). Umumnya kedelai dimanfaatkan untuk dijadikan produk olahan contohnya tempe. Tempe merupakan produk olahan kedelai yang difermentasi menggunakan kapang *Rhizopus* sp. (Mursyid *et al.* 2014). Kedelai sebagai sumber protein paling baik diantara jenis kacang-kacangan yang lain. Selain itu kedelai merupakan sumber lemak, vitamin, mineral, dan serat (Koswara 2006). Kandungan isoflavon dalam kedelai juga tinggi yang berfungsi sebagai antioksidan untuk menetralkan radikal bebas (Astuti 2008).

Radikal bebas sering juga disebut senyawa oksigen reaktif (*reactive oxygen species*/ROS). Secara kimia, radikal bebas merupakan sebuah molekul yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Sifatnya tidak stabil, sangat reaktif, dan dapat mengambil elektron dari molekul lain dalam upaya mendapatkan pasangan elektronnya (Halliwell 2011). Secara normal tubuh menghasilkan radikal bebas secara fisiologis sebagai hasil samping dari reaksi metabolisme. Radikal bebas yang berlebihan dalam tubuh dapat merusak sel terutama perubahan makromolekul seperti oksidasi lipid, oksidasi protein, dan perubahan DNA (Dizdaroglu dan Jaruga 2012). Adanya antioksidan dapat menghambat reaksi oksidasi melalui pengikatan dengan radikal bebas sehingga kerusakan sel dapat dicegah (Kumar dan Kumar 2009).

Secara alami tubuh memiliki antioksidan endogen sebagai sistem pertahanan terhadap radikal bebas. Antioksidan endogen terdapat di dalam tubuh yang terdiri atas enzim-enzim yang disintesis oleh tubuh, seperti superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathion peroksidase (Sanmugapriya dan Venkataraman 2006). Jumlah radikal bebas yang berlebihan di dalam tubuh dapat menurunkan kemampuan aktivitas enzim-enzim yang berfungsi sebagai antioksidan. Dengan demikian dibutuhkan adanya antioksidan eksogen yaitu antioksidan yang berasal dari bahan pangan yang dikonsumsi.

Menurut Dewoto (2007) perlakuan yang diberikan selama satu atau tiga bulan merupakan uji toksisitas subkronis yaitu untuk mengetahui efek toksik pada pemberian jangka panjang. Uji tersebut menggunakan hewan laboratorium seperti tikus. Uji toksistas terhadap pakan direkomendasikan untuk dilakukan selama 90 hari (EFSA 2011). Pada penelitian ini dilakukan uji subkronis terhadap tepung tempe dan kedelai rebus grobogan pada tikus selama 90 hari dan dilihat efeknya pada profil kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD pada hati tikus percobaan. Antioksidan Cu, Zn-SOD dapat dideteksi melalui teknik pewarnaan imunohistokimia pada jaringan hati tikus (Wresdiyati *et al.* 2008). Penambahan

antioksidan yang berasal dari pakan seperti kedelai akan melindungi organ dari radikal bebas karena kemampuan isoflavon sebagai penangkap radikal bebas. Isoflavon yang berasal dari pakan dialirkan oleh darah menuju ke hati yang akan mempengaruhi kandungan antioksidan jaringan hati tikus. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui tingkat kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD yang terdapat dalam jaringan hati tikus setelah diberi berbagai perlakuan pemberian pakan yang mengandung antioksidan dalam kondisi tubuh yang normal.

Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD secara imunohistokimia pada jaringan hati tikus yang diberi perlakuan tepung tempe dan kedelai rebus grobogan.

Manfaat Penelitian

Memberikan informasi ilmiah tentang kandungan antioksidan pada jaringan hati tikus yang diberi tepung tempe dan kedelai rebus grobogan.

TINJAUAN PUSTAKA

Kedelai Grobogan

Kedelai grobogan merupakan salah satu varietas kedelai unggul Indonesia yang berasal dari Kabupaten Grobogan, Jawa Tengah. Kebutuhan Kedelai grobogan mengandung 38,27% protein, 19,65% lemak, kadar air 11,68%, karbohidrat 38,82%, dan abu 5,27% abu (Astawan *et al* 2013). Kandungan isoflavon utama pada kedelai adalah genestein dan daidzein, sedangkan glycitein dalam jumlah yang relatif kecil (Astawan 2013). Kedelai grobogan memiliki keunggulan yaitu bobot biji yang besar (18 g/100 biji). Kandungan protein pada kedelai tergolong mudah dicerna hampir sebanding dengan protein hewani. Selain itu kedelai grobogan memiliki keunggulan umurnya lebih pendek, polongnya besar dan tingkat kematangan polong dan daun bersamaan, jadi pada saat dipanen daun kedelai sudah rontok (BPTPI 2010).

Kedelai mengandung zat antigizi seperti antitripsin, hemagglutinin, asam fitat, dan oligosakarida. Sehingga perlu untuk dilakukan pengolahan terlebih dahulu untuk menginaktivasi senyawa tersebut supaya kualitas produk lebih baik. Salah satunya proses pemanasan untuk merusak antitripsin (Astawan 2008).

Tempe

Tempe merupakan produk olahan kedelai yang difermentasi menggunakan kapang *Rhizopus sp.* (Mursyid *et al.* 2014). Kapang yang tumbuh pada pembuatan

tempe akan membentuk *hifa*, yaitu benang putih yang menyelimuti permukaan biji kedelai dan membentuk *misellium* yang mengikat biji kedelai satu sama lain, membentuk struktur yang kompak dan tekstur yang padat (Astawan *et al.* 2013).

Tempe mengandung kandungan protein yang tinggi dan isoflavon sebagai antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas (Watanabe *et al.* 2007). Kapasitas antioksidan pada tempe berkisar 186-191 mg AEAC/kg tempe (Astawan *et al.* 2013). Tempe juga memiliki kandungan gizi lainnya yang bermanfaat bagi tubuh seperti asam lemak, vitamin, dan mineral. Kandungan asam lemak pada tempe derajat ketidakhujannya meningkat. Hal tersebut dikarenakan adanya proses fermentasi pada tempe. Asam lemak tidak jenuh ini mempunyai efek penurunan terhadap kandungan kolesterol serum, sehingga dapat menetralkan efek negatif kolesterol di dalam tubuh (BSN 2012). Proses pemanasan dan fermentasi dalam tempe dapat menghilangkan zat antigizi yang terdapat dalam kedelai seperti antitripsin, hemaglutinin, dan asam fitat (Astawan 2008).

Radikal Bebas

Radikal bebas adalah molekul yang mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbit terluarnya. Radikal bebas akan terus menerus terbentuk baik melalui proses metabolisme maupun akibat dampak negatif lingkungan. Radikal bebas dapat terbentuk melalui sistem biologis dalam tubuh seperti proses respirasi, inflamasi, dan latihan atau berasal dari luar tubuh seperti polusi, asap rokok, radiasi, dan sinar UV (Hollman *et al.* 2011). Pada kondisi radikal bebas yang berlebihan dalam tubuh dan kurangnya antioksidan akan memicu terjadinya stres oksidatif yang berperan dalam patogenesis berbagai penyakit degeneratif. Molekul yang termasuk ke dalam radikal bebas tipe 1 diantaranya ialah anion superoksida ($+O_2^-$), radikal hidroksil (OH^-), dan radikal peroksil lipid (LOO). ROS yang tergolong non radikal seperti hidrogenperoksida (H_2O_2), singlet oksigen (1O_2), dan asam hipoklorat (HOCl) (Ardhie 2011).

Anion superoksida merupakan radikal bebas yang sangat reaktif dan paling berbahaya bagi sel. Superoksida bersifat reduktan dan oksidan serta dapat bereaksi dengan berbagai substrat biologis. Secara fisiologis, radikal bebas berperan dalam proses transpor elektron, metabolisme tubuh dalam keadaan aerobik, fagositosis, serta sintesis DNA dan protein (Jones 2008). Jika jumlah radikal bebas terlalu banyak akan mengakibatkan kerusakan pada sel-sel tubuh terutama perubahan makromolekul seperti oksidasi lipid, oksidasi protein, dan perubahan DNA (Dizdaroglu dan Jaruga 2012).

Antioksidan

Antioksidan merupakan molekul yang dapat mengendalikan reaksi radikal bebas dalam tubuh. Antioksidan dibagi menjadi dua kelompok yaitu antioksidan endogen dan antioksidan eksogen. Antioksidan endogen secara alami terdapat di dalam tubuh dan bekerja berdasarkan proses enzimatik. Antioksidan endogen contohnya superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathion peroksidase (Sanmugapriya dan Venkataraman 2006). Antioksidan enzim superoksida

dismutase (SOD) adalah satu-satunya enzim eukariotik yang mampu detoksifikasi superoksida jenis ROS (Van Raamsdonk dan Hekimi 2012). SOD adalah antioksidan endogen utama pada sel-sel tubuh yang bekerja spesifik menetralkan radikal bebas anion superoksida (Carroll *et al.* 2007). Enzim superoksida dismutase (SOD) menghilangkan O_2^- dengan mengkatalisis dismutase, O_2^- direduksi menjadi H_2O_2 dan dioksidasi menjadi O_2 .



Berdasarkan *co-factor* logam yang digunakan oleh enzim SOD diklasifikasikan menjadi tiga grup, yaitu *iron* SOD (FeSOD), *manganese* SOD (MnSOD), dan *copper, zinc* SOD (Cu, Zn-SOD). Ketiganya di dalam sel berada di tempat yang berbeda (Ziniu *et al.* 2011). Hewan memiliki komponen aktif MnSOD di matriks mitokondria serta Cu,Zn-SOD di mitokondria dan sitosol (Halliwell dan Gutteridge 2015). Cu,Zn-SOD terlihat jelas pada sitoplasma maupun inti sel hati (Wresdiyati *et al.* 2006).

Antioksidan eksogen adalah antioksidan yang berasal dari luar tubuh dan berasal dari bahan pangan seperti β -carotene, asam askorbat (Vitamin C), tokoferol (Vitamin E), dan isoflavon (Soviana *et al.* 2014). Kondisi stres oksidatif yaitu jumlah antioksidan yang tidak seimbang dengan jumlah radikal bebas membutuhkan tambahan antioksidan dari luar tubuh yang berasal dari bahan pangan maupun suplemen.

Hati

Hati (hepar) merupakan organ terbesar di dalam tubuh yang berada di dalam ruang abdomen. Organ ini berperan penting dalam metabolisme, termasuk menyimpan glikogen, dekomposisi sel darah merah, sintesis protein plasma, dan detoksifikasi (Opoku *et al.* 2007). Hati berperan sebagai alat sekresi karena menghasilkan empedu yang berperan dalam emulsifikasi dan absorpsi lemak.

Hati tikus memiliki 4 lobus, yaitu lobus lateral kanan, lobus medial, lobus kiri, dan lobus kaudatus. Lobus kiri dan lobus medial membentuk satu lobus, namun lobus media terdapat bagian menjorok ke dalam tempat ligament melekat. Lobus lateral kanan terbagi menjadi dua sub-lobus. Lobus caudatus terbagi menjadi bagian paracaval dan Spiegel lobus. Sistem vena pada tikus, vena centralis terdapat dikelilingi oleh lobulus hati kemudian aliran darah mengalir ke vena hepatica dan terakhir ke vena cava (Martins dan Neuhaus 2007)

Secara histologi hati tersusun atas beberapa jenis sel yang termasuk ke dalam kelompok sel parenkim dan non parenkim. Tersusun oleh hepatosit (sel parenkim hati) yang bertanggung jawab terhadap peran utama hati dalam metabolisme. Sel-sel tersebut terletak di antara sinusoid yang terisi darah dan saluran empedu. Sel Kupffer melapisi sinusoid hati dan merupakan bagian penting dari sistem retikuloendotelial tubuh.

Teknik Pewarnaan Imunohistokimia

Teknik pewarnaan imunohistokimia adalah pewarnaan yang digunakan untuk mendeteksi komponen aktif yang terdapat di dalam jaringan berdasarkan

reaksi dari ikatan antigen (Ag) dan antibodi (Ab). Teknik tersebut digunakan untuk melihat distribusi enzim spesifik serta mendeteksi keberadaan berbagai komponen aktif yang terdapat di dalam jaringan seperti protein dan karbohidrat (Matos *et al* 2010). Pewarnaan imunohistokimia Cu, Zn-SOD menggunakan antibodi primer, yaitu antibodi monoklonal Cu, Zn-SOD. Pewarnaan imunohistokimia terhadap Cu,Zn-SOD dilakukan untuk mendeteksi sel-sel penghasil Cu,Zn-SOD yang dapat menunjukkan jumlah sel penghasil serta kandungan antioksidan Cu,Zn-SOD (Wresdiyati *et al.* 2006).

METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari sampai dengan Desember 2015, di Laboratorium Histologi, Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas *tissue*, sarung tangan, timbangan digital, botol sampel, *tissue basket*, inkubator, cup untuk *embedding*, kulkas, mikrotom putar, pisau mikrotom, gelas objek, *cover glass*, rak gelas objek, pipet tetes, pipet *Mohr*, mikropipet, gelas piala, gelas ukur, tabung Erlenmeyer, mikroskop dan kamera *dino eye*.

Bahan yang digunakan untuk penelitian terdiri atas: 15 organ hati tikus galur *Sprague Dawley*, akuades, larutan Bouin, alkohol (70%, 80%, 90%, 95%, dan alkohol absolut), xylol, parafin, akuades, pewarna hematoksin, antibodi Cu,Zn-SOD (Sigma S2147), metanol, miliQ, larutan H₂O₂, larutan PBS, *background sniper* (*protein blocker*), *Trek Universal Link*, *Trek Avidin HRP*, *Diaminobenzidine* (*DAB*), entelan, dan program software *McMaster Biophotonics Image J*.

Prosedur Penelitian

Perlakuan Hewan Percobaan

Penelitian ini merupakan penelitian payung atau penelitian bersama tentang tempe. Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan dari 13 kelompok perlakuan yang dilaksanakan tim peneliti. Penelitian menggunakan metode rancangan acak lengkap (RAL). Penelitian ini menggunakan 15 ekor tikus galur *Sprague Dawley* yang dibagi ke dalam lima kelompok perlakuan. Perlakuan dengan pakan berdasarkan sumber dan kadar protein dalam ransum, yaitu (I) protein 10% dari kasein (kasein 10%), (J) protein 10% dari tepung tempe (tempe 10%), (K) protein 20% dari tepung tempe (tempe 20%), (L) protein 10% dari tepung kedelai (kedelai 10%), dan (M) protein 20% dari tepung kedelai (kedelai 20%). Perlakuan dilakukan selama 90 hari (EFSA 2011). Tepung tempe dan tepung kedelai rebus

diformulasikan ke dalam ransum sesuai standar *Association of Official Analytical Chemist* (AOAC 2005). Penggunaan tikus sebagai hewan coba dalam penelitian ini dilakukan berdasarkan *ethical clearance* ACUC NO. 06-2013IPB.

Sampling dan Pembuatan Preparat Histologi Jaringan Hati

Pengambilan sampel (*sampling*) dilakukan setelah 90 hari pemberian ransum pakan dengan mengorbankan tikus perlakuan. Tikus dibius menggunakan kombinasi ketamine 70 mg/kg BB dan xylazine 20 mg/kg BB secara intraperitoneal. Tikus percobaan kemudian dibedah laparotomi untuk diambil organ hatinya. Organ hati tikus dibersihkan dengan larutan NaCl fisiologis 0,9%, lalu dimasukkan dalam larutan Bouin (asam pikrat jenuh, formalin, dan asam asetat glasial dengan perbandingan 15:5:1) untuk melakukan fiksasi. Lama waktu fiksasi adalah 24 jam. Selesai proses fiksasi organ dipindahkan ke alkohol 70 % sebagai *stopping point*. Organ hati dapat dipotong menjadi ukuran dadu atau *trimming* kemudian dimasukkan ke dalam *tissue basket*.

Tissue basket yang sudah berisi organ kemudian dilakukan proses dehidrasi dengan menggunakan alkohol 80%, 90%, dan 95% yang dilakukan masing-masing selama 24 jam. Proses dehidrasi selanjutnya menggunakan alkohol absolut I, II dan III masing-masing selama 1 jam.

Proses selanjutnya dilakukan *clearing* ke dalam xylol I, II, dan III masing-masing selama 1 jam. *Clearing* pada xylol III dilakukan selama 30 menit pada suhu ruang dan 30 menit pada suhu 60 °C dalam inkubator, dilanjutkan dengan infiltrasi dalam parafin cair I, II, III pada suhu 60 °C masing-masing 30 menit di dalam inkubator.

Embedding yaitu penanaman hati pada cetakan dengan menggunakan paraffin kemudian didinginkan. Organ yang telah di*embedding* dan sudah mengeras disimpan dalam refrigerator. Cetakan parafin yang berisi organ dipotong kotak-kotak dan ditempelkan pada balok kayu.

Parafin yang sudah berisi organ dan berbentuk balok dilakukan pemotongan menggunakan mikrotom yang disebut dengan *sectioning*. Organ yang sudah berhasil dipotong direndam dalam akuades. Hasil pemotongan yang bagus dengan ketebalan yang cukup dimasukkan ke dalam akuades dalam suhu 37°C menggunakan *waterbath*. Preparat untuk pewarnaan imunohistokimia menggunakan gelas objek yang sudah di *coating* dengan *neophren in toluene* 0.2% yang berfungsi untuk merekatkan jaringan. Preparat yang telah jadi diinkubasi terlebih dahulu dalam inkubator selama 1-3 hari dalam suhu 37°C sebelum dilakukan pewarnaan.

Pewarnaan Imunohistokimia

Pewarnaan imunohistokimia yang dilakukan menggunakan metode yang digunakan oleh Wresdiyati *et al.* (2006) untuk mendeteksi profil antioksidan Cu,Zn-SOD pada jaringan hati tikus percobaan. Tahap awal pewarnaan imunohistokimia adalah deparafinisasi dan rehidrasi. Proses deparafinisasi dilakukan dengan merendam preparat pada gelas objek menggunakan *basket slide* ke dalam xylol III, II, I secara berurutan masing-masing selama 3 menit. Setelah itu, dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan memasukkan preparat ke dalam larutan

alkohol bertingkat (alkohol absolut III, II, I, alkohol 95%, 90%, 80%, sampai alkohol 70%) masing-masing selama 3 menit. Setelah itu preparat direndam dengan MilliQ selama 10 menit sebagai *stopping point*. Proses selanjutnya adalah penghilangan enzim peroksidase endogen menggunakan substrat metanol sebanyak 30 ml yang ditambah dengan H₂O₂ sebanyak 0.3 ml (disiapkan sesaat sebelum gelas objek dimasukkan) kemudian preparat dicelupkan ke dalam larutan selama 15 menit dalam keadaan gelap. Selanjutnya dilakukan pencucian menggunakan MilliQ dan PBS masing-masing sebanyak 2 kali selama 5 menit. Permukaan preparat disekitar jaringan hati dikeringkan menggunakan tisu namun jaringan tidak dibiarkan kering,

Sediaan preparat disusun berjajar dalam kotak preparat lembab, kemudian masing-masing preparat ditetesi dengan normal serum sebanyak 30 µl. Tujuan penetasan normal serum adalah untuk memblokir Ag nonspesifik yang terdapat di dalam sel agar tidak mengacaukan reaksi. Kotak preparat ditutup rapat dan diinkubasi di dalam inkubator suhu 37 °C selama 45-60 menit. Selanjutnya preparat dicuci menggunakan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit dan dikeringkan. Jaringan ditetesi dengan *biocare's background sniper* yang berfungsi sebagai protein *blocker* dan diinkubasi kembali di dalam inkubator suhu 37 °C selama 15 menit.

Preparat dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Setelah itu, preparat ditetesi dengan antibodi primer Cu,Zn-SOD 1:200 dalam PBS sebanyak 30 µl pada masing-masing preparat, kemudian diinkubasi pada suhu 4°C selama dua malam (48 jam). Setelah diinkubasi, preparat dicuci kembali dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit, selanjutnya ditambahkan satu tetes *trekkie universal link* dan diinkubasi selama 20 menit di dalam inkubator suhu 37°C. Preparat dicuci kembali dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit, kemudian ditambahkan satu tetes *trekAvidin-HRP* pada sediaan kemudian diinkubasi di dalam inkubator suhu 37°C selama 10 menit, lalu dicuci kembali dengan PBS sebanyak 3 kali selama masing-masing 5 menit.

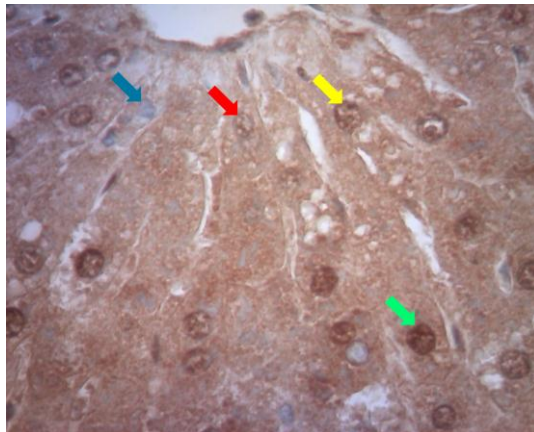
Preparat selanjutnya ditetesi dengan larutan kromogen *diaminobenzidine* (DAB) dalam kondisi gelap selama 4 menit pada suhu ruang. Kemudian preparat dicuci dengan MilliQ dan dilakukan pengecekan dengan mikroskop cahaya. Adanya warna coklat pada sediaan menunjukkan hasil positif. Proses selanjutnya adalah *counterstain* menggunakan pewarna hematoksilin untuk mewarnai sel yang tidak menghasilkan antioksidan Cu,Zn-SOD selama 20 detik. Selanjutnya preparat dicuci dengan MilliQ dan dilanjutkan dengan dehidrasi pada alkohol bertingkat 70%, 80%, 90%, 95%, absolut I, dan absolut II masing-masing beberapa detik serta absolut III selama 1 menit, dilanjutkan penjernihan dengan xylol I dan II selama beberapa detik, serta xylol III selama 1 menit. Proses pewarnaan diakhiri dengan *mounting* (penutupan dengan *cover glass*) menggunakan entelan. Preparat yang telah selesai diwarnai kemudian diamati di bawah mikroskop cahaya dan didokumentasikan dengan kamera.

Analisis Data

Profil antioksidan Cu,Zn-SOD ditandai dengan adanya warna coklat pada inti dan sitoplasma sel. Pengamatan dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif.

Pengamatan secara kualitatif dilakukan terhadap intensitas warna coklat dan penyebarannya pada jaringan hati. Pengamatan secara kuantitatif dilakukan dengan menghitung jumlah inti sel hati (hepatosit) yang bereaksi pada berbagai tingkatan Cu,Zn-SOD pada jaringan yang diamati. Perbedaan reaksi yang terjadi tersebut dilakukan penghitungan yang dibagi menjadi tiga tingkatan intensitas warna untuk reaksi positif dan satu warna untuk untuk reaksi negatif. Reaksi positif pada berbagai tingkat kandungan terhadap Cu,Zn-SOD ditunjukkan oleh warna coklat tua atau positif kuat (+++) yang memenuhi seluruh bagian nukleoplasma, coklat sedang atau positif sedang (++) yang memenuhi sebagian dari nukleoplasma, dan coklat muda kebiruan atau positif lemah (+) bagian tepi dari inti sel berwarna coklat tipis dan nukleoplasma berwarna putih atau kebiruan. Reaksi negatif (-) ditunjukkan dengan warna biru yang berarti sel tidak mengandung Cu,Zn-SOD. Penghitungan sel-sel tersebut dilakukan pada pembesaran 400x, yang dilakukan pada lima lapang pandang yang berbeda secara acak pada setiap preparat jaringan (Wresdiyati *et al.* 2006).

Data kuantitatif yang diperoleh dari setiap parameter (variabel) pengamatan dicatat dan disusun ke dalam bentuk tabel. Data kuantitatif yang didapatkan diawali dengan uji *analysis of varian* (ANOVA) menggunakan bantuan *software SPSS release 20*. Apabila hasil uji menunjukkan $p < 0,05$ maka data tersebut dilanjutkan dengan uji Duncan. Data kualitatif disajikan secara deskriptif berupa gambar. Perhitungan kuantitatif dilakukan berdasarkan tingkat kandungan Cu, Zn-SOD (Gambar 1).



Gambar 1 Foto mikrograf berbagai tingkat kandungan antioksidan Cu,Zn-SOD pada jaringan hati tikus yang diwarnai secara imunohistokimia.

→ = positif kuat (+++), → = positif sedang (++) , → = positif lemah (+), → = negatif (-)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan kualitatif dengan pewarnaan imunohistokimia (Gambar 2) dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 Kandungan Cu, Zn-SOD pada jaringan hati tikus perlakuan

Kelompok	Kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD
Kasein 10%	++
Tempe 10%	+++++
Tempe 20%	+++
Kedelai 10%	++++
Kedelai 20%	+++

(+) = adanya kandungan antioksidan pada sitoplasma dan inti sel jaringan hati tikus perlakuan.

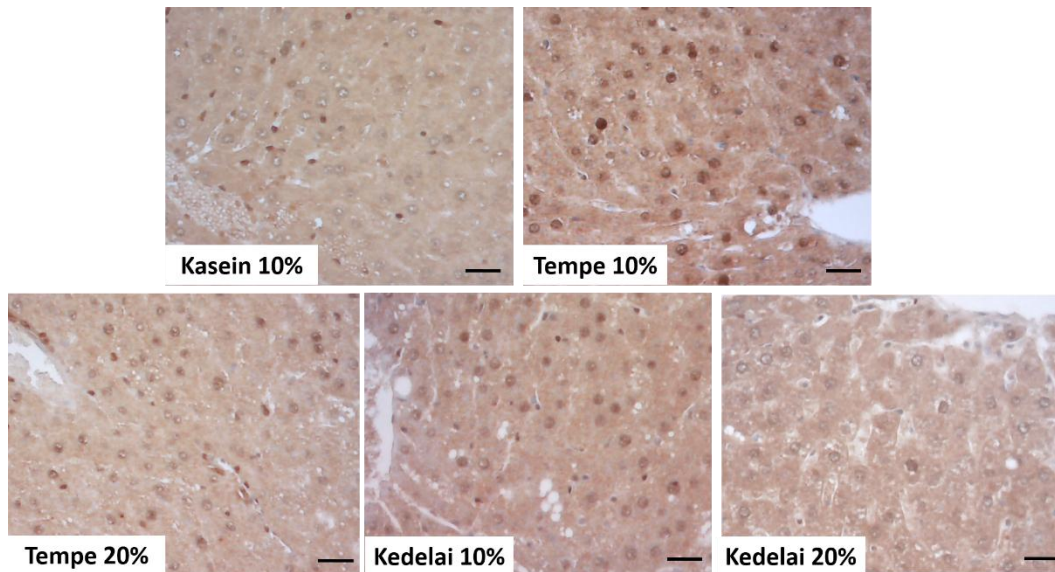
Kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD pada jaringan hati tikus pada keempat kelompok perlakuan yang diberi pakan mengandung tempe dan kedelai 10% maupun 20% lebih tinggi dibandingkan dengan pemberian kasein 10%. Terlihat dari intensitas warna coklat yang terbentuk pada inti dan sitoplasma sel pada jaringan hati pada keempat perlakuan tersebut yang lebih tinggi dibandingkan dengan kasein 10%. Jaringan hati tikus kelompok tempe 20% dan kelompok kedelai 20% memiliki kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD yang lebih tinggi dibandingkan kelompok kasein 10%. Terlihat dari intensitas warna coklat pada inti dan sitoplasma sel pada jaringan hati pada kelompok tempe 20% dan kedelai 20% yang lebih tinggi. Kandungan antioksidan Cu, Zn SOD pada jaringan hati kelompok kedelai 10% lebih tinggi dibandingkan kelompok kasein 10%, tempe 20%, dan kedelai 20%. Hal ini ditunjukkan dengan intensitas warna coklat yang terbentuk pada inti dan sitoplasma sel di jaringan hati pada kelompok kedelai 10% lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kasein 10%, tempe 20%, dan kedelai 20%. Kandungan antioksidan Cu, Zn SOD pada jaringan hati kelompok tempe 10% paling tinggi dibandingkan kelompok lainnya. Hal ini ditunjukkan dengan intensitas warna coklat yang terbentuk pada inti dan sitoplasma sel pada jaringan hati pada kelompok tempe 10% paling tinggi dibandingkan dengan kelompok lainnya. Pemberian pakan mengandung tempe 10% paling tinggi dalam menghasilkan profil Cu, Zn-SOD.

Hasil analisis statistik dari pengamatan kuantitatif terhadap kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2 Jumlah sel hati pada berbagai tingkat kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD jaringan hati tikus perlakuan

Kelompok Perlakuan	Jumlah inti sel hati yang mengandung Cu,Zn-SOD pada berbagai kandungan			
	+++	++	+	-
Kasein 10%	27.40±7.53 ^a	81.40±8.22 ^a	35.00±5.42 ^b	31.27±8.63 ^d
Tempe 10%	97.93±8.42 ^c	111.67±15.77 ^c	27.40±6.64 ^a	3.67±1.63 ^a
Tempe 20%	40.80±5.66 ^c	116.47±15.78 ^c	44.60±6.75 ^c	19.27±3.64 ^c
Kedelai 10%	87.67±10.16 ^d	100.53±8.67 ^b	28.73±5.52 ^a	12.87±1.81 ^b
Kedelai 20%	35.20±4.36 ^b	96.47±11.13 ^b	45.87±10.33 ^c	21.93±4.25 ^c

Positif kuat (+++), positif sedang (++), positif lemah (+), dan reaksi negatif (-). Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan hasil yang sangat berbeda nyata ($p < 0,01$).



Gambar 1 Foto mikrograf jaringan hati tikus perlakuan yang diwarnai secara imunohistokimia terhadap kandungan antioksidan Cu,Zn-SOD. Kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD paling tinggi terlihat pada kelompok perlakuan tepung tempe 10%. Skala 50 μ m

Pemberian tepung tempe dan tepung kedelai 10% maupun 20% memiliki kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD lebih tinggi dibandingkan dengan pemberian kasein. Hal ini didukung oleh jumlah sel yang bereaksi positif kuat (+++) pada keempat perlakuan lebih tinggi secara sangat nyata ($p < 0,01$) dan jumlah sel yang bereaksi negatif lebih rendah secara sangat nyata dibandingkan dengan kasein. Kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD yang terdapat pada jaringan hati tikus disebabkan oleh pemberian pakan mengandung tempe dan kedelai mengandung isoflavon (Astuti 2008). Isoflavon kedelai sebagai penangkap (*scavenger*) radikal bebas dapat melindungi hati dari stress oksidatif dan meningkatkan kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD dalam jaringan.

Kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD pada jaringan hati tikus kelompok tempe 10% lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kedelai 10%. Hal ini didukung oleh jumlah sel yang bereaksi positif kuat (+++) lebih tinggi secara sangat nyata ($p < 0,01$) dan jumlah sel yang bereaksi negatif lebih rendah secara sangat nyata ($p < 0,01$) pada kelompok tempe 10% dibandingkan dengan kelompok kedelai 10%. Pemberian tempe 10% lebih baik dalam meningkatkan kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD pada jaringan hati tikus dibandingkan dengan pemberian kedelai 10%.

Kelompok tempe 20% memiliki kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD pada jaringan hati tikus lebih tinggi apabila dibandingkan kelompok kedelai 20%. Hal ini didukung oleh data yang terdapat dalam Tabel 1 yaitu jumlah sel yang bereaksi positif kuat (+++) dan positif sedang pada jaringan hati kelompok tempe 20% lebih tinggi secara sangat nyata ($p < 0,01$) dibandingkan kelompok kedelai 20%. Pemberian pakan yang mengandung tepung tempe 20% juga lebih baik dalam meningkatkan kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD dibandingkan dengan pemberian kedelai 20%. Tempe merupakan produk olahan kedelai yang difermentasi menggunakan kapang *Rhizopus sp.* (Mursyid *et al.* 2014). Proses fermentasi tersebut menyebabkan kandungan isoflavon yang terdapat di dalam kedelai akan menurun kadarnya terutama isoflavon glukosida dan malonyl, tetapi

meningkatkan bioavailabilitas isoflavon (Ferreira *et al.* 2011). Proses fermentasi tersebut mengubah sebagian besar glukosida menjadi aglikon yang lebih mudah untuk diserap oleh tubuh (Utari *et al.* 2010).

Kelompok tempe 10% dan kelompok kedelai 10% memiliki kandungan antioksidan pada jaringan hati tikus lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok tempe 20%, kelompok kedelai 20% dan kasein 10%. Hal ini ditunjukkan oleh data yang terdapat pada Tabel 2 yaitu jumlah sel yang bereaksi positif kuat (+++) pada kelompok tempe 10% dan kedelai 10% lebih tinggi secara sangat nyata ($p < 0,01$) dan jumlah sel yang bereaksi negatif lebih rendah secara sangat nyata ($p < 0,01$) dibandingkan dengan kelompok tempe 20%, kedelai 20%, dan kasein. Hasil ini menunjukkan pemberian pakan mengandung tempe 10% dan kedelai 10% lebih baik dalam meningkatkan kandungan antioksidan pada jaringan hati dibandingkan dengan pemberian tempe 20%, kedelai 20%, dan kasein 10%. Pemberian pakan mengandung tempe 20% dan kedelai 20% telah dapat meningkatkan kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD pada jaringan hati karena memiliki jumlah sel yang bereaksi positif kuat (+++) lebih tinggi secara sangat nyata ($p < 0,01$) daripada kasein. Kasein merupakan sumber protein hewani, tetapi tidak mengandung isoflavon yang berfungsi sebagai antioksidan. Salah satu fungsi hati adalah memetabolisme protein menjadi asam amino yang dapat diserap oleh tubuh dan mengubah amonia yang bersifat racun menjadi urea dan dikeluarkan melalui urin (Stockham dan Scott 2008). Kandungan protein yang berlebih dalam ransum dapat memungkinkan terjadinya penumpukan sisa hasil metabolisme protein di hati yang tidak dikeluarkan melalui urin. Akibatnya fungsi fisiologi hati menjadi terganggu sehingga kadar antioksidan dalam hati menurun. Kadar SOD yang menurun pada jaringan hati terjadi karena penggunaan Cu,Zn-SOD sebagai penangkap radikal bebas yang dihasilkan dari metabolisme protein tersebut

Jaringan hati tikus percobaan yang diberi perlakuan pemberian pakan mengandung tempe 10% memiliki kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD paling tinggi dibandingkan kelompok lainnya. Hal ini dapat dilihat pada jumlah sel yang bereaksi positif kuat (+++) paling tinggi sangat nyata ($p < 0,01$) dan jumlah sel yang bereaksi negatif secara sangat nyata ($p < 0,01$) paling rendah. Pemberian tempe 10% paling baik dalam menghasilkan profil Cu,Zn-SOD pada jaringan hati.

SIMPULAN

Pemberian pakan tepung tempe dan tepung kedelai rebus meningkatkan kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD pada jaringan hati tikus dibandingkan dengan kasein. Pemberian pakan tepung tempe 10% dan tepung kedelai rebus 10% lebih baik dalam meningkatkan kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD pada jaringan hati tikus dibandingkan dengan tepung tempe 20%, tepung kedelai rebus 20%, dan kasein. Tepung tempe 10% lebih baik dalam menghasilkan kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD pada jaringan hati tikus dibandingkan tepung kedelai rebus 10% begitu juga dengan pemberian tepung tempe 20% lebih baik dalam menghasilkan kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD pada jaringan hati tikus dibandingkan tepung kedelai rebus 20%. Kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD pada jaringan hati tikus paling tinggi pada kelompok J yaitu pemberian pakan tepung tempe 10%.

DAFTAR PUSTAKA

- [AOAC] Association of Official Analytical Chemist. 2005. *Official Method of Analysis of The Association of Official Analysis Chemist*. Washington DC (USA): AOAC Inc.
- Ardhie AM. 2011. Radikal bebas dan peran antioksidan dalam mencegah penuaan. *Medicinus*. 24 (1): 4-9.
- Astawan M. 2008. *Sehat dengan Tempe*. Jakarta (ID): Penebar Swadaya.
- Astawan M. 2013. Soy Story. *Foodreview Indonesia*. 8(10): 47-51.
- Astawan M, Wresdiyati T, Saragih AM. 2015a. Evaluasi mutu protein tepung tempe dan tepung kedelai rebus pada tikus percobaan. *Jurnal Mutu Pangan*. 2(1): 11-17.
- Astawan M, Wresdiyati T, Sirait J. 2015b. Pengaruh konsumsi tempe kedelai grobogan terhadap profil serum, hematologi, dan antioksidan tikus. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 26(2): 155-162.
- Astawan M, Wresdiyati T, Widowati S, Bintari SH, dan Ichsani N. 2013. Karakteristik fisikokimia dan sifat fungsional tempe yang dihasilkan dari berbagai varietas kedelai. *Pangan*. 22(3): 241-252.
- Astuti S. 2008. Isoflavon Kedelai dan Potensinya sebagai Penangkap Radikal Bebas. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*. 13(2): 126-136.
- [BPTPI] Bank Pengetahuan Tanaman Pangan Indonesia. 2010. *Kedelai Varietas Lokal Grobogan*. [internet] [diunduh 25 April 2016]. Tersedia pada: <http://pustaka.litbang.pertanian.go.id/>
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 2012. *Tempe: Persembahan Indonesia untuk Dunia*. Jakarta (ID): BSN.
- Carroll IM, Andrus JM, Barcena JMB, Klaenhammer TR, Hassan HM, Threadgill DS. 2007. Anti-inflammatory of *Lactobacillus gassery*, expressing manganese superoxide dismutase using the interleukin 10-deficient mouse model of colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*. 15: 300-307.
- Dewoto HR. 2007. Pengembangan obat tradisional Indonesia menjadi fitofarmaka. *Majalah Kedokteran Indonesia*. 57(7): 205-211.
- [DINPERTAN] Dinas Pertanian Tanaman Pangan dan Hortikultura. 2014. *Kedelai Varietas Grobogan*. [internet] [diunduh 11 Mei 2016]. Tersedia pada: <http://dinpertan.grobogan.go.id/komoditas-167-kedelai-varietas-grobogan.html>.
- Dizdaroglu M, Jaruga P. 2012. Mechanism of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Research*. 46(4): 382-419.
- [EFSA] European Food Safety Authority. 2011. EFSA guidance on conducting repeated-dose 90-day oral toxicity study in rodents on whole food/feed. *EFSA Journal*. (9)12: 2438.
- Ferreira M, Oliveira MCN, Mandarino GMJ, Silva JB, Ida AI, Panizzi MCC. 2011. Changes in the isoflavone profile and in the chemical composition of tempeh during processing and refrigeration. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 46: 1555-1561.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine Fifth Edition*. Oxford (UK): Oxford University Press

- Halliwell B. 2011. Free radicals and antioxidant. *Trends in Pharmacological Sciences*. 32(3): 125-130.
- Hollman PCH, Cassidy A, Comte B, Heinonen M, Richelle M, Richling E, Serafini M, Scalbert A, Sies H, and Vidry S. 2011. The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *The Journal of Nutrition*. 141: 989-1009.
- Jones DP. 2008. Radical-free biology of oxidative stress. *A J P-Cell Physiol*. 295: 849-868.
- Kumar S, Kumar D. 2009. Antioxidant and free radical scavenging activities of edible weeds. *African Journal Food Agricultural Nutrition and Development*. 9(5):1174-1190.
- Martins PNA dan Neuhaus P. 2007. Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. *Journal compilation*. 27(3): 384-392
- Matos LL, Trufelli DC, Matos MGC, Pinhal MAS. 2010. Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomarker Insight*. 5: 9-20.
- Mursyid, Astawan M, Muchtadi D, Wresdiyati T, Widowati S, Bintari SH, Suwarno M. 2014. Evaluasi nilai gizi protein tepung tempe yang terbuat dari varietas kedelai impor dan lokal. *Pangan*. 23(1): 33-41.
- Opoku AR, Ndlovu IM, Terblanche SE, Hutchings AH. 2007. In vivo hepatoprotective effects of *Rhoicissus tridentata* subsp. *cuneifolia*, a traditional Zulumedicinal plant, against CCl₄-induced acute liver injury in rats. *S African Journal Botanica*. 73(3): 372-377.
- Sanmugapriya E, Venkataraman S. 2006. Studies on hepatoprotective and antioxidant actions of *Strychnos potatorium* Linn. seeds on CCl₄ induced acute hepatic injury in experimental rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 105(1-2): 154-160.
- Soviana E, Rachmawati B, Suci WN. 2014. Pengaruh suplementasi β -carotene terhadap kadar glukosa darah dan kadar malondialdehida pada tikus *sprague dawley* yang diinduksi *Streptozotocin*. *Jurnal Gizi Indonesia*. 2(2): 41-46.
- Stockham SL, Scott MA. 2008. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology Second Edition*. Oxford (UK): Blackwell Publishing.
- Utari DM, Rimbawan, Riyadi H, Muhilal, Purwastyastuti. 2010. Pengaruh pengolahan kedelai menjadi tempe dan pemasakan tempe terhadap kadar isoflavon. *Jurnal Penelitian Gizi Makanan*. 33: 148-153.
- Van Raamsdonk JM, Hekimi S. 2012. Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(15): 5785-5790.
- Watanabe N, Fujimoto K, Aoki H. 2007. Antioxidant activities of the water soluble fraction in tempeh-like fermented soybean (GABA-tempeh). *International Journal Food Science Nutrition*. 58: 577-587.
- Wresdiyati T, Astawan M, Hastanti LY. 2006. Profil imunohistokimia superoksida dismutase (sod) pada jaringan hati tikus dengan kondisi hiperkolesterolemia. *Hayati Journal of Biosciences*. 13(3): 85-89.
- Wresdiyati T, Hartanta AB, Astawan M. 2008. The effect of seaweed *Eucheuma cottonii* on superoxide dismutase (SOD) liver of hypercholesterolemic rats. *Hayati Journal of Biosciences*. 15(3): 105-110.

Ziniu Yu, Xiaocui He, Dingkun Fe, Yang Zhang. 2011. Two superoxide dismutase (SOD) with different subcellular localizations involved in innate immunity in *Crassostrea hongkongensis*. *Fish and Shellfish Immunology*. 31: 533-539.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil analisis statistik profil kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD pada jaringan hati tikus berbagai perlakuan

ANOVA

Positif_kuat					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	63399.333	4	15849.833	281.120	.000
Within Groups	3946.667	70	56.381		
Total	67346.000	74			

Post Hoc Tests Homogeneous Subsets

Positif_kuat

Duncan						
kelompok_perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
I	15	27. 4000				
M	15		35. 2000			
K	15			40. 8000		
L	15				87. 6667	
J	15					97. 9333
Sig.		1.0 00	1.0 00	1.0 00	1.0 00	1.0 00

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

ANOVA

Positif_sedang

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11361.813	4	2840.453	18.586	.000
Within Groups	10698.133	70	152.830		
Total	22059.947	74			

Post Hoc Tests
Homogeneous Subsets

Positif_sedang

Duncan

kelompok_perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
I	15	81.4000		
M	15		96.4667	
L	15		100.5333	
J	15			111.6667
K	15			116.4667
Sig.		1.000	.371	.291

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

ANOVA

Positif_lemah

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4478.453	4	1119.613	22.890	.000
Within Groups	3423.867	70	48.912		
Total	7902.320	74			

Post Hoc Tests
Homogeneous Subsets

Positif_lemah

Duncan

kelompok_perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
J	15	27.4000		
L	15	28.7333		
I	15		35.0000	
K	15			44.6000
M	15			45.8667
Sig.		.603	1.000	.621

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

ANOVA

Negatif

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6370.133	4	1592.533	71.283	.000
Within Groups	1563.867	70	22.341		
Total	7934.000	74			

Post Hoc Tests
Homogeneous Subsets

Negatif

Duncan

Kelompok_perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
J	15	3.6667			
L	15		12.8667		
K	15			19.2667	
M	15			21.9333	
I	15				31.2667
Sig.		1.000	1.000	.127	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Sukabumi, 4 Januari 1995 dari Bapak Abdul Rosyid dan Ibu Ika Martikawati. Penulis adalah anak kedua dari dua bersaudara. Tahun 2012 penulis lulus dari SMA Negeri 1 Sukabumi, Jawa Barat dan pada tahun yang sama penulis lulus seleksi masuk IPB melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN) Undangan dengan jurusan Kedokteran Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan IPB.

Selama kuliah di FKH IPB penulis pernah magang di Klinik GustavVet di Jakarta Barat. Penulis pernah menjadi bendahara di Himpunan Minat dan Profesi Ornithologi dan Unggas FKH IPB (2014/2015). Penulis menjadi Asisten Praktikum Histologi Veteriner I pada tahun 2014. Bulan Agustus 2015 penulis melaksanakan kegiatan Pengabdian Masyarakat di Kab. Lebak, Banten.

Penulis melakukan penelitian sebagai syarat untuk mendapatkan gelar sebagai Sarjana Kedokteran Hewan. Judul penelitian adalah Pengaruh Pemberian Tepung Tempe dan Kedelai Rebus Grobogan terhadap Profil Imunohistokimia Antioksidan SOD pada Jaringan Hati Tikus Percobaan. Penelitian ini didanai Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (DIKTI) Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi melalui Penelitian Strategis Aplikatif (PSA) tahun 2016 atas nama Prof Dr Ir Made Astawan, MS.