

**LAPORAN TAHUNAN  
PENELITIAN HIBAH BERSAING**



**NORMOMETABOLIK *FOOD COMBINING* TEMPE M-2 DENGAN  
WORTEL SEBAGAI ANTIATEROGENIK MELALUI  
PENINGKATAN pH DAN KAPASITAS ANTIOKSIDAN TOTAL  
SERTA PENURUNAN INTERLEUKIN-6 PADA  
ATEROSKLEROSIS DISLIPIDEMIA**

**Tahun ke I dari rencana 2 tahun**

**Ketua : Dr. I Gusti Ayu Ari Agung, S.Ag., M.Kes. (NIDN : 0813105901)**

**Anggota : Ir. Anak Agung Komang Suardana, M.Si. (NIDN : 0020066306)  
I Putu Sudiartawan, S.Si., M.Si. (NIDN : 0820107801)**

**UNIVERSITAS HINDU INDONESIA  
DENPASAR**

**OKTOBER 2013**

## HALAMAN PENGESAHAN

**Judul Penelitian** : Normometabolik *Food Combining* Tempe M-2 dengan Wortel sebagai Antiaterogenik melalui Peningkatan pH dan Kapasitas Antioksidan Total serta Penurunan Interleukin-6 pada Aterosklerosis Dislipidemia.

**Kode>Nama Rumpun Ilmu** : 340/Kesehatan

**Ketua Peneliti :**

a. Nama Lengkap : Dr.Ir. I Gusti Ayu Ari Agung, S.Ag, M.Kes.  
b. NIDN : 0013105912  
c. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala  
d. Program Studi : Biologi  
e. Nomor HP : 7909238  
f. Alamat e-mail : [perpus\\_unhi@yahoo.com](mailto:perpus_unhi@yahoo.com)

**Anggota Peneliti (1)**

Nama lengkap : Ir.Anak Agung Komang Suardana, M.Si  
NIDN : 0020066306  
Perguruan Tinggi : Universitas Hindu Indonesia Denpasar

**Anggota Peneliti (2)**

Nama Lengkap : I Putu Sudiartawan, S.Si.,M.Si.  
NIDN : 0820107801  
Perguruan Tinggi : Universitas Hindu Indonesia Denpasar

**Lama Penelitian Keseluruhan** : 2 tahun  
**Penelitian Tahun ke** : I  
**Biaya Penelitian Keseluruhan** : Rp. 94.000.000,-  
**Biaya Tahun Berjalan** : - diusulkan ke DIKTI Rp. 45.000.000,-



Mengetahui,  
Dekan FMIPA,

Putu Sudiartawan, S.Si, M.Si  
NIK.010016

Denpasar, 29 Oktober 2013  
Ketua,

Dr.Ir. I Gusti Ayu Ari Agung, S.Ag., M.Kes.  
NIP. 195910131987032004

Ketua Lembaga Penelitian

Dr. Puji Dewi Yuliana, M.Si  
NIP. 196607171992022001

## RINGKASAN

Penyakit Jantung Koroner (PJK) merupakan penyebab kematian pertama di Indonesia, dan cenderung meningkat terus. Aterosklerosis dislipidemia merupakan faktor resiko utama untuk PJK. Gangguan metabolisme lemak sebagai pencetus aterosklerosis yang dicerminkan oleh menurunnya kolesterol HDL dan peningkatan kolesterol LDL (dislipidemia). Perubahan kimiawi lemak yang dipicu oleh radikal bebas (stres oksidatif), akan menghasilkan LDL teroksidasi. LDL teroksidasi dapat menimbulkan proses inflamasi (IL-6), yang kemudian dapat berlanjut dengan timbulnya aterosklerosis dislipidemia.

Tubuh mempunyai mekanisme untuk menetralkan kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas, tetapi antioksidan seluler tidak dapat bekerja secara individual tanpa dukungan asupan berbagai antioksidan sekunder dari bahan pangan. *Food combining* tempe M-2 dengan wortel sebagai makanan yang serasi, sebagai sumber antioksidan yang kuat, aktivitasnya penting dalam menormometabolik pH, Kapasitas Antioksidan Total dan Interleukin-6, yang memberikan perlindungan dari aterosklerosis dislipidemia.

Penelitian ini berfokus pada tiga masalah yakni : (1) apakah normometabolik *food combining* tempe M-2 dengan wortel dapat meningkatkan pH darah pada aterosklerosis dislipidemia ?, (2) apakah normometabolik *food combining* tempe M-2 dengan wortel dapat meningkatkan Kapasitas Antioksidan Total pada aterosklerosis dislipidemia ?, (2) apakah normometabolik *food combining* tempe M-2 dengan wortel dapat menurunkan Interleukin-6 pada aterosklerosis dislipidemia ?.

Berdasarkan permasalahan penelitian, tujuan yang hendak dicapai adalah mengkaji normometabolik *food combining* tempe M-2 dengan wortel dalam meningkatkan pH dan Kapasitas Antioksidan Total, serta menurunkan Interleukin-6 pada aterosklerosis dislipidemia. Dari temuan tersebut, akan dibuat produk *food combining* tempe M-2 dengan wortel untuk terapi preventif yang tepat, murah, aman, praktis pada usia dini hingga usia lanjut, utamanya pada penanggulangan aterosklerosis dislipidemia.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen sungguhan (*True Experimental*) dengan rancangan *The Randomized Posttest Only Control Group Design*, dan Rancangan Acak Lengkap pola Faktorial. Pada penelitian ini juga melaksanakan penelitian deskriptif dengan menguji pH urine. Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran dan Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana. Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini selanjutnya dianalisis dengan SPSS 19 for

Windows, dan Excel 2007, sebagai berikut : analisis deskriptif; uji normalitas dan homogenitas; uji komparabilitas; dan penarikan kesimpulan.

Rata-rata pH urine tertinggi pada *food combining* tempe *M-2* dengan wortel adalah sebesar 8. Rata-rata kadar Kapasitas Antioksidan Total tertinggi terdapat pada perlakuan *food combining* tempe *M-2* dengan wortel, sebesar  $1,454 \pm 0,01$  nM/mL. Hasil ini menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ( $p < 0,01$ ). Interaksi perlakuan menunjukkan pengaruh sangat bermakna ( $p < 0,01$ ). Tempe *M-2* memberikan pengaruh meningkatkan kadar TAC lebih tinggi 59,56 % dibandingkan pengaruh dari perlakuan wortel. Rata-rata kadar IL-6 terendah pada *food combining* tempe *M-2* dengan wortel, sebesar  $35,328 \pm 1,000$  pg/dl. Hasil ini menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ( $p < 0,01$ ). Interaksi perlakuan menunjukkan pengaruh sangat bermakna ( $p < 0,01$ ). Tempe *M-2* memberikan pengaruh menurunkan kadar IL-6 lebih besar 28,05% daripada pengaruh perlakuan wortel.

Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa normometabolik *food combining* tempe *M-2* dengan wortel meningkatkan pH urine dan Kapasitas Antioksidan Total serum, serta menurunkan IL-6 plasma pada tikus Wistar aterosklerosis dislipidemia. *Food combining* tempe *M-2* dengan wortel memberikan pengaruh interaksi terhadap Kapasitas Antioksidan Total serum dan IL-6 plasma pada tikus Wistar aterosklerosis dislipidemia.

## **PRAKATA**

Puji syukur saya panjatkan kehadapan Hyang Widhi Wasa (Tuhan Yang Maha Esa) atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga penelitian Hibah Bersaing ini dapat saya selesaikan.

Saya menyadari bahwa hasil penelitian ini tidak akan terwujud tanpa bantuan dari berbagai pihak yang telah banyak membantu mulai dari persiapan penelitian hingga penulisan hasil penelitian ini. Untuk itu perkenankanlah saya menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Pemerintah Republik Indonesia, dalam hal ini Menteri Pendidikan Nasional, serta Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi yang telah memberikan kesempatan dan bantuan keuangan yang diperlukan untuk pelaksanaan penelitian Hibah Bersaing ini.
2. Koordinator Kopertis Wilayah VIII yang telah memberikan kesempatan dan bantuan yang diperlukan untuk pelaksanaan penelitian Hibah Bersaing ini.
3. Rektor Universitas Hindu Indonesia yang telah memberikan kesempatan dan bantuan yang diperlukan untuk pelaksanaan penelitian Hibah Bersaing ini.
4. Rektor Universitas Udayana yang telah memberikan kesempatan dan bantuan yang diperlukan untuk pelaksanaan penelitian Hibah Bersaing ini.
5. Kepala Laboratorium Biokimia Universitas Hindu Indonesia yang telah memberikan kesempatan dan bantuan yang diperlukan untuk pelaksanaan penelitian Hibah Bersaing ini.
6. Kepala Laboratorium Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana yang telah memberikan kesempatan dan bantuan yang diperlukan untuk pelaksanaan penelitian Hibah Bersaing ini.
7. Kepala Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana yang telah memberikan kesempatan dan bantuan yang diperlukan untuk pelaksanaan penelitian Hibah Bersaing ini.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini jauh dari sempurna, oleh karenanya perbaikan-perbaikan dari pembaca sangat diharapkan. Akhirnya semoga tulisan yang sederhana ini ada manfaatnya di dalam menunjang perkembangan di bidang Kesehatan Masyarakat, maupun bagi perkembangan penelitian di masa mendatang.

Denpasar, September 2013

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>RINGKASAN</b> .....	iii
<b>PRAKATA</b> .....	v
<b>DAFTAR ISI</b> .....	vi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	viii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	ix
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	x
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	3
2.1 Lipid Plasma.....	3
2.2 LDL Teroksidasi dan Aterosklerosis.....	7
2.3 Radikal Bebas, SOR dan Stres Oksidatif.....	11
2.4 Interleukin-6.....	15
2.5 Antioksidan.....	19
2.6 Tempe <i>M-2</i> sebagai Antiinflamasi.....	38
2.7 Wortel sebagai Antiinflamasi.....	40
2.8 Normometabolik <i>Food Combining</i> Tempe <i>M-2</i> dengan Wortel.....	41
2.9 pH Cairan Tubuh.....	49
2.10Keunggulan Tempe <i>M-2</i> .....	52
<b>BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN</b> .....	56
<b>BAB 4. METODE PENELITIAN</b> .....	57
4.1 Rancangan Penelitian.....	57
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	58
4.3 Populasi dan Sampel.....	58
4.4 Variabel .....	59
4.5 Bahan dan Alat Penelitian .....	61
4.6 Prosedur Penelitian.....	61
4.7 Analisis Statistik.....	63

<b>BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>64</b>
5.1 Hasil Penelitian.....	64
5.2 Pembahasan.....	72
<b>BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>81</b>
6.1 Kesimpulan.....	81
6.2 Saran.....	81
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>82</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>94</b>

## DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Substansi Aktif dalam Tempe.....	34
2.2 Komposisi Gizi per 100 g Wortel BDD.....	37
2.3 Kadar Beta Karoten pada Buah-Buahan dan Sayur-Sayuran BDD.....	40
5.1 Analisis Keragaman Kadar TAC Tikus Diberikan Diet Aterogenik dan <i>Food Combining</i> Tempe M-2 dengan Wortel.....	71
5.2 Analisis Keragaman Kadar IL-6 Tikus Diberikan Diet Aterogenik dan <i>Food Combining</i> Tempe M-2 dengan Wortel.....	74

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Proses Aterosklerosis yang Dipicu oleh Jejas Endotel.....	11
2.2 Sumber Radikal Bebas Endogen dan Eksogen.....	13
2.3 Aktivasi IL-1 dalam Menginduksi IL-6.....	20
2.4 Mekanisme Pemberian Elektron oleh Senyawa Antioksidan dalam Menetralkan Radikal Bebas.....	21
2.5 Antioksidan dalam Sistem Pertahanan Tubuh.....	23
2.6 Biosintesa faktor II.....	32
4.1 Rancangan Penelitian.....	61
4.2 Bagan Alur Penelitian.....	66
5.1 pH Urine Tikus pada Perlakuan KN, KP, T, W, TW.....	69
5.2 Kadar TAC Serum pada Perlakuan KN, KP, T, W, TW.....	70
5.3 Kadar IL-6 Plasma pada Perlakuan KN, KP, T, W, TW.....	73

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Analisis Statistik.....	90
2. Hewan Coba dalam Kandang Individu dan Denah Penelitian.....	92
3. Tempe <i>M-2</i> dan Wortel.....	93
4. Bahan dan Peralatan Analisa.....	94
5. Format Biodata.....	97
6. Evaluasi Atas Capaian Luaran.....	113
7. Draf Publikasi Internasional.....	114
8. Rencana Tahapan Berikutnya.....	119

## BAB 1

### PENDAHULUAN

Aterosklerosis dislipidemia menempati posisi pertama sebagai resiko penyakit jantung koroner (PJK). PJK merupakan penyebab kematian pertama di Indonesia Hal ini terjadi karena terjadinya perubahan gaya hidup dan pola makan masyarakat, yang menyebabkan dislipidemia yang memicu munculnya penyakit aterosklerosis dan berlanjut pada penyakit kardiovaskular.

Pada keadaan dislipidemia peningkatan ion superoksida dapat menginduksi pengeluaran Interleukin-6 (IL-6). IL-6 dapat menyebabkan disfungsi endotel, yang merangsang pembentukan radikal bebas oksigen (Dimayuga, 2006; Kumar *et al.*, 2007). Dalam studi jantung Framingham, IL-6 tercatat sebagai pengidentifikasi subyek lanjut usia tanpa gejala tetapi memiliki resiko tinggi (Morow dan Lemos, 2009).

Stress oksidatif hanya dapat dikendalikan oleh asupan antioksidan dari makanan, yang selanjutnya akan memacu kerja antioksidan dalam tubuh. Antioksidan seluler tidak dapat bekerja secara individual tanpa dukungan asupan berbagai antioksidan dari bahan pangan, yang saling menopang dalam jaringan kerja antar-antioksidan di dalam tubuh (Winarsi, 2007).

Menurut studi, PJK dapat diturunkan hingga 43% hanya dengan menerapkan diet makanan yang tepat dengan mengonsumsi tempe yang kaya isoflavon, vitamin E, Zn, Se, Cu, alfa dan gamma tokoferol, asam linolenat (asam omega-3) merupakan antioksidan yang berperan sebagai antiaterogenik, dengan melindungi tubuh dari peroksidasi lipid (Karyadi, 2008; Sander *et al.*, 2002).

Dibandingkan dengan tempe biasa, tempe *M-2* mempunyai beberapa keunggulan dalam mutu gizi, antioksidan, sensori, maupun senyawa bioaktif yang lainnya, yang mana kadar dan nilai cernanya signifikan dapat ditingkatkan (Agung, 2002). Tempe *M-2* kaya manfaat untuk kesehatan, diantaranya berperan sebagai antiaterogenik (Vallerie, 2009).

Wortel merupakan sayuran yang kaya antioksidan beta karoten dan vitamin C (Asgar dan Musaddad, 2006). Muchtadi (2009) menyebutkan beta karoten berperan sebagai antiaterogenik, dengan menghambat pembentukan LDL teroksidasi, yang berhubungan dengan penurunan resiko PJK.

*Food combining* adalah kombinasi makanan yang serasi berdasarkan sifat pembentuk asam dan basa suatu makanan, sehingga pH tubuh yang normal dapat dicapai. *Food combining* tempe dengan wortel merupakan kombinasi makanan yang sangat serasi (Farida

dan Amalia, 2009). *Food combining* tempe *M-2* dengan wortel yang dihasilkan dalam penelitian ini merupakan bahan makanan yang murah, dan mudah didapat, tetapi kaya manfaat untuk kesehatan dan merupakan sumber antioksidan yang kuat, enzim, hormon, zat anti kanker, antivirus, zat antibakteri, antijamur, antimutagenik, antihipertensi, antiinflamasi, antiaterogenik dan antiktoksin (Baziad, 2003; Eberhardt, 2001; Freeman dan Junge, 2008; Sies *et al.*, 2005; Sunita, 2009; Vallerie, 2009; Wirakusumah, 1997).

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. Lipid Plasma**

Lipid berasal dari bahasa Yunani = Greek; *lipos* yang berarti “lemak”. Secara umum lipid merupakan senyawa organik yang tidak larut dalam air, tetapi dapat diekstraksi dengan pelarut non polar seperti eter, kloroform, dan benzene. Dengan melakukan ekstraksi lipid melalui pelarut-pelarut lemak dapat dipisahkan beberapa jenis lipid dalam plasma, yaitu : trigliserida, fosfolipid, kolesterol dan asam lemak bebas (Hamid, 2005; Murray *et al.*, 2009; Sunita, 2009).

##### **2.1.1. Trigliserida (Triasilgliserol)**

Sebagian besar lemak dan minyak dalam alam terdiri atas 98-99 % trigliserida. Trigliserida adalah ester gliserol, suatu alkohol trihidrat dan asam lemak, yang tepatnya disebut triasilgliserol. Pada umumnya trigliserida mengandung beberapa asam lemak yang berbeda misalnya asam palmitat, asam linoleat dan asam oleat (Hamid, 2005; Murray *et al.*, 2009; Sunita, 2009). Trigliserida yang berasal dari makanan setelah diabsorpsi di usus ditransport dalam bentuk kilomikron, melalui aliran limpha masuk ke dalam *duktus thorasikus* kemudian masuk dalam sistem sirkulasi darah. Dalam keadaan normal trigliserida makanan yang diserap sekitar 90%, yaitu yang merupakan trigliserida eksogen. Makanan berlemak mempengaruhi kadar trigliserida dalam plasma. Kadar trigliserida dalam darah normal bila < 165 mg/dl (Murray *et al.*, 2009).

##### **2.1.2. Fosfolipid**

Fosfolipid plasma yang penting adalah fosfatidil kolin (lesitin) dan sfingomielin. Sintesis fosfolipid pada umumnya terjadi di dalam jaringan, tetapi fosfolipid plasma berasal dari hepar. Sedangkan lesitin kilomikron berasal dari usus halus. Fosfolipid dalam usus halus biasa berasal dari diit maupun dari empedu, mengalami proses hidrolisis dengan perantaraan enzim lipase dari pankreas. Fosfolipid merupakan komponen membran sel (Murray *et al.*, 2009).

##### **2.1.3. Kolesterol**

Kolesterol ditemukan di dalam jaringan dan di dalam lipoprotein plasma, baik sebagai kolesterol bebas maupun sebagai ester yaitu berikatan dengan asam lemak rantai panjang. Kolesterol disintesis dari asetil koenzim A dan dieliminasi dari tubuh melalui empedu sebagai kolesterol atau garam empedu. Kolesterol ditemukan di dalam semua jaringan dalam kadar yang berbeda-beda. Peranan yang penting dari kolesterol dalam tubuh adalah :

- a. sebagai komponen dari struktur membran sel
- b. prekursor dari semua steroid tubuh yaitu kortikosteroid, asam empedu, hormon adrenal dan hormon kelamin (Murray *et al.*, 2009).

Kolesterol diserap dari usus dan menjadi satu dengan kilomikron yang dibentuk dalam mukosa. Setelah kilomikron melepaskan trigliserida dalam jaringan adiposa, sisa kilomikron akan membawa kolesterol ke hati. Hati juga membentuk kolesterol, sebagian kolesterol hati diekskresikan dalam empedu, baik dalam bentuk bebas maupun sebagai asam empedu. Sisa kolesterol akan menjadi satu dengan VLDL. Kolesterol mengadakan umpan balik untuk menghambat pembentukannya sendiri, yaitu dengan menghambat enzim yang mengkonversi, yakni hidroksi - metilglutaril-KoA menjadi asam mevalonat. Jadi bila asupan kolesterol dalam makanan tinggi, sintesis kolesterol dalam makanan tinggi, sintesis kolesterol hati menurun dan sebaliknya. Akan tetapi, pengaruh umpan balik ini tidaklah tetap, dan diit rendah kolesterol akan sedikit menurunkan kolesterol darah (Murry *et al.*, 2009). Kebanyakan sel dalam tubuh dapat mensintesis kolesterol, walaupun sebagian besar kolesterol disintesis dalam hati. VLDL yang mengandung kolesterol yang dibentuk dalam hati dimetabolisme menjadi LDL. LDL kemudian masuk ke dalam sel jaringan ekstrahepatik dengan cara endositosis dan menyediakan kolesterol bagi sel-sel ini, yang penting agar sel berfungsi normal. Sebagian LDL juga masuk *scavenger cell*.

Dokter-dokter di Amerika Serikat menganjurkan agar kolesterol orang dewasa tidak lebih dari 190 mg. Kadar kolesterol di atas 240 mg sudah tergolong tinggi. Jika kadar kolesterol telah melebihi 220 mg dan mencapai 270 mg per 100 ml darah kemungkinan mendapat serangan jantung menjadi dua kali lipat. Bila kadarnya mencapai 300 mg per 100 ml darah resiko serangan jantung menjadi lima kali lipat (Astawan, 2004).

#### **2.1.4. Dislipidemia**

Dislipidemia adalah kelainan metabolisme lipid yang ditandai dengan peningkatan maupun penurunan dalam plasma. Kelainan fraksi lipid yang utama adalah kenaikan kadar kolesterol total, kolesterol LDL, trigliserida, serta penurunan kadar kolesterol HDL. Komplikasi kronis yang terbanyak adalah dislipidemia (67%) (Hendromartono, 2009).

Dari penelitian-penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa gangguan metabolisme lemak atau lebih tepatnya gangguan metabolisme lipoprotein mempunyai hubungan dengan terjadinya aterosklerosis dan secara tidak langsung berkaitan dengan terjadinya penyakit jantung koroner (PJK) (Murray *et al.*, 2009). Penelitian klinik maupun epidemiologik menunjukkan bahwa ada korelasi positif antara kolesterol LDL dengan PJK. Sebaliknya antara kolesterol HDL dengan PJK didapatkan korelasi negatif. Dari kedua data

tersebut maka dapat disimpulkan bahwa dengan menurunkan kadar kolesterol LDL dan meningkatkan kadar kolesterol HDL, kemungkinan mendapat PJK dapat dikurangi. Dengan demikian maka tidak hanya peningkatan kolesterol LDL saja yang merupakan faktor resiko untuk terjadinya PJK, tetapi juga karena penurunan kolesterol HDL. Dalam hal ini maka istilah dislipidemia lebih tepat daripada hiperlipidemia (Suyono, 1991).

Dislipidemia mempunyai peranan penting pada terjadinya kerusakan sel-sel endotel. Kerusakan terhadap sel-sel endotel baik kecil ataupun besar dapat mengubah sifat permeabilitas dan kemampuan sel endotel untuk melekat satu sama lain dengan jaringan ikat di bawahnya. Dimana pada keadaan normal sel endotel yang membatasi tunika intima membentuk suatu barrier yang permeabel untuk mengatur masuknya substansi plasma ke dalam dinding arteri. Dinding arteri yang akan menginduksi terjadinya perubahan permeabilitas sel-sel endotel akan menyebabkan konstituen plasma, misalnya lipoprotein yang menjadi mudah masuk ke dalam dinding arteri. Kerusakan sel endotel ini akan mengubah sifat trombosit lumen arteri sehingga memungkinkan trombosit melekat pada dinding arteri yang mengalami kerusakan dan mengalami inflamasi yang mengakibatkan jaringan ikat di bawahnya kontak dengan trombosit dan elemen-elemen lainnya di dalam sirkulasi darah. Kerusakan sel endotel ini yang menyebabkan pembentukan radikal bebas oksigen, yang dipicu oleh sitokin, merupakan dasar patogenesis aterosklerosis. Fungsi endotel adalah mengendalikan peradangan dan imunitas (Kumar *et al.*, 2007; Murray *et al.*, 2009).

Mekanisme bagaimana dislipidemia berperan pada aterogenesis adalah sebagai berikut :

- a. Dislipidemia kronis, terutama pada hiperkolesterol, dapat secara langsung mengganggu fungsi sel endotel melalui peningkatan pembentukan radikal bebas oksigen yang mendeaktivasi nitrat oksida, faktor utama pelepas endotel.
- b. Pada dislipidemia kronis terjadi penimbunan lipoprotein di dalam intima, di tempat permeabilitas endotelnya meningkat.
- c. Perubahan kimiawi lemak yang dipicu oleh radikal bebas yang dihasilkan dalam makropag atau sel endotel di dinding arteri, akan menghasilkan LDL teroksidasi (Kumar *et al.*, 2007).

## 2.2 LDL Teroksidasi dan Aterosklerosis.

Sebagian besar asam lemak yang terikat pada LDL adalah asam lemak tak jenuh jamak (PUFA/*poly unsaturated fatty acid*). PUFA sangat rentan terhadap oksidasi karena ikatan rangkapnya (Marinetti, 1990; Devaraj dan Jialal, 1997).

LDL teroksidasi dapat : (1). Ditelan oleh makropag melalui *scavenger receptor*, sehingga terbentuk sel busa, (2). Meningkatkan akumulasi monosit di lesi, (3). Merangsang pengeluaran faktor pertumbuhan dan sitokin, (4). Bersifat sitotoksik bagi sel endotel dan sel otot polos dan (5). Dapat menyebabkan disfungsi sel endotel (Kumar *et al.*, 2007).

Studi klinis dan epidemiologi menunjukkan bahwa peningkatan kadar LDL akan memicu terjadinya aterosklerosis lebih dini. Tapi fakta berdasarkan hipotesis modifikasi oksidatif, mengatakan bahwa LDL dalam bentuk aslinya sebenarnya tidak bersifat aterogenik. LDL menjadi berbahaya, bisa dijelaskan secara biologis adalah perubahan bentuk LDL karena proses oksidasi. LDL bisa teroksidasi dan termodifikasi karena perubahan sel-sel utama pada dinding arteri. Di tahap sangat dini, oksidasi ringan LDL akan menghasilkan bentuk yang disebut *minimally modified LDL* (MM-LDL) pada sub-endotelial. MM-LDL ini sangat berbeda dari segi komposisi dibandingkan LDL yang sudah teroksidasi dengan kuat. Kolesterol masih menjadi sterol predominan, apoB dari MM-LDL masih berikatan dengan reseptor LDL (LDL-R), dan inkubasi makrofag dengan MM-LDL tidak menghasilkan bentuk sel bergelembung (*foam-cell*). Meski demikian, proporsi rantai lemak tak jenuh dari ester kolesterol dan fosfolipid di MM-LDL secara signifikan telah teroksidasi menjadi hidroperoksida, Isoprostan, dan aldehid rantai pendek yang memiliki efek biologi cukup poten (Murray *et al.*, 2009).

Oksidasi LDL yang ekstensif (*ox-LDL*) tidak dikenali oleh reseptor LDL tapi sangat disukai oleh reseptor di makrofag dan memicu akumulasi ester kolesterol yang cukup besar dan terbentuk sel bergelembung (*foam-cell*). Oksidasi LDL memiliki beberapa efek biologi yang merugikan di antaranya pro-inflamasi, menyebabkan penghambatan sintesa oksida nitrit di endotel (eNOS), memicu vasokonstriksi dan adesi, menstimulasi sitokin seperti Interleukin-1 (IL-1), dan peningkatan agregasi platelet. Oksidasi LDL akan melahirkan produk seperti sitotoksik dan bisa memicu apoptosis. Oksidasi LDL juga bisa membalikkan efek koagulasi dengan menstimulasi jaringan faktor dan sintesis *plasminogen activator inhibitor-1*. Properti aterogenik lain dari oksidasi LDL adalah imunogenisitas dan kemampuannya memicu retensi makrofag pada dinding arteri dengan menghambat motilitas makrofag. Sebagai tambahan, LDL teroksidasi akan menstimulasi proliferasi SMC vascular. Sehingga, penebalan intima (lapisan pembuluh darah yang paling dalam) akan mengurangi

lumen pembuluh darah dan akan berpotensi menyebabkan hipertensi dan aterosklerosis (Miller *et al.*, 2007).

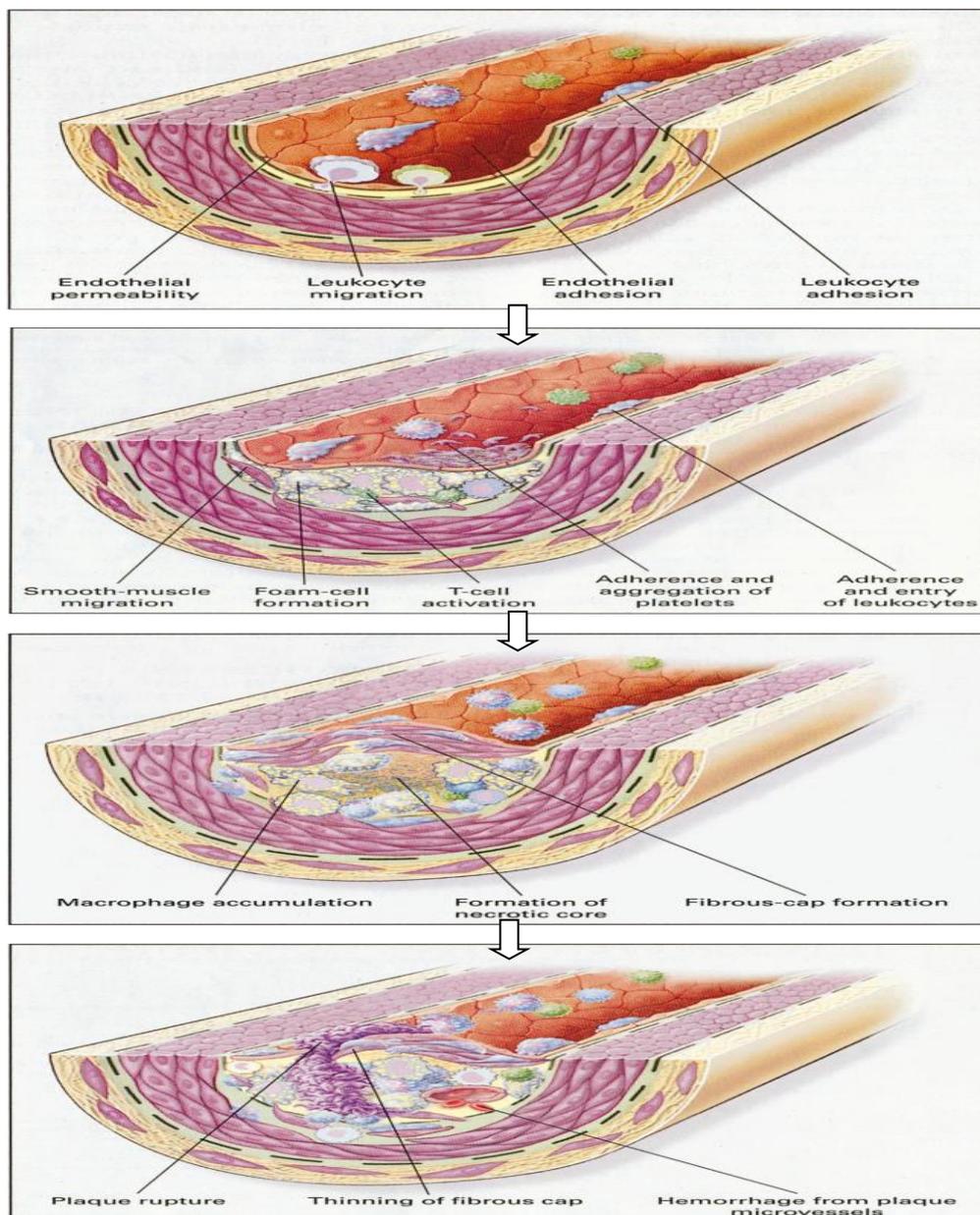
Aterosklerosis merupakan penyakit yang berjalan progresif lambat, terjadi pada muskular arteri besar hingga sedang dan arteri elastik. Tempat-tempat utama yang mengalami aterosklerosis adalah aorta abdominis, artero koronaria, arteri poplitea, aorta torakalis, desendens, arteri karotis intern, dan sirkulasi Willis (Szmitko *et al.*, 2003).

Dislipidemia kronik berperan penting pada terjadinya kerusakan sel-sel endotel dan menyebabkan konstituen plasma, misalnya lipoprotein menjadi mudah masuk ke dalam dinding arteri. Kerusakan sel endotel ini juga dapat mengubah sifat trombosit lumen arteri sehingga memungkinkan trombosit melekat pada daerah yang mengalami kerusakan dan mengalami inflamasi, selanjutnya jaringan ikat di bawahnya kontak dengan trombosit dan elemen-elemen lainnya di dalam darah. Bila proses kerusakan ini berlangsung kronik terus menerus, maka proses aterosklerosis terus berlanjut dan mengakibatkan aliran darah pada daerah itu terganggu (Szmitko *et al.*, 2003). Kondisi dislipidemia saja tidak cukup memfasilitasi terjadinya aterosklerosis, stress oksidasi lebih aterosklerosis dibandingkan dengan dislipidemia saja tanpa stress oksidasi (Miyamoto *et al.*, 2006). Penelitian lebih lanjut menyatakan bahwa LDL kecil (fenotip B) berkaitan dengan profil lipoprotein yang aterogenik, karena lebih rentan terhadap oksidasi, karena mengandung asam lemak tidak jenuh jamak yang tinggi dibandingkan kandungan antioksidan, lebih lama berada di sirkulasi afinitas terhadap proteoglikan sel endotel lebih besar sehingga mempermudah masuk ke dalam lapisan subendotel dimana proses oksidasi LDL akan berlangsung (Chait, 1994).

Proses aterosklerosis sebagai respons terhadap hipotesis jejas endotel adalah sebagai berikut: (1) Jejas endotel kronis, biasanya samar, yang menyebabkan disfungsi endotel, menimbulkan peningkatan permeabilitas, perlekatan leukosit, dan kemungkinan thrombosis, (2) Merembesnya lipoprotein ke dalam dinding pembuluh, terutama LDL dengan kandungan kolesterol yang tinggi, (3) Modifikasi lipoprotein di lesi oleh oksidasi, (4) Melekatnya monosit darah (dan leukosit lain) ke endotel, diikuti oleh migrasi ke dalam intima dan transformasi menjadi makrofag dan sel busa, (5) Melekatnya trombosit, (6) Pengeluaran faktor dari trombosit, makrofag, atau sel vaskular yang menyebabkan migrasi sel otot polos dari media ke dalam intima, (7) Proliferasi sel otot polos di intima, dan pengeluaran matriks ekstrasel sehingga terjadi akumulasi kolagen dan proteoglikan, (8) Peningkatan penimbunan lemak di dalam sel (makrofag dan sel otot polos) dan luar sel (Kumar *et al.*, 2007) (Gambar 2.1). Hal ini dipertegas oleh beberapa penelitian pada dua dekade terakhir menunjukkan adanya inflamasi kronis pada dinding aorta karena

penumpukan lemak (Anwar, 2005). Beberapa penelitian juga membuktikan bahwa konsumsi makanan atherogenik meningkatkan terbentuknya sitokin proinflamasi IL-6 (Ahmed, 2001).

Aterosklerosis pemicu penyakit jantung koroner (PJK) melalui salah satu mekanisme umum, yaitu gangguan sirkulasi darah, akibat dari proses aterosklerosis kronis selama beberapa tahun, yang mengakibatkan tunika intima menjadi tebal dan mengakibatkan aliran darah pada daerah itu terganggu (Szmitko *et al.*, 2003). Pengaturan pola makan merupakan salah satu langkah penting dalam mengatasinya.



Gambar 2.1.

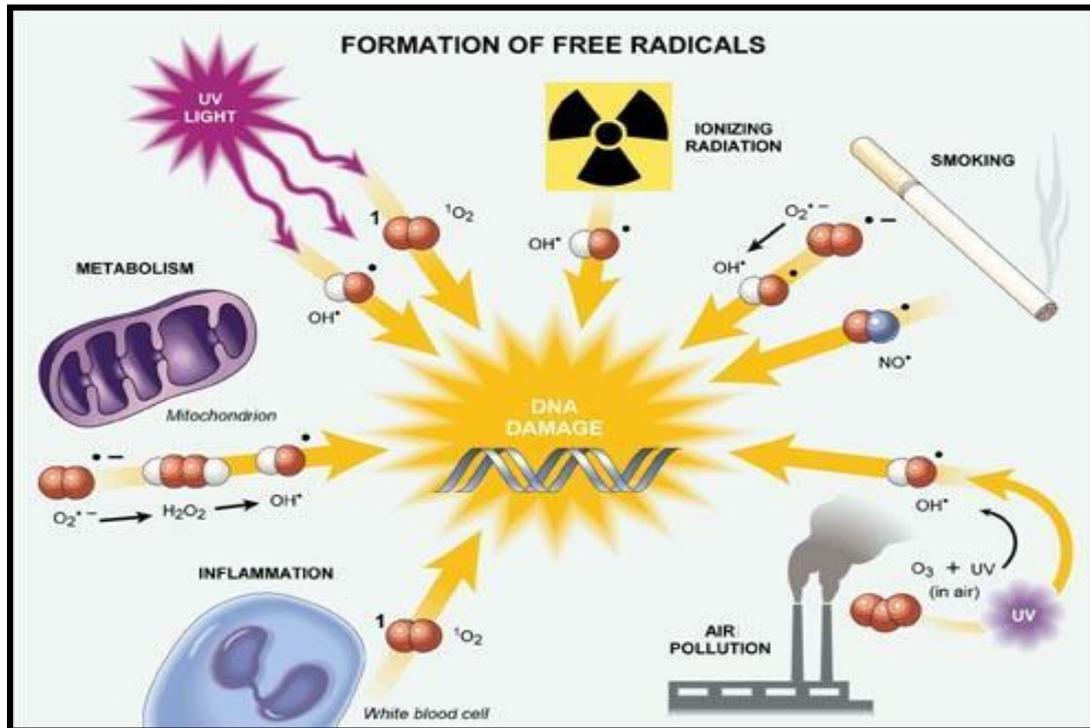
Proses Aterosklerosis yang Dipicu oleh Jejas Endotel (Norma, 2005)

## **2.3 Radikal Bebas, Spesies Oksigen Reaktif (SOR) dan Stres Oksidatif**

### **2.3.1 Radikal Bebas**

Radikal bebas dapat didefinisikan sebagai suatu molekul, atom atau beberapa atom yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbit luarnya sehingga bersifat sangat reaktif. Radikal bebas hadir dalam waktu yang sangat singkat, menyerang bahan-bahan lain, mengubahnya menjadi radikal bebas dan membentuk rantai reaksi yang sangat merusak (Youngson, 2005). Secara garis besar ada dua tipe radikal bebas yaitu radikal oksigen dan radikal nitrogen. Radikal oksigen dikatalisis oleh derivat enzim NAD(P)H oxidase; dan radikal nitrogen dikatalisis oleh enzim (NOS) *isoform* (Droge, 2002).

Radikal bebas dalam tubuh dapat berasal dari dalam (endogen) atau dari luar tubuh (eksogen). Secara endogen, radikal bebas terbentuk sebagai respon normal dari rantai peristiwa biokimia dalam tubuh, seperti reaksi redoks dengan reaksi fisik ikatan homolitik atau pemindahan elektron. Radikal nitrogen dibentuk dari oksigenasi rantai terminal atom guanido-nitrogen pada L-arginin yang dikatalisis oleh enzim NOS (Droge, 2002). Secara eksogen, radikal bebas diperoleh dari bermacam-macam sumber, antara lain polutan, makanan dan minuman, radiasi, ozon, dan pestisida. Secara endogen radikal bebas dapat timbul melalui beberapa macam mekanisme seperti auto-oksidasi, aktivitas oksidasi (misalnya siklo-oksigenase, lipoksisigenase, dehidrogenase dan peroksidase) dan sistem transpor elektron. Radikal bebas diproduksi di dalam sel oleh mitokondria, membran plasma, lisosom, peroksisom, endoplasmik retikulum dan inti sel (Kumar *et al.*, 2004), seperti terlihat pada Gambar 2.2. Radikal bebas menyebabkan kerusakan atau kematian sel, hal ini terjadi karena radikal bebas mengoksidasi dan menyerang komponen RNA, DNA, protein, lipoprotein, lipid membran sel (Milner, 2000; Winarsi, 2007).



Gambar 2.2

Sumber Radikal Bebas Endogen dan Eksogen (Kumar *et al.*, 2004)

### 2.3.2 Spesies Oksigen Reaktif (SOR)

Eberhardt (2001) dan Winarsi (2007) menyebutkan bahwa spesies oksigen reaktif (SOR) ada dua yaitu radikal dan non-radikal, dan secara garis besar dibedakan menjadi SOR, spesies nitrogen reaktif, spesies klorida reaktif (Halliwell, 2002). Radikal oksigen meliputi :  $OH^\bullet$ ,  $O_2^\bullet$ , lipid alkosil ( $LO^\bullet$ ), hidroperoksil ( $OOH^\bullet$ ) dan lipid peroksil ( $LOO^\bullet$ ). Sedangkan derivat oksigen non radikal atau sering disebut oksidan, adalah suatu atom, molekul atau senyawa yang merupakan *oxidizing agent* atau mudah diubah menjadi radikal, meliputi  $H_2O_2$ , peroksida lipid ( $LOOH$ ), singlet oksigen ( $^1O_2$ ). Spesies nitrogen reaktif juga merupakan suatu kumpulan radikal nitrit oksida ( $NO^\bullet$ ), nitrogen dioksida ( $NO_2^\bullet$ ), dan atom atau senyawa non radikal seperti  $HNO_2$ ,  $N_2O_4$  dan  $ONOO^\bullet$ . Demikian juga halnya dengan spesies klorida reaktif, merupakan kumpulan senyawa radikal dan nonradikal klorida. Dalam kaitannya dengan peroksidasi lipid membran, SORlah yang paling berperan.

Kemudian disebutkan pula oleh Eberhardt (2001) pengertian radikal bebas dan oksidan yang sering dikaburkan, karena keduanya memiliki sifat-sifat yang mirip. Aktivitas kedua jenis senyawa ini sering sama walaupun prosesnya berbeda. Oksidan adalah senyawa penerima elektron (*oxidizing agent*), demikian juga halnya dengan radikal bebas. Hanya saja radikal bebas memiliki elektron yang tidak berpasangan. Ditegaskan oleh Murray *et al.*

(2009) radikal bebas adalah molekul atau atom yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbit luarnya. Konsekuensi berupa kecenderungannya memperoleh elektron dari substansi lain menjadikan radikal bebas bersifat sangat reaktif.

Dari radikal oksigen yang paling banyak diteliti yang berkaitan dengan kerusakan sel tubuh adalah radikal superoksida, hidrogen peroksida dan radikal hidroksil (Droge, 2002). Dikatakan bahwa mitokondria merupakan sumber kehidupan atau sebagai pemicu kematian sel, oleh karena di mitokondria dapat dibentuk *adenosin triphosphat* (ATP), ataupun radikal bebas oksigen/ Spesies Oksigen Reaktif (SOR).

Tidak selamanya senyawa oksigen reaktif yang terdapat di dalam tubuh itu merugikan. Pada kondisi-kondisi tertentu keberadaannya sangat dibutuhkan, misalnya, untuk membunuh bakteri yang masuk ke dalam tubuh, melawan radang dan mengatur tonus otot polos dalam organ dan pembuluh darah. Oleh sebab itu, keberadaannya harus dikendalikan oleh sistem antioksidan dalam tubuh (Winarsi, 2007).

### **2.3.3 Stres Oksidatif**

Ketidakseimbangan antara radikal bebas dan ROS dengan antioksidan, menyebabkan timbulnya stress oksidatif. Stres oksidatif dapat disebabkan karena konsumsi pangan yang defisien akan antioksidan, atau akibat meningkatnya produksi radikal bebas dan ROS yang disebabkan oleh toksin. Peningkatan stres oksidatif yang didapat dari ketidakseimbangan antara jenis oksigen reaktif (termasuk anion superoksida, hidrogen peroksida, dan radikal hidroksil) dan mekanisme pertahanan antioksidan dalam tubuh. Ketidakseimbangan dapat menyebabkan efek hilangnya fungsi endotel termasuk dalam patogenesis dan progresifitas dalam gagal jantung. Stres oksidatif dapat merusak protein selular, menyebabkan apoptosis miosit dan nekrosis, juga dihubungkan dengan aritmia dan disfungsi endothelial, dengan disfungsi yang terjadi melalui reduksi aktivitas sintesis nitrit oksida termasuk inaktivasi dari nitrit oksida (Morow dan Lemos, 2009).

Berbagai penyakit degeneratif dihubungkan dengan stress oksidatif akibat radikal bebas. Stres oksidatif dapat disebabkan oleh adanya produksi SOR selama metabolisme, baik dalam keadaan normal maupun abnormal. Selain itu stress oksidatif juga dapat terjadi akibat interaksi antara sel dengan senyawa oksigen seperti misalnya senyawa yang bersifat karsinogenik, obat-obatan, maupun radiasi (Collins *et al.*, 2003).

Stress oksidatif akan menimbulkan kerusakan terhadap molekul makro seperti lipid, protein, dan DNA yang menyebabkan berbagai penyakit. Meskipun di dalam sel terdapat sistem proteksi terhadap stress oksidatif berupa enzim dan berbagai jenis protein, namun

kerusakan molekul makro akibat stres oksidatif tetap diduga sebagai penyebab penyakit degeneratif dan kanker (Jawi, 2012).

Kerusakan oksidatif pada senyawa lipid terjadi ketika senyawa radikal bebas bereaksi dengan senyawa PUFA (*poly unsaturated fatty acids*). Radikal bebas hidroksil (OH<sup>•</sup>) merupakan radikal bebas oksigen yang sangat reaktif, dapat menyerang PUFA dari fosfolipid membran antara lain seperti asam arakhidonat (Bast, 1991; Winarsi, 2007). Oksidasi lipid terjadi melalui tiga tahapan, yaitu insiasi (pencetusan), propagasi (perambatan) dan tahap terminasi (penghentian). Mekanisme reaksinya adalah sebagai berikut : (1) Radikal hidroksil akan menarik atom H dari rantai PUFA, terbentuk radikal karbon, (2) Radikal karbon akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksil, (3) Radikal peroksil yang terbentuk akan menyerang PUFA berikutnya untuk membentuk radikal karbon baru dan reaksi akan berlanjut terus merupakan reaksi berantai (Halliwell, 1994; Winarsi, 2007). Akibat akhir reaksi berantai ini adalah terputusnya rantai PUFA menjadi senyawa yang bersifat toksik terhadap sel, antara lain menghasilkan aldehida seperti malondialdehida, 9-OH nonenal, etanal dan pentanal (Winarsi, 2007). Senyawa toksik tersebut menimbulkan gangguan pada fluiditas membran, fungsi barier membran dan inaktivasi enzim maupun reseptor-reseptor yang tergantung pada membran fosfolipid (Halliwell, 1996).

#### **2.4 Interleukin-6 (IL-6)**

Interleukin-6 adalah sitokin yg dihasilkan oleh beberapa tipe sel tubuh manusia, termasuk *activated mononuclear phagocytes*, sel endotel, dan sel fibroblas (Abbas *et al.*, 2009). IL-6 untuk pertama kali di kloning tahun 1986, yang merupakan substrat glikoprotein dengan BM 22-29 KD (Giannoudis *et al.*, 2004). Gen IL-6 terdapat pada gen no 7. Bertumpang tindih dengan aktivitas TNF- $\alpha$ , IL-1, dan IL-6 mempunyai efek yang sangat luas terhadap berbagai macam sel target pada manusia (*pleitrophy*). Aktivitas IL-6 dikatakan bertumpang tindih dengan aktivitas TNF- $\alpha$  dan IL-1, tetapi IL-6 mempunyai sifat-sifat tambahan lain seperti menstimulasi hepatosit untuk menghasilkan protein fase akut, *growth factor*, dan fungsi hematopoiesis (Kresno, 2001).

Okopien *et al.* (2001) menyebutkan bahwa tingkat IL-6 secara signifikan lebih tinggi pada pasien dengan dislipidemia. Diduga ada hubungan antara kadar IL-6 dengan dislipidemia, karena IL-6 terlibat langsung dalam mekanisme aterogenesis (Dubinski dan Zdrojewicz, 2007; Hong, 2007). Kajian terbaru menunjukkan bahwa IL-6 merupakan prediktor yang paling kuat PJK (Cesari *et al.*, 2003). Inflamasi mediasi IL-6 terlibat dalam gangguan yang berkaitan dengan aterosklerosis (Omoigui, 2007). Omoigui (2007)

menyebutkan bahwa IL-6 dapat dihambat secara tidak langsung melalui pengaturan sintesa kolesterol endogen.

Pada keadaan dislipidemia, peningkatan ion superoksida/SOR dapat menginduksi pengeluaran TNF- $\alpha$ , IL-1, dan IL-6 (Fogarty dan Davey, 2005; Dimayuga *et al.*, 2006). Pada beberapa studi dilaporkan bahwa IL-6 dapat dipakai *marker* untuk mendeteksi terjadinya proses inflamasi secara dini (Harbarth *et al.*, 2001). Sedangkan menurut Gianoudis *et al.* (2004) IL-6 saat ini sudah dapat dipakai marker untuk prognosis penderita SIRS/MOD atau sepsis karena waktu paruhnya lebih lama dan stabil di dalam plasma. Ditegaskan oleh Roberts *et al.* (2005) IL-6 merupakan *marker* yang paling baik untuk menentukan derajat trauma karena stabil di plasma dengan waktu paruh lebih dari 6 jam.

Secara umum, IL-6 berhubungan dengan TNF- $\alpha$  dan IL-1 dimana ketiga sitokin tersebut dapat saling berkoordinasi pengeluarannya dari monosit yang aktif. IL-1, TNF- $\alpha$ , dan IL-6 dapat menginduksi pengeluaran sitokin lainnya. IL-1 dan TNF- $\alpha$  sebagai *proximal cytokin* dapat menginduksi pengeluaran IL-6 (efek parakrin), tetapi sebaliknya IL-6 tidak dapat menginduksi ekspresi IL-1 dan TNF- $\alpha$  (Kresno, 2001).

Seerti diketahui sebelumnya, produksi SOR atau stres oksidatif yang berlebihan pada keadaan dislipidemia akan mengaktivasi faktor transkripsi TNF- $\beta$  sehingga terjadi pelepasan sitokin. Sitokin yang paling pertama terbentuk oleh makropag (*proximal cytokin*) adalah TNF- $\alpha$  dan IL-1. Sitokin tersebut dengan efek otokrin dan parakrinnya akan memicu sel PMN yang lain untuk menghasilkan mediator lainnya seperti IL-6, NO, kemokin, ICAM, VCAM, dan VEGF, sehingga terjadi kaskade inflamasi yang kemudian menimbulkan gejala inflamasi sistemik (Dandona *et al.*, 2001). Apabila keadaan ini tidak mendapat penanganan dengan baik akan berkembang menjadi disfungsi multi organ (Kim *et al.*, 2000)

*Ox-LDL*, radikal bebas dan kombinasinya diidentifikasi sebagai pemicu cedera dan peradangan dengan peningkatan kelengketan dan aktivasi leukosit (terutama monosit) dan platelet yang disertai dengan produksi sitokin (Cesari *et al.*, 2003). Sitokin diproduksi sebagai mediator dan bekerja sebagai pengontrol aktivasi, proliferasi dan diferensiasi sel. Aktivitas sitokin dapat lokal maupun sistemik. Apabila diproduksi dalam jumlah yang banyak, sitokin dapat masuk dalam sirkulasi dan bekerja sistemik (*endocrine action*) (Karnen *et al.*, 2009). IL-6 merupakan sitokin yang diproduksi oleh makrofag, disebut dengan sitokin proinflamasi, dan mempunyai efek lokal, yakni menginduksi molekul adhesin (ICAM) pada endotel dan menarik neutrofil ke tempat cedera. Efek sistemik IL-6 diantaranya adalah : (1) Merangsang sumsum tulang untuk mengerahkan neutrofil (jumlah meningkat), (2). Terhadap hati adalah untuk memproduksi APP (*Acute Phase Protein*) CRP (*C-Reactive Protein*), MBP

(*Myelin Basic Protein*) dan SAP (*Serum Amyloid Protein*), (3). Pengaruh terhadap metabolisme protein dan energi pada lemak dan otot, (4). Mengaktifkan fase awal respons imun spesifik (Abbas *et al.*, 2007; Karnen *et al.*, 2009).

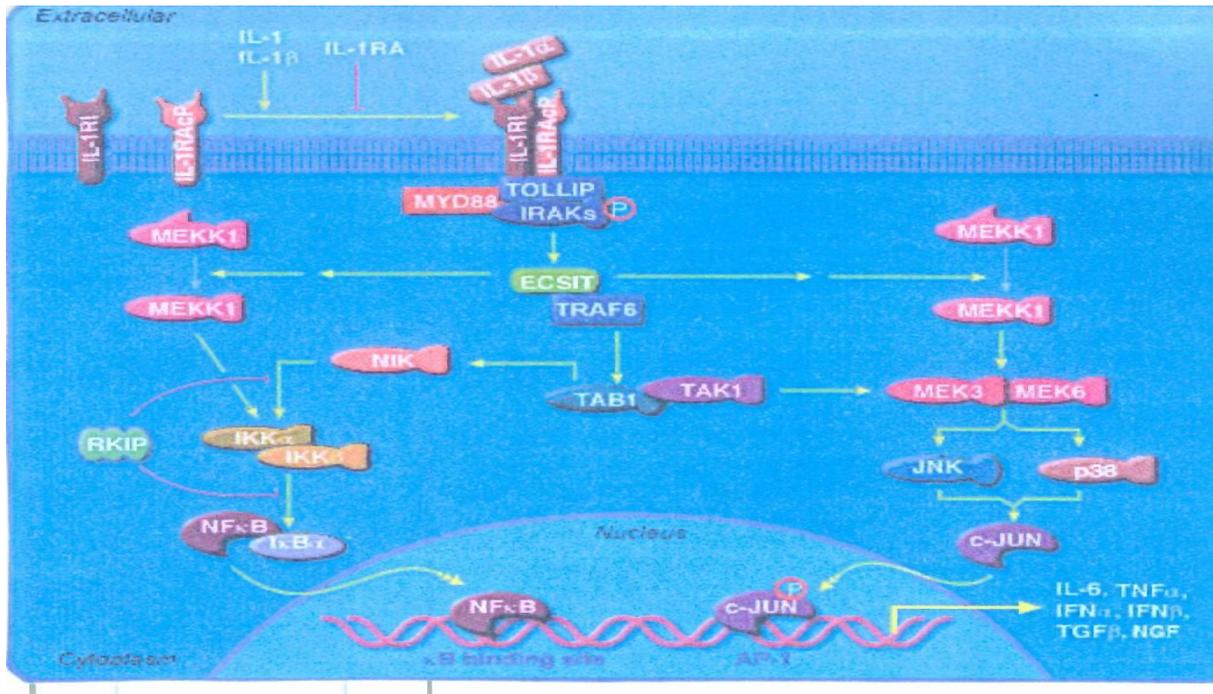
IL-6 menstimulasi sintesis semua protein fase akut yang terkait dengan respon inflamasi, seperti : *C-Reactive Protein*, Serum amyloid A, fibrinogen,  $\alpha$ 1-chymotrypsin dan haptoglobin (Woods *et al.*, 2000). Disebutkan CRP telah menunjukkan efek langsung pada endotel pembuluh darah dengan mengurangi pelepasan nitrit oksida dan meningkatkan produksi endothelium-1, dengan begitu menginduksi timbulnya molekul adhesi dari endotel. (Morow, 2009). IL-6 bekerja sama dengan TNF- $\alpha$  menghambat kerja lipoprotein lipase dan stimulasi lipolisis (Lemieux *et al.*, 2001). IL-6 juga dapat menginduksi ekspresi kemokin dan molekul adesi endotel dengan adanya reseptor IL-6 *soluble*, yang dilepaskan pada kondisi inflamasi.

Interleukin-6 merupakan salah satu yang perlu mendapatkan perhatian. Oleh karena meningkatnya IL-6 terbukti memegang peranan akan terjadinya beberapa penyakit. Hal ini diduga erat hubungannya dengan interaksi dengan faktor transkripsi, modulasi dari aktivitas nitrat oksida (NO), efek antioksidan, aksi plasma membran, dan perubahan dalam fungsi sel imun (Browatzki *et al.*, 2000; Abbas *et al.*, 2007).

Makrofag yang aktif tercermin dengan adanya pelepasan beberapa sitokin proinflamasi seperti IL-1, IL-6, IL-8, yang menginduksi sel hati melepaskan protein fase akut seperti *C-reactive protein* (CRP) dan komplemen, sedangkan IL-8 berperan sebagai *neutrofil chemotactic factor* (NCF) (Mashayekhi *et al.*, 2005). Pada iskemia kronis terjadi pelepasan sitokin (TNF  $\alpha$ , IL-1, IL-6 dan IL-8) berkisar antara 3800 – 7900 pg/ml.

Interleukin-6 merupakan sitokin *pleiotropik* dapat memberikan efek inflamasi dan sekaligus antiinflamasi. Adanya IL-6 adalah akibat rangsangan dari IL-1 $\beta$ . Di perifer, IL-1 $\beta$  mengaktivasi reseptor IL-1 dalam endotel yang mengakibatkan diproduksi IL-6. Croston (2000) menyebutkan bahwa IL-1 dapat menginduksi produksi IL-6, seperti yang tergambar dalam Gambar 2.3.

Dalam studi *in vitro* menunjukkan bahwa stres oksidatif menghasilkan peningkatan ekspresi dari faktor transkripsi proinflamasi (Fogarty *et al.*, 2005). Ternyata ditemukan bahwa proses inflamasi pada dinding pembuluh darah merupakan penyebab utama terjadi aterosklerosis, dimulai dari penebalan dinding pembuluh darah, pembentukan ”*plaque*”, *atherom*, dan *thrombus* (Alrasjid *et al.*, 2002).



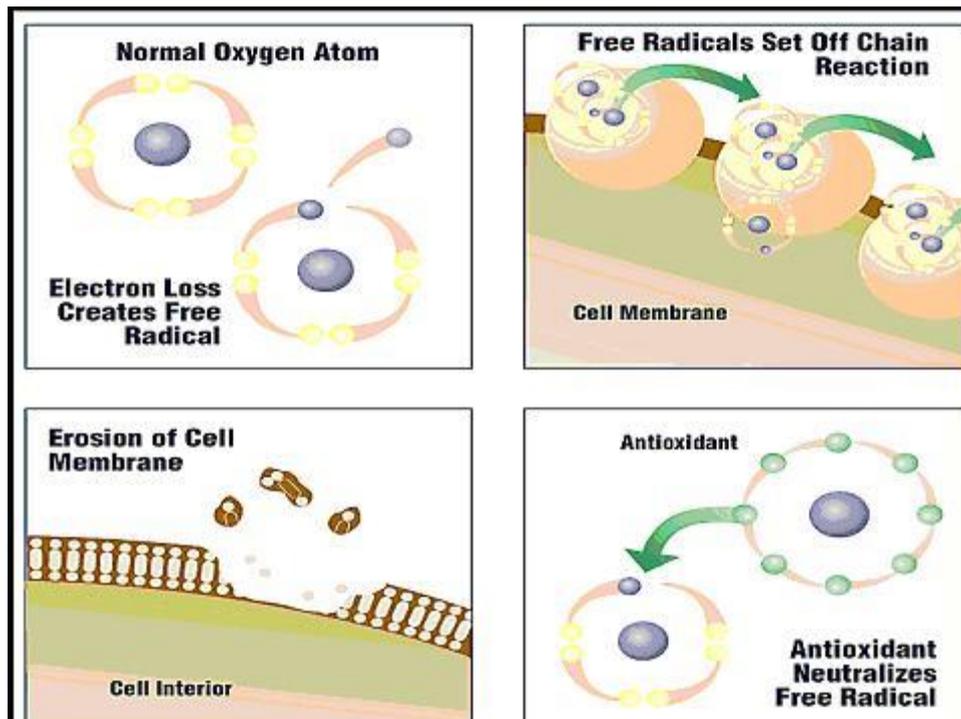
Gambar 2.3

Aktivasi IL-1 dalam Menginduksi IL-6 (Croston, 2000).

## 2.5 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menghambat atau mencegah oksidasi substrat dengan cara membersihkan (*scavenger*) atau memperbaiki kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas (Eberhardt, 2001; Sies *et al.*, 2005). Dalam pengertian kimia, senyawa-senyawa antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (*electron donor*) atau reduktan (Gambar 2.4). Namun dalam arti biologis, pengertian antioksidan lebih luas yaitu merupakan senyawa yang dapat meredam dampak negatif oksidan. Senyawa ini mencegah stres oksidatif (Surjohudojo, 2000). Senyawa ini memiliki berat molekul kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi, dengan mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Antioksidan juga memperbaiki (*repair*) kerusakan oleh radikal (Eberhardt, 2001).

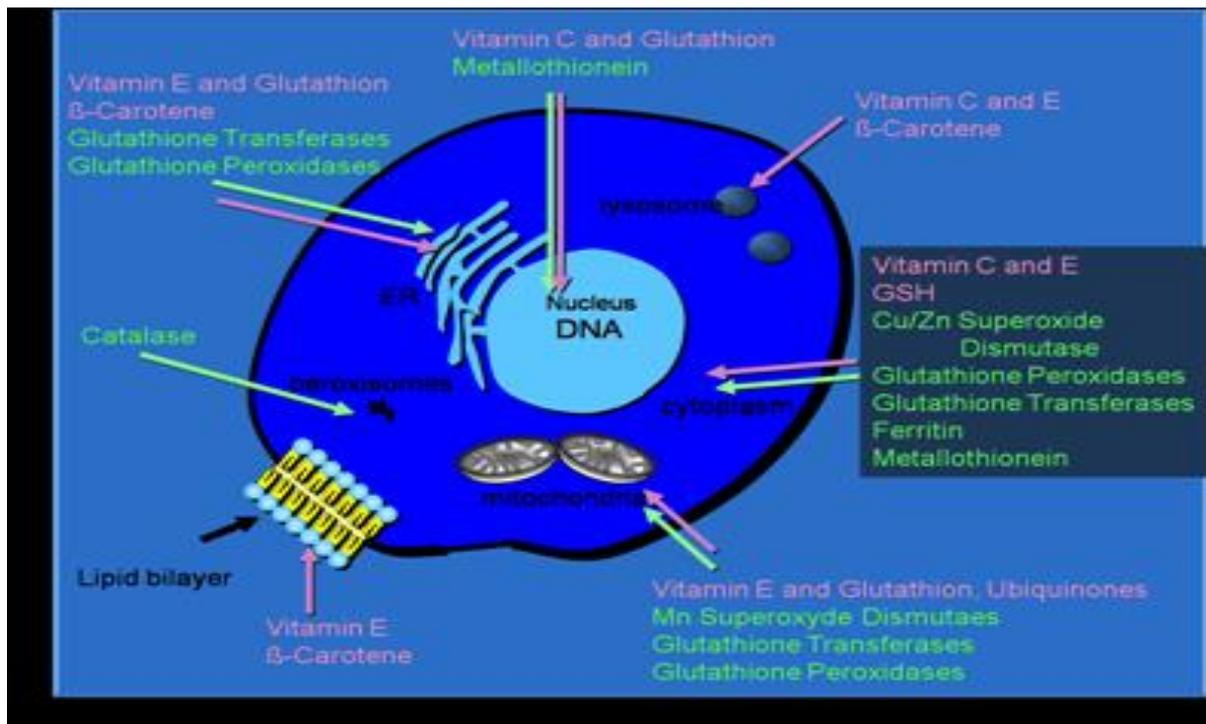
Antioksidan mempunyai fungsi penting pada sistem imun, karena sistem imun menghasilkan radikal bebas. Jika tingkat radikal dalam sistem imun melewati tingkat normal, akan memberikan pengaruh negatif pada sistem imun. Sebaliknya, antioksidan mempunyai peran menangkap radikal bebas dalam sel, dan meningkatkan sistem imun (Salvyre *et al.*, 2006).



Gambar 2.4

Mekanisme Pemberian Elektron oleh Senyawa Antioksidan dalam Netralisir Radikal Bebas (Craig, 2005).

Sistem pertahanan ini mengatur produksi dan eliminasi oksidan dan sangat penting dalam penanganan kerusakan yang terjadi selama proses stres oksidatif. Pertahanan melawan senyawa spesies oksigen reaktif (SOR) meliputi *scavenger* enzimatik dan antioksidan yang diperoleh dari diet. *Scavenger* utama terlibat dalam inaktivasi dan terminasi radikal oksigen bebas adalah SOD (*Superoxide dismutase*), katalase, dan sistem glutathion. SOD mengkatalis perubahan superoksida ( $O_2^\bullet$ ) menjadi oksigen dan  $H_2O_2$ . Glutathion peroksidase merupakan enzim antioksidan yang mengandung selenium (Se) pada sisi aktifnya. Kerja enzim ini mengubah molekul hidrogen peroksida (yang dihasilkan SOD dalam sitosol dan mitokondria) dan berbagai hidroksil serta lipid peroksida menjadi air. *Glutathion peroksidase* adalah enzim intraseluler yang terdispersi dalam sitoplasma, namun aktivitasnya juga ditemukan dalam mitokondria (Ji, 1999)(Gambar 2.5).



Gambar 2.5 Antioksidan dalam Sistem Pertahanan Tubuh (Muchtadi, 2009).

Menurut Patel *et al.* (2002) antioksidan pencegah radikal pada dasarnya ditujukan untuk mencegah terbentuknya radikal hidroksil, oleh karena radikal inilah yang paling berbahaya. Untuk membentuk radikal hidroksil, diperlukan 3 komponen yaitu logam transisi terutama Fe,  $H_2O_2$  dan  $O_2$ . Oleh karena itu protein pengikat logam transisi seperti transferin dan feritin untuk mengikat Fe dan seruloplasmin untuk mengikat Cu termasuk kategori antioksidan pencegah. Seruloplasmin adalah suatu feroksidase yang dapat mengoksidasi  $Fe^{2+}$  yang sangat toksik menjadi  $Fe^{3+}$  yang kurang toksik. Dengan demikian seruloplasmin merupakan antioksidan yang sangat kuat. Apabila radikal hidroksil masih juga terbentuk, masih ada senyawa untuk meredamnya seperti glutathion dan sistein, sehingga tidak memberikan kesempatan untuk memulai reaksi berantai (Eberhardt, 2001). Glutathion (GSH) adalah tripeptida yang tersusun atas asam amino glutamat, sistein dan glisin. Glutathion adalah kosubstrat bagi enzim glutathion peroksidase. Glutathion dapat bereaksi dengan singlet oksigen, superoksida dan hidroksil, serta secara langsung dapat berperan sebagai *scavenger* radikal bebas. Glutathion juga menghilangkan atau meminimalkan pembentukan asil peroksida dalam reaksi peroksidasi lipid sehingga struktur membran lebih stabil (Winarsi, 2007).

Senyawa ROS memberikan efek merusak bila keseimbangan antara oksidan dan antioksidan terganggu. Produksi ROS merupakan bagian integral dari metabolisme manusia.

Karena tingginya potensi untuk merusak sistem biologis penting, SOR kini telah memberatkan proses penuaan dan pada lebih dari 100 penyakit (Halliwell *et al.*, 1992). Keseimbangan ini tergantung pada konsumsi pangan yang membawa asam-asam amino esensial, serta zat-zat gizi lain yang diperlukan untuk sintesis berbagai kofaktor seperti misalnya glutathion tereduksi, antioksidan dan oligoelemen (Cu, Zn dan Se) yang merupakan kofaktor enzim-enzim yang dapat mendegradasi senyawa-senyawa ROS serta vitamin-vitamin antioksidan (vitamin A, C, E dan B<sub>2</sub>). Jadi, walaupun di dalam tubuh selalu terbentuk oksigen reaktif dan senyawa peroksida tetapi tubuh juga mampu membuangnya dengan mengubahnya menjadi air melalui reaksi yang melibatkan enzim yang mengandung Cu, Fe, Zn atau Se. Salah satu contohnya adalah peroksidase glutathion dalam mikrosom sel hati. Tubuh juga mampu mencegah terjadinya kerusakan sel akibat stres oksidatif melalui pemanfaatan senyawa antioksidan. Earl R. Stadtman, ketua laboratorium biokimia di *National Heart, Lung and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland* mengatakan mungkin bisa mengurangi banyak efek penuaan dengan menggunakan vitamin antioksidan (Youngson, 2005).

Uji coba antioksidan terhadap efek *vascular* untuk tujuan sebagai berikut (Youngson, 2005):

(1) Mengurangi sitotoksitas *Ox-LDL*.

*Ox-LDL* mempunyai sifat sitotoksik karena dapat menyebabkan nekrosis endotel dan makrofag. Enzim proteolitik seperti matriks metalloproteinase yang dilepaskan makrofag dapat menurunkan integritas struktur *fibrous cap* yang melapisi lesi aterosklerosis, diikuti lesi/plak vaskular tidak stabil dan mudah *ruptur*. Antioksidan mempunyai peranan untuk meningkatkan stabilitas plak aterosklerosis dan mencegah trombosis.

(2) Mencegah inaktivasi nitritoksida (NO) pada sel endotel.

*Endothelium-derived* NO (EDNO) merupakan molekul kunci untuk regulasi tonus vaskular dan homeostatis. EDNO mempunyai peranan yang luas, antara lain : (a) regulasi tonus vaskular terutama vasodilator, (b) aktivitas antiaterogenik yang poten termasuk inhibisi proliferasi VSMC, agregasi platelet dan interaksi leukosit-endotel. EDNO disintesis dari L-arginine oleh enzim NADPH-dependent NO synthase (NOS) baik isoform yang konstitutif maupun yang dapat diinduksi. *Ox-LDL* dapat menghambat sintesis dan pelepasan EDNO dan juga langsung inaktivasi EDNO. Radikal anion peroksida (O<sub>2</sub><sup>•</sup>) dapat berinteraksi diikuti tidak beroperannya fungsi EDNO.

Tingginya aktifitas enzim SOD akan tergambarkan oleh rendahnya produk oksidasi lipid (Zakaria *et al.*, 2000; Winarsi, 2004a). Sebagai metaloenzim, aktivitas SOD tergantung adanya logam Cu, Zn, dan Mn. Beberapa peneliti melaporkan peran logam-logam tersebut terhadap aktivitas SOD. Diantaranya adalah Davis *et al.* (2000) yang menyatakan bahwa pada wanita yang mengalami defisiensi Cu, aktivitas SOD ekstraseluler meningkat ketika dalam dietnya disuplementasi dengan Zn. Aktivitas SOD ekstraseluler pada wanita postmenopause berusia 65 tahun juga meningkat setelah mendapat suplementasi Zn sebanyak 50 mg/hari selama 90 hari (Davis *et al.*, 2000). Peningkatan aktivitas SOD intraseluler juga terjadi pada wanita premenopause yang berusia 43-52 tahun, setelah mendapat suplementasi 8 mg Zn yang dikombinasikan dengan 100 mg isoflavon kedelai (Winarsi, 2004b). Penggunaan antioksidan vitamin E 600 mg, vitamin C 1000 mg dan beta karoten 30 mg selama enam bulan menurunkan radikal bebas sebesar 17-36 % pada pelaku aktivitas fisik yang berlebih (Giriwijoyo, 2004).

Antioksidan flavonoid yang terdapat pada sayur dan buah diduga dapat mencegah stres oksidatif walaupun mekanisme kerja yang pasti dari berbagai jenis flavonoid tersebut belum diketahui secara pasti. Dugaan hingga saat ini adalah peran flavonoid sebagai antioksidan atau penangkap radikal bebas. Ternyata dari ribuan jenis flavonoid ada beberapa jenis flavonoid secara *in vitro* dan *in vivo* dapat mencegah kerusakan molekul makro melalui efek antioksidan secara langsung dan secara tidak langsung. Efek secara langsung terjadi karena flavonoid dapat menangkap radikal bebas sehingga mencegah stress oksidatif, sedangkan efek secara tidak langsung terjadi karena flavonoid dapat meningkatkan ekspresi beberapa gen yang berperan sebagai sitoprotektif atau regulator selular (Jawi, 2012).

Regulator selular yang utama di dalam sel untuk mengatasi stress oksidatif adalah *Keap1-Nrf2* sistem. Dalam keadaan tidak mengalami stress oksidatif, protein *Kelch-like ECH-associated protein-1 (Keap1)* berfungsi menekan fungsi *nuclear factor-E2-related factor-2 (Nrf2)* dalam keadaan tidak aktif. Stres oksidatif akan menekan *Keap 1*, sehingga *Nrf2* menjadi aktif dan masuk ke dalam inti sel. Di dalam inti sel, *Nrf2* akan berikatan dengan *antioxidant respons elements (ARE)* yang mengaktifkan gen sitoprotektif seperti misalnya berbagai gen pengkode antioksidan endogen. Ikatan *Nrf2* dengan ARE pada gen yang meningkatkan fungsi sitoprotektif terhadap stress oksidatif (*phase 2 gene*) akan menyebabkan terjadinya peningkatan transkripsi beberapa jenis gen antioksidan (Wakabayashi *et al.*, 2004).

Peran flavonoid dalam hal ini adalah melalui mengatur transduksi sinyal di dalam sel (Han *et al.*, 2007), sehingga flavonoid berpengaruh terhadap sistem biologis. Flavonoid

dapat mengaktifkan *extracellular signal-regulated protein kinase* (ERK), *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), dan p38. Selanjutnya flavonoid akan mengaktifkan Nrf2 sehingga terjadi peningkatan ekspresi gen antioksidan endogen. Peningkatan antioksidan endogen oleh flavonoid telah terbukti dalam peningkatan aktivitas faktor transkripsi *Nrf2* yang meningkatkan ekspresi protein HO-1 (Maher *et al.*, 2005).

### **2.5.1 Kapasitas Antioksidan Total (TAC)**

Pengukuran total antioksidan pada beberapa tahun belakangan ini semakin intensif diteliti, menjadi sangat penting karena hampir 77 % berhubungan dengan fisiologi dan patologi yang selalu dihubungkan dengan spesies oksigen reaktif dan spesies nitrogen reaktif. Kombinasi antioksidan dapat menetralkan pengaruh SOR/SNR. Diperkirakan aktivitasnya berperan penting dalam siklus perlindungan pada beberapa penyakit seperti aterosklerosis, *cardiovaskular*, saraf dan kanker (Johnson, 2002; Trumbeckaite, 2006).

Pengukuran Kapasitas Antioksidan Total (TAC) adalah pengukuran stres oksidatif yang akurat, dalam masalah peran radikal bebas pada sistem biologi penyakit. Sejumlah test telah dideskripsikan untuk pengukuran berbagai kerusakan radikal bebas atau status antioksidan, teknik yang tersedia kebanyakan membuktikan fakta bahwa tidak ada metode yang ideal tersedia (Young, 2003). Konsep sebuah tes yang mungkin mencerminkan TAC adalah salah satu yang digambarkan di bawah ini (Koracevic *et al.*, 2001):

- a. Kapasitas Antioksidan Total rendah dapat menunjukkan stres oksidatif atau peningkatan kerentanan terhadap kerusakan oksidatif.
- b. Parameter Penangkapan Total Radikal (*TRAP Assay*), berdasarkan generasi radikal peroxy, sebanding dengan TAC, standar untuk vitamin larut dalam air. *TRAP Assay* rumit, dengan sampel terbatas. Paradoksnya *TAC Assay* tidak mengukur kapasitas total antioksidan.
- c. Pada umumnya TAC berkurang dalam kondisi yang terkait dengan stres oksidatif.
- d. Cairan biologi penyumbang utama pengujian adalah asam urat, lebih besar dari 50 % dari total aktivitas antioksidan, mengakibatkan kesan menyimpang dari aktivitas total antioksidan.
- e. Pada pasien gagal ginjal, seringkali TAC meningkat.

Studi lebih lanjut manfaat menggunakan pengujian TAC dilaporkan nilai tes prediktif akan menjadi lebih jelas. Pendekatan yang lebih baik adalah dengan menggunakan berbagai pengukuran antioksidan dan kerusakan oksidatif, dengan TAC digunakan sebagai salah satu dari tes ini (Young, 2003).

Analisa utama pada " *Bleaching Crocin*", dengan tujuan pengukuran TAC, dapat menentukan kontribusi substansi TAC eksogen (Kampa *et al.*, 2002). Di lain pihak kemungkinan intervensi dari antioksidan endogen dan eksogen dapat dievaluasi dan dites pada keadaan fisiologi dan patologi. TAC *assay*, otomatis penuh, stabil dan tepat, seperti dalam mengevaluasi kapasitas antioksidan plasma, dan kegunaan berbagai makanan dan minuman, dengan kegunaan yang pasti pada kesehatan masyarakat, dapat dievaluasi. Pengukuran TAC dalam plasma pada sumber-sumber tipe oksidasi yang berbeda, target dan pengukuran digunakan untuk mendeteksi produk-produk oksidasi. Perkembangan metode *Crocin Assay*, menjadi ekonomi dan sensitif untuk pengukuran TAC plasma, disamping untuk ekstrak tanaman dan campuran alami (Chatterjee *et al.*, 2005). Mudah, mantap, tepat, sensitif, murah, otomatis penuh dapat diberikan oleh pengukuran TAC (*Crossin Assay*)(Ozcan, 2003).

Beberapa metode telah dikembangkan untuk menilai TAC serum atau plasma manusia, karena kesulitan dalam mengukur secara terpisah masing-masing komponen antioksidan dan interaksi antara berbagai komponen antioksidan dalam serum atau plasma, diantaranya adalah *Oxygen Radical Absorption Capacity (ORAC) Assay*, *Randox-TEAC Assay*, *FRAP assay*. Di antara ketiga metode ini ternyata *ORAC assay* memiliki kekhususan tinggi dan merespon berbagai antioksidan (Cao dan Prior, 2009). Metode yang relatif sederhana, sensitif dan akurat untuk mengukur kapasitas absorban radikal oksigen (ORAC) dari TAC dalam jaringan, tetapi gagal menunjukkan kontribusi beta karoten yang signifikan pada TAC dalam darah (Sergio dan Russell, 1999).

TAC serum mempunyai hubungan positif terhadap keparahan berbagai penyakit (Chuang *et al.*, 2006). Serum asam urat mempunyai kontribusi besar terhadap kadar TAC. Dari hasil penelitiannya ditemukan bahwa kadar TAC serum lebih tinggi pada pasien yang menderita sepsis yang parah, khususnya yang tidak mendapat perawatan. Boveris *et al.* (2002) menyampaikan hipotesis bahwa proses antiinflamasi diaktifkan untuk menyeimbangkan tingkat pengaruh dari proinflamasi sitokin atau stres oksidatif. Hal itu merubah pertahanan antioksidan (contohnya terjadi perubahan signifikan pada tingkat TAC serum) (Opal, 2003). Serum asam urat, vitamin A, C dan E, merupakan *scavenger* radikal bebas yang kuat dan responnya meningkat pada stres oksidatif (Pascual *et al.*, 1998).

Beta karoten dan Isoflavon termasuk kelompok antioksidan non-enzimatis atau disebut juga antioksidan sekunder, karena dapat diperoleh dari asupan bahan makanan. Senyawa-senyawa ini berfungsi menangkap senyawa oksidan serta mencegah terjadinya reaksi berantai. Senyawa-senyawa tersebut tidak kalah penting perannya dalam menginduksi

status antioksidan tubuh (Winarsi, *et al.*, 2003). Isoflavon tempe dan beta karoten dapat meningkatkan aktivitas katalase. Isoflavon dan selenium mempengaruhi aktivitas enzim glutathion peroksidase (Winarsi, 2007). Diet rendah beta karoten, tetapi cukup dalam semua zat gizi lain menghasilkan tanda-tanda berkurangnya TAC darah (Omaye *et al.*, 1997). Suplemen pada diet harian dengan 90 mg beta karoten telah menunjukkan peningkatan TAC plasma (Sergio dan Russell, 1999).

Relevansi TAC sebagai alat baru untuk menyelidiki hubungan antara diet antioksidan dan stres oksidatif, menunjukkan korelasi terbalik antara diet antioksidan dengan resiko PJK dan kanker. TAC dianjurkan diperhatikan sebagai keterangan dari diet (Serafini *et al.*, 2002).

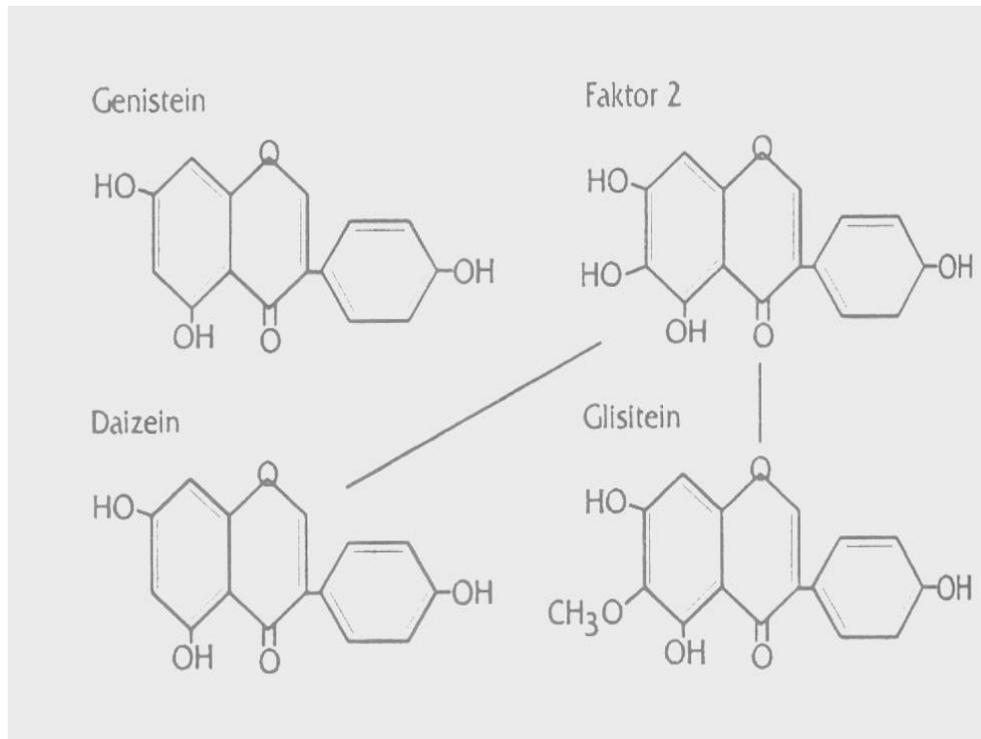
### **2.5.2. Tempe M-2**

Kedelai varietas lokal sebagai bahan baku tempe M-2, mengalami berbagai perubahan komposisi selama proses pembuatan tempe M-2 baik oleh proses fisik (pada dua kali perebusan dengan penambahan asam laktat), maupun proses enzimatik oleh adanya aktivitas mikroorganisme. Keterlibatan mikroorganisme pada proses fermentasi oleh kapang khususnya *Rhizopus oligosporus*. Sebagai akibat perubahan-perubahan tersebut tempe M-2 menjadi lebih enak, lebih bergizi dan lebih mudah dicerna. Salah satu faktor penting dalam perubahan tersebut adalah terbebasnya senyawa-senyawa isoflavon dalam bentuk bebas (*aglikon*), berpotensi tinggi sebagai antioksidan, antihemolitik, penurun kadar darah, anti kanker dan sebagainya (Baziad, 2003; Pawiroharsono, 2000).

Tempe M-2 dapat berfungsi sebagai antioksidan, hal ini disebabkan adanya isoflavonoid yaitu metabolit sekunder yang terdiri dari 19 kelompok senyawa aglikon (berada dalam keadaan bebas atau tidak terikat dengan senyawa yang lain) dan enam kelompok glikosida (berikatan dengan senyawa yang lain). Unsur utama penyusun isoflavonoid adalah sama yaitu 15 atom Carbon dengan susunan sebagai C6-C3-C6. Isoflavon yang terdapat pada kedelai sebagai bahan baku proses pembuatan tempe adalah 90 % terdiri dari *daidzein* dan *genestein* (Baziad, 2003), Dari berbagai makanan, yang paling banyak mengandung isoflavon adalah tempe ( Winarsi, 2007).

King (2002) dan Soobrattee *et al.* (2005) melaporkan bahwa dalam kedelai terdapat tiga jenis isoflavon, yaitu *daidzein*, *glisitein*, dan *genistein*. Pada tempe, di samping ketiga jenis isoflavon tersebut juga terdapat antioksidan Faktor II (*6,7,4-trihidroksi isoflavon*) yang mempunyai sifat antioksidan paling kuat dibandingkan dengan isoflavon dalam kedelai. Antioksidan ini disintesis selama proses pembuatan tempe, baik dalam proses perendaman maupun pada saat terjadinya proses fermentasi kedelai menjadi tempe. Faktor II yang hanya

terdapat dalam tempe, terbukti diproduksi oleh bakteri *Micrococcus luteus*, *Microbacterium arborescens* dan *Brevibacterium epidermis* (Papendorf dan Barz, 1991). Proses pembentukan Faktor II dapat terjadi melalui 2 reaksi yaitu (1) melalui demetilasi *glisitein* oleh bakteri *Micrococcus luteus* dan *Brevibacterium epidermis*, dan (2) melalui hidroksilasi *daidzein* oleh bakteri *Microbacterium arborescens* (Gambar 2.6).



Gambar 2.6.

Biosintesa Faktor II pada Tempe (Papendorf dan Barz, 1991).

Terdapat 3 struktur penting isoflavon yang menentukan kekuatan aktivitas antioksidannya. Pertama, gugus  $-OH$  ganda, ke dua, gugus  $C=O$  pada posisi  $C_4$ , ke tiga, gugus  $-OH$  pada posisi  $C_2$  atau  $C_3$  (Tharn, 1998)(Gambar 2.6). Fungsi sistem gugus demikian memungkinkan terbentuknya kompleks dengan ion logam. Kemampuan antiperoksidasi isoflavon dengan cara membersihkan radikal bebas dan membentuk kompleks dengan ion logam (ion besi atau tembaga), sehingga menghambat ion besi atau tembaga dalam mengkatalis reaksi oksidasi.

*Genistin* merupakan isoflavon yang terdapat dalam tempe yang diyakini dapat menghambat kerja enzim-enzim yang memacu perkembangan dan perpindahan sel-sel, sehingga *genistin* dapat mencegah perkembangan sel-sel yang membentuk plak dalam pembuluh arteri (Mindell, 2008).

Senyawa flavonoid dapat menggantikan vitamin E. Aktivitas antioksidan flavonoid tergantung pada struktur molekulnya, terutama gugus prenil  $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2$ . Dalam penelitian menunjukkan bahwa gugus prenil flavonoid dikembangkan untuk pencegahan atau terapi terhadap penyakit yang berhubungan dengan radikal bebas (Sofia, 2005).

Selama proses fermentasi tempe, terdapat tendensi adanya peningkatan derajat ketidakjenuhan terhadap lemak. Dengan demikian, asam lemak tidak jenuh majemuk (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA) meningkat jumlahnya. Dalam proses itu asam palmitat dan asam linoleat sedikit mengalami penurunan, sedangkan kenaikan terjadi pada asam oleat dan linolenat (asam linolenat tidak terdapat pada kedelai). Asam lemak tidak jenuh mempunyai efek penurunan terhadap kandungan kolesterol serum, sehingga dapat menetralkan efek negatif sterol di dalam tubuh. Disamping itu senyawa lain yang banyak disebut-sebut berefek menurunkan kandungan kolesterol LDL adalah asam-asam lemak tidak jenuh seperti khususnya asam linolenat (omega-3), begitu juga kandungan asam oleat, linoleat, dan asam arakhidonat (Johan, 2005). Nicoletta *et al.* (2005) menegaskan bahwa minyak kedelai memiliki kapasitas antioksidan tertinggi di antara minyak kacang-kacangan. Substansi aktif terkandung dalam tempe yang bermanfaat sebagai obat disebutkan dalam Tabel 2.1 di bawah ini.

Kemudian disebutkan pula bahwa mineral mikro yang dibutuhkan untuk pertahanan tubuh dalam menanggulangi radikal bebas ialah zat besi, tembaga dan seng. Ketiga mineral ini terdapat dalam tempe yaitu : zat besi 9,39 mg, tembaga 2,87 mg dan seng 8,05 mg per 100 g tempe. Tembaga yang terdapat di dalam fraksi sinositol umumnya berada dalam bentuk enzim superoksida dismutase, ataupun tembaga terikat oleh metallothienin. Sedangkan tembaga yang terdapat di dalam fraksi mitokondria pada umumnya dalam bentuk sitokrom oksidase, urikase dan superoksida dismutase. Dengan demikian untuk pengendalian awal dari tahap awal terbentuknya radikal bebas, diperlukan bantuan mineral Cu dan Zn, yang keduanya terdapat di dalam tempe. Zn, Cu dan isoflavon terkandung dalam konsentrasi cukup tinggi dalam tempe (Ridwan, 1997), berarti tempe dapat meningkatkan aktivitas antioksidan enzimatis. Jumlah mineral besi, tembaga, dan seng berturut-turut adalah 9,39 mg, 2,87 mg, dan 8,05 mg setiap 100 g tempe. Kapang tempe dapat menghasilkan enzim fitase yang akan menguraikan asam fitat (yang mengikat beberapa mineral) menjadi fosfor dan inositol. Dengan terurainya asam fitat, mineral-mineral tertentu (seperti besi, kalsium, magnesium, dan seng) menjadi lebih tersedia untuk dimanfaatkan tubuh.

**Tabel 2.1**  
**Substansi Aktif dalam Tempe**

No	Substansi Aktif	Potensi/Fungsi
1.	Isoflavon : daidzein, genistein, glisitein, Faktor II	Antioksidan, Antihemolitik, Anti fungi, Anti kanker
2.	Asam lemak tidak jenuh jamak (PUFA) : Asam oleat, Asam linoleat, Asam linolenat	Antioksidan, Hipokolesterolemik, Antiinflamasi
3.	Vitamin larut lemak : Vitamin E ( $\alpha$ - tokoferol) dan $\beta$ -karoten	Antioksidan, Antihemolitik, Metabolisme, Melindungi sel.
4.	Senyawa anti bakteri	Menghambat pertumbuhan bakteri
5.	Ergosterol	Hipokolesterolemik, pro-vitamin D
6.	Fitoestrogen	Hipokolesterolemik, Antiinflamasi
7.	Vitamin B kompleks : Tiamin, Riboflavin, Niasin, Asam pantotenat, Sianokobalamin, Folat	Hipokolesterolemik, Antiinflamasi, Metabolisme (ko-enzim)
8.	Enzim : Protease, Lipase, Amilase, Glikosidase, Superoksida dismutase	Metabolisme/hidrolisis
9.	Hormon Tiroksin, Pankreas	Hipokolesterolemik

Sumber : Hendromartono, 1997; Mindell, 2008; Pawiroharsono, 1997; Winarsi, 2007

Tempe merupakan sumber vitamin B yang sangat potensial. Jenis vitamin yang terkandung dalam tempe antara lain vitamin B<sub>1</sub> (tiamin), B<sub>2</sub> (riboflavin), asam pantotenat, asam nikotinat (niasin), vitamin B<sub>6</sub> (piridoksin), dan B<sub>12</sub> (sianokobalamin). Menurut Yuniastuti (2008) vitamin B<sub>2</sub> termasuk antioksidan. Tempe juga mengandung alfa dan gamma tokoferol dalam konsentrasi yang terbatas. Alfa tokoferol merupakan antioksidan pemutus rantai yang bersifat lipofilik dan dapat bereaksi dengan radikal peroksida lemak sehingga terjadi hambatan oksidasi asam lemak tidak jenuh terutama asam arakhidonat (Bhagavan, 2002).

Ditegaskan oleh Ridwan (1997) senyawa antioksidan Faktor II (*6,7,4 trihidroksi isoflavon*) mampu mengikat zat besi sehingga mencegah besi dalam mengkatalis reaksi oksidasi. Dalam penelitian lanjutan ditunjukkan bahwa rendahnya kadar peroksidasi lemak yang ditunjukkan oleh kadar *melondialdehyde* (MDA) dalam darah tikus yang diberi pakan tempe, yang mana mampu menghambat proses oksidasi lemak dan mencegah kerusakan sel. Seperti halnya vitamin C, E, dan karotenoid, isoflavon juga merupakan antioksidan yang sangat dibutuhkan tubuh untuk menghentikan reaksi pembentukan radikal bebas. Alrasyid (2007) menyebutkan bahwa isoflavon *genistein* yang terdapat dalam tempe telah terbukti sebagai penghambat tirosin kinase yang kuat, adalah enzim yang berperan pada

pembentukan trombin serta gangguan yang ditimbulkannya. Analisis molekular dari isoflavon *genistein* kedelai ternyata memperlihatkan struktur yang mirip dengan 17  $\beta$ -estradiol, mendukung mekanisme kerja substansi ini dalam perbaikan profil lipid plasma (Kim *et al.*, 2000). *Genistein* (17  $\beta$ -estradiol eksogen) secara tidak langsung mempengaruhi lipolisis dengan memacu *lipolytic enzyme hormone-sensitive lipase* atau dengan meningkatkan efek lipolitik dari epinefrin (Cooke *et al.*, 2004).

### 2.5.3. Wortel

Wortel merupakan tanaman sayuran umbi yang kaya antioksidan beta karoten yang merupakan prekursor vitamin A, serta mengandung cukup banyak tiamin dan riboflavin (Asgar dan Musaddad, 2006). Wortel mentah atau dimasak merupakan sumber kalium, beta karoten, dan vitamin C. Beta karoten dan vitamin C pada wortel berkhasiat sebagai antioksidan, yang melindungi kolesterol LDL dari proses oksidasi. Oksidasi kolesterol LDL menghasilkan radikal bebas, penyebab timbulnya berbagai penyakit degeneratif (Wirakusumah, 1997).

Suatu studi yang melibatkan 90.000 orang wanita, menunjukkan bahwa mereka yang mengkonsumsi beta karoten lebih dari 11.000 IU per hari mempunyai resiko mengidap penyakit jantung 22% lebih rendah dibandingkan dengan mereka yang mengkonsumsi hanya 3.800 IU per hari. Studi ini juga menunjukkan bahwa mereka yang mengkonsumsi wortel sedikitnya lima umbi per minggu, mempunyai resiko terkena stroke 68% lebih rendah dibandingkan dengan mereka yang tidak mengkonsumsi wortel. Aliansi Penelitian Penuaan (*the Alliance of Aging Research*) menyarankan agar orang dewasa mengkonsumsi beta karoten sebanyak 10 mg (17.000 IU) sampai 30 mg (50.000 IU) per hari. Satu cangkir jus wortel mengandung sekitar 24 mg beta karoten, sedangkan satu umbi ubi jalar merah mengandung sekitar 10 mg beta karoten. Pemasakan dengan panas yang berlebihan menghancurkan beta karoten (Muchtadi, 2009). Komposisi gizi yang terkandung di dalam wortel disebutkan dalam Tabel 2.2. di bawah ini.

Konsumsi beta karoten yang berasal dari sumber tanaman bersifat aman dan tidak akan memberikan efek toksik sampai 100.000 IU per hari. Lain halnya beta karoten sintetis berlebihan mempunyai resiko potensial sebagai prooksidan (Muchtadi, 2009; Patrick, 2000; Sunita, 2009).

Beta karoten sebagai antioksidan berperan dalam meredam singlet oxygen dan mencegah peroksidasi lipid, efeknya menyerupai efek vitamin E dan vitamin C dalam melindungi DNA dan membran dari serangan oksidatif endogenus (Murray *et al.*, 2009; Roche, 2000; Robbins *et al.*, 2004; Sikka, 1996). Beta karoten sebagai antioksidan berperan

mencegah reaksi berantai yang ditimbulkan radikal hidroksil yang merupakan suatu SOR yang paling reaktif sehingga dapat mencegah terputusnya rantai asam lemak pada membran dan mencegah pembentukan ikatan disulfida (-S-S-) pada protein/enzim sehingga tidak kehilangan aktivitas biologisnya yang berhubungan dengan pembentukan energi (Mayes, 2002).

**Tabel 2.2**  
**Komposisi Gizi per 100 g Wortel BDD**

<b>Kandungan Gizi</b>	<b>Jumlah</b>
Energi (kkal)	36
Protein (g)	1
Lemak (g)	0,6
Karbohidrat (g)	7,9
Kalsium (mg)	45
Fosfor (mg)	74
Besi (mg)	1
Kalium (mg)	0,30
Sodium (mg)	0,03
Beta Karoten (mg)	21,6
Vitamin A (mg)	9,77
Vitamin B <sub>1</sub> (mg)	0,05
Vitamin B <sub>2</sub> (mg)	0,04
Niasin (mg)	0,53
Vitamin C (mg)	18
Serat pangan (g)	1
Abu (g)	0,6
Air (g)	89,9

Sumber : Wirakusumah (1995)

Beta karoten adalah suatu antioksidan pemutus rantai, bersifat lipofilik sehingga berperan pada membran sel untuk mencegah peroksidasi lipid. Beta karoten adalah senyawa yang dapat memberikan elektron (*electron donor*) kepada radikal bebas atau oksidan sehingga senyawa radikal stabil (Mayes, 2002). Beta karoten disebutkan sebagai antioksidan yang sangat baik, karena kemampuannya untuk memadamkan *singlet oxygen* dan *scavenger* radikal peroksil (Osterlie dan Lerfall, 2005).

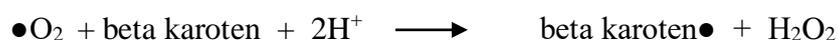
Beta karoten merupakan antioksidan yang paling efisien untuk inaktivasi *singlet oxygen* dalam sistem biologis. Potensi beta karoten untuk menangkap oksigen singlet diduga melalui ikatan rangkap yang berjumlah sembilan pada rantai karbonnya. Kecepatan penghilangan *singlet oxygen* oleh karotenoid tergantung pada jumlah ikatan rangkap terkonyugasi dan pada jenis dan jumlah grup fungsional struktur cincin molekul karotenoid. Untuk dapat bertindak sebagai penghilang *singlet oxygen* yang efektif, paling sedikit harus

terdapat tujuh ikatan terkonyugasi, dan makin efektif bila jumlah ikatan terkonyugasi semakin banyak. Mekanisme inaktivasi *singlet oxygen* oleh karotenoid adalah secara fisik tanpa menghasilkan produk teroksidasi. Beta karoten mendonorkan elektron kepada radikal bebas, dan menjadi kation radikal beta karoten, seperti reaksi di bawah ini :



Aktivitas antioksidan beta karoten meningkat pada konsentrasi oksigen rendah (Paloza *et al.*, 1997). Bukan hanya konsentrasi oksigen tetapi juga konsentrasi karotenoid memainkan peranan penting dalam menentukan sifat karoten apakah sebagai antioksidan atau sebagai prooksidan. Konsentrasi beta karoten tinggi, beta karoten sebagai prooksidan, tetapi bisa dimodifikasi oleh interaksi dengan nutrisi lainnya (Gaziano *et al.*, 1995). Dengan menggunakan studi *in vitro*, menunjukkan bahwa efek prooksidan beta karoten benar-benar dicegah dengan penambahan tokoferol (Paloza, 1995).

Relatif tingginya potensial reduksi 1-elektron radikal kation beta karoten (1060 mV), dapat menjelaskan sifat prooksidan beta karoten. Beta karoten tidak dapat secara efektif mendonorkan atom hidrogen kepada radikal peroksil yang mempunyai potensial reduksi 1-elektron standar yang serupa (1000 mV), oleh karena itu tidak dapat berfungsi sebagai antioksidan. Kemungkinan beta karoten dapat bereaksi dengan radikal bebas melalui mekanisme lain, dan molekul beta karoten menjadi molekul stabil akibat resonansi, atau menjadi radikal terkonyugasi. Tergantung pada potensial redoks radikal bebas dan struktur kimia karotenoid, terutama terdapatnya group fungsional yang mengandung oksigen, baik hidrogen maupun elektron dapat ditransfer dari karotenoid kepada radikal bebas. Beta karoten dapat menginaktifkan anion superoksida melalui reaksi sebagai berikut (Muchtadi, 2000; Omaye *et al.*, 1997) :



Beta karoten berperan dalam meningkatkan sistem imunitas melalui efek antioksidan. Beta karoten juga menjamin perkembangan kulit yang sehat, membran mukosa, kelenjar thymus dan jaringan lymphoid dan semua yang berhubungan dengan sistem kekebalan tubuh (Sofia, 2005). Diet tinggi buah-buahan, sayuran dan plasma yang tinggi beta karoten, dapat menghambat pembentukan LDL teroksidasi, yang berhubungan dengan penurunan risiko PJK (Gaziano *et al.*, 1992; Muchtadi, 2000). Kadar beta karoten pada buah-buahan dan sayuran ditampilkan pada Tabel 2.3.

**Tabel 2.3**  
**Kadar Beta Karoten pada Buah-Buahan**  
**dan Sayur-Sayuran BDD**

Komuditas	Beta karoten (mg/100g)
Wortel	21,6
Daun singkong	19,8
Sawi	11,6
Kangkung	11,3
Bayam	11
Pisang raja	1,7
Pepaya	1,1
Tomat masak	2,7
Semangka	1,1
Jeruk	0,03
Mangga gadung	11,4
Ubi jalar merah	13,9

Sumber : Sunita (2009).

Beta karoten memiliki aktivitas antioksidan terbaik, telah dipelajari kemampuannya untuk mencegah penyakit kronis, memiliki sifat antioksidan *in vitro* dan hewan coba. Campuran beta karoten dengan antioksidan lainnya meningkatkan aktivitas mereka melawan radikal bebas (Sergio dan Russell, 1999).

## **2.6 Tempe M-2 sebagai Antiinflamasi.**

Tempe telah digemari oleh beberapa kalangan masyarakat di pedesaan dan perkotaan bahkan di luar negeri. Di beberapa tempat makanan tempe tidak lagi dijadikan menu tambahan melainkan disantap sebagai makanan kesehatan.

Menurut Herlinawati (2006) niasin tempe dapat meningkatkan secara signifikan kandungan kolesterol HDL pada penderita jantung koroner serta individu dengan kadar kolesterol HDL yang rendah. Proses penempean meningkatkan kandungan niasin hingga 2-5 kali. HDL meningkatkan aktivitas antioksidan sehingga memproteksi kolesterol LDL dari proses oksidasi dan menurunkan ekspresi molekul adhesi dari endotel pembuluh darah (Hastuti, 2005). Mekanisme potensial HDL dalam melindungi endotel dari kerusakan vaskular adalah melalui kemampuan HDL dalam mengeluarkan kolesterol dari dalam dinding arteri. IL-6 dapat dihambat secara tidak langsung melalui pengaturan sintesa kolesterol endogen (Endermann *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005).

Asam lemak tidak jenuh omega-3 tempe dapat mengurangi sekresi sitokin proinflamasi/properadangan dan menurunkan proses peradangan (inflamasi) (Sunita, 2009).

Asam lemak tidak jenuh omega-3 dapat mengurangi sekresi sitokin proinflamasi dan pengaturan penurunan proses peradangan. Supplementasi omega-3 selama 18 minggu menghambat signal pada basal dan *Lipopolysaccharide* (LPS) yang merangsang IL-6 atau produksi monosit (Abbate *et al.*, 1996).

Penelitian pengaruh tiroid pada binatang menunjukkan bahwa tempe dapat meningkatkan kadar tiroksin plasma darah, hormon yang diproduksi oleh kelenjar gondok, yang pada saat yang sama juga mengurangi kadar kolesterol darah, sehingga mengurangi tingkat inflamasi (Mindell, 2008).

Tempe mengandung antioksidan zat anti mutagenik (Simanjuntak dan Sudaryati, 1998). Rifas *et al.* (1995) mendapatkan dalam penelitiannya bahwa kemampuan estrogen mengatur produksi sitokin sangat bervariasi dari masing-masing organ maupun masing-masing spesies, begitu juga terhadap produksi dari IL-6. Ditegaskan oleh Manolagas (1995) dan Keller *et al.* (1996) bahwa estrogen menghambat ekspresi gen IL-6, melalui represi aktivasi transkripsi dari gen IL-6 melalui efek estrogen reseptor dalam aktivitas transkripsi dari sequens proksimal 225-bp dari promoter.

Para peneliti menyatakan bahwa kombinasi asam amino yang terdapat dalam kedelai dapat mengubah tahap yang penting dalam pembentukan kolesterol. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa setelah makan kedelai kadar glucagon darah meningkat (glucagons adalah hormon yang dikeluarkan oleh pankreas). Mereka menduga bahwa perubahan dalam glucagons dapat mengubah kinerja HMG-KoA reduktase (Coenzym A), yang sangat penting dalam mensintesa kolesterol. Ada kemampuan inhibitor HMG-KoA reduktase untuk menurunkan kadar CRP (Mindell, 2008; Nawawi *et al.*, 2003).

Isoflavon dapat menghambat inflamasi IL-6, penghambatan langsung pada jalur reaksi sinyal transduksi. Disebutkan pula bahwa aktivitas *antiresorptive phytoestrogen* pada tempe kedelai isoflavon sebagai mediatornya. Isoflavon yang terdapat pada tempe, dapat meniru peranan dari hormon estrogen, dapat berikatan dengan reseptor estrogen sebagai aktivitas hormonal, menyebabkan serangkaian reaksi yang menguntungkan tubuh. Pada saat kadar hormon estrogen menurun, akan terdapat banyak kelebihan reseptor estrogen yang tidak terikat walaupun afinitasnya tidak sebesar estrogen. Target terapi untuk mengontrol beberapa penyakit, mencakup inhibisi IL-6 (Baziad, 2003; Kim *et al.*, 2003; Koswara, 2006; Omoigui, 2007).

## 2.7 Wortel sebagai Antiinflamasi

Wortel mengandung beta karoten paling tinggi, yang dapat menghambat oksidasi arakhidonat menjadi endoperoksida dan menurunkan aktivitas lipoksigenase (Lieber dan Leo, 1999). Apabila oksidasi asam arakhidonat dapat dihambat maka tidak terbentuk oksigen reaktif yang dapat menyebabkan nyeri dan inflamasi. Penurunan aktivitas enzim lipoksigenase menyebabkan tidak terbentuknya leukotrien yang dapat mengaktivasi leukosit yang memacu terjadinya peradangan (Lieber dan Leo, 1999). Adanya hambatan pada oksidasi asam arakhidonat dan penetralan oksigen reaktif menyebabkan beta karoten berefek antiinflamasi, selain itu beta karoten juga dapat menghambat terbentuknya leukotrien sehingga proses inflamasi dapat dihambat. Reseptor IL-6 dikendalikan oleh vitamin A (Parakkasi, 1999). Optimalnya aktivitas perasan umbi wortel tidak hanya beta karoten yang bertanggung jawab dalam memberikan antiinflamasi. Kemungkinan antioksidan lain yang terkandung dalam perasan umbi wortel, seperti vitamin C juga memberikan peran antiinflamasi (Esvandiary *et al.*, 2007).

Hasil penelitian Widarsih (2003) menyebutkan bahwa air perasan umbi wortel memiliki daya antiinflamasi pada dosis 5 ml/kgbb. Suatu studi membuktikan, konsumsi beta karoten 30-60 mg/hari selama 2 bulan, membuat tubuh memiliki jumlah sel-sel pembunuh alami bertambah banyak dan memperbanyak aktivitas sel-sel T helpers dan limfosit (Budi, 2009). Dipertegas oleh Astawan (2010) bahwa beta karoten membantu sistem kekebalan tubuh menghasilkan sel pembunuh alami (*natural killer cells*). Defisiensi beta karoten dapat merusak sistem imun sehingga dapat menurunkan respon imun. Dosis optimal beta karoten yang memiliki efek antiinflamasi adalah dosis 0,9225 mg/kg bb (Utami dan Wijoyo, 2007).

## 2.8 Normometabolik *Food Combining* Tempe M-2 dengan Wortel.

Pola makan *food combining* adalah pola makan dimana makanan- makanan tersebut dikombinasikan dengan serasi supaya mendapatkan manfaat yang diinginkan. Kombinasi makanan tersebut dikombinasikan mengacu pada karakteristik makanan tertentu. Salah satunya adalah berdasarkan sifat pembentuk asam dan basa. Inti dari *food combining* yaitu kombinasi makanan yang serasi berdasarkan sifat pembentuk asam dan basa suatu makanan, sehingga keseimbangan asam dan basa dapat dicapai. Terdapat pola tersendiri dalam kombinasi makanan yang serasi. Seperti sayur dapat dimakan bersamaan dengan makanan kelompok protein. Kombinasi serasi antara berbagai makanan menjadi pokok utama dari *food combining* yang memperhatikan sifat makanan yang termasuk pembentuk asam atau basa di

dalam tubuh. Kombinasi yang tepat bertujuan mencapai keseimbangan asam dan basa, sehingga terhindar dari gangguan fungsi tubuh dan penyakit. *Food combining* tempe *M-2* dengan wortel merupakan kombinasi makanan yang sangat serasi, satu dengan yang lain saling bersinergi menormometabolik pH darah (Farida dan Amalia, 2009). Tempe *M-2* dengan wortel sama-sama merupakan sumber mineral logam utamanya kalium, kandungan kalium ini yang dapat membantu menetralkan asam dalam darah, dan sama-sama sebagai sumber antioksidan yang kuat.

Keseimbangan asam basa jaringan tubuh dan darah manusia harus berada pada pH 7,3-7,5 agar tetap sehat dan berfungsi optimal. Di atas pH 7,8 atau di bawah pH 6,8 akan menimbulkan gangguan metabolisme, yang pada akhirnya juga gangguan pada kesehatan. Oleh sebab itu tubuh memerlukan lebih banyak makanan pembentuk basa daripada makanan pembentuk asam. Kandungan mineral pada makanan sangat potensial dalam mempengaruhi atau membentuk suasana asam atau basa di dalam tubuh. Makanan pembentuk asam mengandung lebih banyak mineral non logam seperti sulfur (S), fosfor (P), dan klor (Cl). Sedangkan makanan yang dapat menurunkan keasaman tubuh atau membentuk basa tubuh mengandung lebih banyak mineral logam, seperti kalium (K), natrium (Na), magnesium (Mg), zat besi (Fe), dan kalsium (Ca) (Gunawan, 2001).

Tempe tergolong makanan pembentuk basa tubuh, karena tempe mengandung protein penting untuk menyeimbangkan tingkat pH dalam tubuh (Morrison dan Hark, 1999). Zn sebagai bagian dari *karbonik anhidrase* dalam sel darah merah, berperan dalam pemeliharaan keseimbangan asam-basa dengan cara membantu mengeluarkan karbondioksida dari jaringan serta mengangkut dan mengeluarkan karbondioksida dari paru-paru pada pernafasan.

Tempe *M-2* dengan wortel sama-sama merupakan sumber mineral logam natrium, magnesium, zat besi, kalsium dan utamanya kalium, kandungan mineral logam inilah yang dapat membantu menetralkan asam dalam darah. Tempe *M-2* dengan wortel sama-sama sebagai sumber antioksidan yang kuat. Kombinasi antioksidan dapat menetralkan pH dan radikal bebas, aktivitasnya penting dalam perlindungan dari beberapa penyakit, seperti aterosklerosis, kardiovaskular, saraf dan kanker (Gunawan, 2001; Johnson, 2002; Thumbeckaite, 2006). Tempe *M-2* merupakan makanan yang difermentasi, adalah pembentuk basa, karena perubahan status mikrobiologis dan nutrisi, meningkatkan flora usus yang baik, membantu menyintesis lebih banyak enzim dan vitamin, serta meningkatkan pencernaan protein (Marsden, 2008).

Adapun akibat positif dari kombinasi makanan serasi tersebut adalah meminimalkan jumlah penumpukan sisa makanan dari hasil metabolisme tubuh, sehingga fungsi pencernaan

dan penyerapan zat makanan menjadi lancar. Cara *food combining* mengkombinasikan ataupun memisahkan jenis makanan tertentu dilakukan atas dasar cara kerja enzim dan waktu yang diperlukan untuk mencerna setiap jenis makanan. Inti dari *Food Combining* yaitu kombinasi makanan yang serasi berdasarkan sifat pembentuk asam dan basa suatu makanan, sehingga keseimbangan asam dan basa dapat dicapai. Terdapat pola tersendiri dalam kombinasi makanan yang serasi. Seperti sayur dapat dimakan bersamaan dengan makanan kelompok protein (Gunawan, 2001).

Kerusakan oksidatif yang terjadi di dalam tubuh secara *in vitro* dalam satu sel kira-kira terjadi 10.000 kali reaksi oksidasi dalam kurun waktu 24 jam. Hal ini membuktikan bahwa stres oksidatif sangat mengancam kehidupan manusia. Stres oksidatif hanya dapat dikendalikan oleh asupan antioksidan dari makanan, yang selanjutnya akan memacu kerja antioksidan dalam tubuh (Lampe, 1999; Winarsi, 2007).

Masing-masing jenis antioksidan memiliki sifat dan cara kerja yang tidak sama, namun masing-masing memiliki target yang berbeda, yaitu menekan atau menghambat reaktivitas radikal bebas. Seperti superoksida dismutase mengkatalisis reaksi dismutasi dari radikal superoksida menjadi  $H_2O_2$ , sedangkan katalase dan glutathion peroksidase mengubah  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$ . Oleh sebab itu, kesempurnaan kerja sistem enzim antioksidan sepenuhnya diperankan oleh tiga macam enzim tersebut. Namun yang perlu dipahami adalah, antioksidan seluler tidak dapat bekerja secara individual tanpa dukungan asupan antioksidan sekunder dari bahan pangan. Makin tinggi asupan antioksidan eksogenus, makin tinggi pula status antioksidan endogenus (Lampe, 1999). Jadi diperlukan konsumsi bahan makanan yang kaya akan komponen antioksidan dalam jumlah yang memadai, agar mampu menginduksi kerja enzim antioksidan dalam tubuh sehingga mampu menekan kerusakan sel yang berlebihan dan mempertahankan status antioksidan seluler.

Beta karoten memegang peranan penting dalam pembentukan protein, dibutuhkan dalam membran mitokondria dalam level optimum untuk dapat merangsang aliran energi yang efisien melalui mitokondria. Kebutuhan beta karoten dapat pula meningkat bila konsumsi protein kadar tinggi (Parakkasi, 1999). Ditegaskan pula bahwa lesitin pada tempe meningkatkan kadar karoten dalam hati, dan kandungan tiroid pada tempe meningkatkan daya guna beta karoten. Stimulasi tiroid dapat meningkatkan kebutuhan beta karoten (Parakkasi, 1999).

Ketersediaan beta karoten meningkat dengan kehadiran vitamin E dan antioksidan lain (Sunita, 2009). Berbagai penelitian menemukan bahwa tokoferol ( $\alpha$  atau  $\gamma$ ) melindungi beta karoten dari autooksidasi (Palozza dan Krinsky, 1992). Beta karoten memperkuat

potensi  $\alpha$ -tokoferol sebagai *scavenger* radikal peroksil. Beta karoten bereaksi dengan radikal peroksil membentuk radikal karotenoid peroksil, kemudian berubah menjadi karotenoid peroksida (Muchtadi, 2000). Ditegaskan oleh Murray *et al.* (2009) bahwa beta karoten merupakan antioksidan yang mempunyai peran dalam menangkap radikal bebas peroksil di dalam jaringan pada tekanan parsial oksigen yang rendah. Karena bersifat efektif pada konsentrasi oksigen rendah, beta karoten melengkapinya sifat antioksidan vitamin E yang efektif pada konsentrasi oksigen lebih tinggi.

Pada umumnya penggunaan beta karoten sebagai antioksidan berkombinasi dengan sumber antioksidan lain. Sebuah penelitian melibatkan subjek 29.000 kaum laki-laki Finia yang memiliki kebiasaan merokok. Mereka diberi beta karoten dan vitamin E (keduanya senyawa aktif) selama enam tahun. Dari percobaan tersebut tidak ditemukan kejadian penyakit kanker maupun kardiovaskuler (Winarsi, 2007). Vitamin E memberikan efek sinergis dengan beta karoten sebagai antioksidan di dalam tubuh, dapat membuat awet muda karena mampu mengatasi serangan radikal bebas, yang mempercepat ketuaan (Kohlmeier, 2003). Beta karoten berperan sebagai *sparing effect* vitamin E. Bila tekanan oksigen dalam tubuh tinggi, vitamin E diangkut darah melalui LDL dan HDL. Namun bila tekanan oksigen rendah, vitamin E digantikan oleh beta karoten.

Suplementasi beta karoten pada manusia ditingkatkan dari 0,58 menjadi 2,06  $\mu\text{mol}/100$  g sereal, ternyata penyerapan Fe meningkat. Mekanisme ini melibatkan pembentukan kompleks beta karoten dengan Fe yang dapat larut dalam lumen usus, kemudian mencegah efek penghambatan fitat dan polifenol pada absorpsi Fe (Garcia dan Casal, 1998; Kohlmeier, 2003). Kompleks beta karoten dengan Fe dalam mengkorvensi beta karoten menjadi retinol dapat menghambat Fe dalam mengkatalis reaksi oksidasi dalam pembentukan radikal bebas  $\text{OH}\bullet$  (Reaksi Fenton)(Winarsi, 2007). Konsentrasi beta karoten tinggi bisa menjadi prooksidan, dapat dimodifikasi oleh interaksi dengan nutrisi lainnya (Gaziano *et al.*, 1995). Zn merupakan bagian dari karbonik anhidrase yang berperan dalam pengeluaran amonia dan dalam produksi hidroklorida yang diperlukan dalam pencernaan beta karoten. (Murray, *et al.*, 2009; Sunita, 2009).

Wortel yang kaya dengan beta karoten, merupakan makanan pembentuk basa di dalam tubuh. Kunci kesehatan tubuh yang paling utama adalah menjaga kesehatan fungsi pencernaan. Fungsi pencernaan akan sehat bila asam basa tubuh seimbang. Keseimbangan asam basa jaringan dan darah manusia harus berada pada pH 7,3 – 7,5 agar tetap sehat dan berfungsi optimal. Oleh sebab itu tubuh memerlukan lebih banyak makanan pembentuk basa daripada makanan pembentuk asam. Porsi sayuran dan buah-buahan segar sebaiknya

menempati persentase 60-70 % dari seluruh menu satu hari. Dengan komposisi demikian, keseimbangan asam basa di dalam tubuh akan selalu terjaga (Gunawan, 2001). Dr. Robert O Young menyebutkan bahwa penyebab penyakit adalah karena darah dalam kondisi asam (Young, 2010). Apabila keasaman darah meningkat secara tidak seimbang, maka limpa, hati, jantung, ginjal dan sebagainya, yang kesemuanya merupakan organ pembersih darah, akan menderita beban yang terlalu besar. Akibatnya, karena bekerja terlalu berat membersihkan darah, semua organ itu berangsur menjadi lemah dan akhirnya tidak mampu bekerja sebagaimana mestinya (Sarkar, 2008).

Makanan yang dapat menurunkan keasaman tubuh atau membentuk efek basa mengandung lebih banyak mineral logam, seperti potasium/kalium (K), sodium/natrium (Na), magnesium (Mg), zat besi (Fe), dan kalsium (Ca). Semua jenis buah dan sayur-mayur (termasuk selada, umbi-umbian, dan sayuran rambat) adalah makanan pembentuk basa kecuali tomat (terutama yang masak) (Gunawan, 2001).

Kombinasi antioksidan dapat menetralkan radikal bebas, aktivitasnya penting dalam perlindungan dari beberapa penyakit, seperti aterosklerosis, kardiovaskular, saraf dan kanker (Johnson, 2002; Thumbeckaite, 2006). Beta karoten berinteraksi dengan protein dalam meningkatkan produksi antibodi, meningkatkan jumlah sel-sel pembunuh alami dan memperbanyak aktivitas sel-sel T *helpers* dan limposit (Budi, 2009). Interaksi beta karoten dengan kekurangan energi protein adalah kadar retinol serum akan menurun jika terdapat kekurangan energi protein (KEP). Keadaan ini disebabkan oleh gangguan sintesis RBP (*Retinol Binding Protein*; protein pengikat retinol), yang membuat protein tersebut tidak tersedia untuk mengangkut retinol (Gibney *et al.*, 2009). Kebutuhan beta karoten dapat pula meningkat bila konsumsi protein kadar tinggi (Parakkasi, 1999). Ditegaskan pula bahwa lesitin pada tempe meningkatkan kadar karoten dalam hati, dan kandungan tiroid pada tempe meningkatkan daya guna beta karoten. Stimulasi tiroid dapat meningkatkan kebutuhan beta karoten (Parakkasi, 1999).

Beta karoten adalah sumber vitamin A yang sebagian besar ada dalam tumbuhan, berinteraksi dan sinergi dengan vitamin E sebagai zat antioksidan yang tersedia cukup tinggi pada tempe *M-2*. Tingkat konversi beta karoten menjadi retinol sebagian tergantung pada hormon tiroid, Zn, Fe dan status vitamin E, zat-zat ini tersedia cukup tinggi pada tempe *M-2*) (Agung, 2002; Winarsi 2007).

Zn sebagai bagian berbagai enzim dehidrogenase, selain berperan dalam metabolisme tahap pertengahan, Zn berperan pula dalam metabolisme vitamin A. Retinal dehidrogenase di dalam retina yang mengandung Zn berperan dalam metabolisme pigmen visual yang

mengandung vitamin A. Disamping itu Zn diperlukan untuk sintesis alat angkut vitamin A protein pengikat retinol (*Retinol Binding protein /RBP*) di dalam hati (Sunita, 2009).

Ketersediaan beta karoten meningkat dengan kehadiran vitamin E dan antioksidan lain (Sunita, 2009). Berbagai penelitian menemukan bahwa tokoferol ( $\alpha$  atau  $\gamma$ ) melindungi beta karoten dari autooksidasi (Palozza dan Krinsk, 1992). Konsumsi protein dan Zn yang cukup dibutuhkan untuk produksi RBP secara normal. Oleh karena itu defisiensi Zn atau malnutrisi protein akan mengganggu fungsi vitamin A dengan jalan mencegah tingkat pembebasannya secara normal dari penyimpanannya dalam hati (Sunita, 2009).

Ditegaskan oleh Omaye dan Zhang (1998) dan Roche (2000) bahwa beta karoten dapat bertindak sebagai bahan tambahan dan sinergis dengan vitamin E untuk melindungi jaringan *in-vivo*, mungkin sebagian dengan perlindungan beta karoten oleh vitamin E (Handelman *et al.*, 1991; Winarsi, 2007). Beta karoten memperkuat potensi  $\alpha$ -tokoferol sebagai *scavenger* radikal peroksil. Beta karoten bereaksi dengan radikal peroksil membentuk radikal karotenoid peroksil, kemudian berubah menjadi karotenoid peroksida (Muchtadi, 2000). Ditegaskan oleh Murray *et al.* (2009) bahwa beta karoten merupakan antioksidan yang mempunyai peran dalam menangkap radikal bebas peroksil di dalam jaringan pada tekanan parsial oksigen yang rendah. Karena bersifat efektif pada konsentrasi oksigen rendah, beta karoten melengkapi sifat antioksidan vitamin E yang efektif pada konsentrasi oksigen lebih tinggi.

Zn merupakan bagian dari karbonik anhidrase yang berperan dalam pengeluaran amonia dan dalam produksi hidroklorida yang diperlukan dalam pencernaan beta karoten. Defisiensi Zn menyebabkan fungsi pencernaan terganggu, karena gangguan fungsi pankreas, gangguan pembentukan kilomikron, kerusakan permukaan saluran cerna, diare, gangguan laju metabolisme. dan gangguan fungsi kekebalan (Murray *et al.*, 2009; Sunita, 2009).

Beberapa mikronutrien yang terkandung dalam tempe seperti Fe dan Zn memiliki interaksi yang signifikan dalam bidang kesehatan masyarakat dengan vitamin A. Kekurangan vitamin A dapat mempengaruhi metabolisme Fe. Respon hemoglobin yang maksimal terjadi ketika defisiensi Fe dan vitamin A diperbaiki bersamaan. Defisiensi vitamin A terlihat mempengaruhi ketersediaan simpanan zat besi yang akan digunakan oleh jaringan *hematopoietik* (Murray *et al.*, 2009).

Antioksidan mempunyai mekanisme untuk menetralkan kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas. Mekanisme tersebut diperankan oleh jaringan antioksidan (*antioksidan network*) yang saling menopang dalam jaringan kerjasama antar antioksidan. Antioksidan dalam bekerjanya merupakan suatu *network* (Berg *et al.*, 2001; Block *et al.*, 2001).

Antioksidan yang satu berperan dalam daur ulang antioksidan yang lain sehingga tubuh senantiasa mempunyai cukup antioksidan yang siap siaga menetralkan senyawa-senyawa oksigen reaktif (Budi, 2009; Winarsi, 2007). Jadi diperlukan konsumsi bahan makanan yang kaya akan komponen antioksidan dalam jumlah yang memadai, agar mampu menginduksi kerja enzim antioksidan dalam tubuh sehingga mampu menekan kerusakan sel yang berlebihan dan mempertahankan status antioksidan seluler.

Akhir-akhir ini beberapa penelitian fungsi antioksidan vitamin A, E, dan C dalam mencegah kejadian atau angka kematian dari PJK memberikan hasil yang kurang memuaskan (Bagiada *et al.*, 2004). Miller (2007) menyebutkan bahwa jika diputuskan akan mengkonsumsi antioksidan dalam bentuk suplemen makanan, sebaiknya juga dipastikan bahwa suplemen makanan tersebut mengandung antioksidan seperti A, E, C dan Se dan dilengkapi dengan Omega-3 dan Omega-6 yang seimbang. Kombinasi tempe *M-2* dengan wortel mengandung antioksidan A, E, C, Se, Omega-3 dan Omega-6. (Mindell, 2008; Vallerie, 2009).

Seorang wanita berusia 50 tahun yang selalu berjalan kaki secara teratur dengan tingkat intensitas sebesar 4 km dalam 37,5 menit, empat sampai lima hari seminggu, harus mengkonsumsi antioksidan setiap hari dengan dosis sebagai berikut : 600 IU vitamin E; 1000 mg vitamin C dan 50.000 IU beta karoten (Cooper, 2001). Apakah mereka berolah raga atau tidak, wanita di atas 50 tahun harus mengkonsumsi vitamin E dan beta karoten lebih banyak dibandingkan dengan wanita yang lebih muda. Untuk kesehatan dan umur panjang dianjurkan mengkonsumsi : (1) vitamin E alami (*d-alpha tokoferol*) sebanyak 400 IU bagi mereka yang berusia 22 – 50 tahun; 600 IU bagi mereka yang berusia lebih dari 50 tahun. (2) beta karoten sebanyak 25.000 IU bagi mereka yang berusia 22 – 50 tahun; 50.000 IU bagi mereka yang berusia lebih dari 50 tahun.

## **2.9 pH Cairan Tubuh**

Banyak penyakit zaman sekarang menyerang manusia akibat tidak seimbangnya pH (derajat keasaman) cairan tubuh. Proses metabolisme yang berlangsung terus-menerus di dalam sel tubuh memerlukan lingkungan kimiawi tertentu, termasuk derajat keasamannya. pH normal cairan tubuh berkisar antara 7,35-7,45 (sedikit basa). Keseimbangan dalam kondisi sedikit basa tersebut senantiasa dipertahankan agar enzim-enzim yang berperan dalam proses metabolisme dapat bekerja optimal. Jika pH bergeser, maka kerja enzim terhambat, dalam jangka waktu tertentu, keadaan ini dapat menyebabkan timbulnya sakit dan penyakit (Farida dan Amalia, 2009; Rampisela, 2009). Keseimbangan asam dan basa tubuh

dapat menjadikan pencernaan berfungsi dengan baik dan tetap sehat, sehingga penyerapan zat-zat gizi dapat berlangsung dengan optimal, merupakan salah satu hal penentu keberhasilan suatu diet (Farida dan Amalia, 2009).

pH cairan tubuh bisa diketahui dari melakukan test terhadap derajat keasaman dan kebasaan dari air liur di lidah, dan juga dapat dilakukan test melalui air pipi (urin), serta dapat juga melakukan test irama nafas, jika bernafas panjang lebih dari 19 kali selama 40 detik maka pH cairan tubuh dalam keadaan asam. Sedangkan jika nafas kita teratur dan pelan maka keadaan cairan tubuh adalah basa (Rampisela, 2009).

Nilai normal pH darah pria maupun wanita pada arteri (7,37-7,44) dan vena (7,35-7,45) (Kosasih dan Kosasih, 2008; Murray *et al.*, 2003). Hasil pengukuran pH darah penting untuk mendiagnosis penyakit jantung, paru-paru dan metabolisme (Gunawan, 2001).

pH darah dapat diukur *A Solvent Polymeric Membrane Electrode in Comparison with a Glass Electrode* (Anker *et al.*, 1983). Pengambilan contoh darah untuk penentuan pH darah, adalah darah arteri (pilihan utama), darah vena, darah kapiler. Paling baik menggunakan *semprit gelas*, menyusul *semprit plastik*. Pungsi arteri untuk pengambilan darah dilakukan oleh dokter yang terlatih dan hanya dapat diwakilkan kepada petugas paramedic apabila yang bersangkutan telah mendapat latihan khusus untuk pengambilan darah arteri. Sebaiknya darah diambil dari *arteria radialis* atau *arteria brachialis*. Pungsi arteria femoralis lebih sering memberikan trombosis sebagai penyulit. Antikoagulan seperti heparin, sitrat, oksalat, dan EDTA mengganggu penentuan pH. Sebelum pengambilan darah kapiler, kapiler setempat dipanaskan (45<sup>0</sup>C) dan atau *dimassage*. Sebaiknya contoh darah diambil setelah istirahat selama 30 menit dan setelah puasa. Penyimpanan dan pengiriman contoh darah dihindarkan dari kontaminasi udara. Es batu dapat digunakan untuk menstabilkan suhu sampel selama 2 jam. Setelah 3 jam hasil test mungkin tidak dapat dipercaya (Kosasih dan Kosasih, 2008).

Ditegaskan oleh Reagan *et al.* (2007) bahwa kondisi basa pH urine tikus adalah pada lebih besar atau sama dengan pH 7,5 sedangkan kondisi asam pH urine tikus adalah pada lebih kecil atau sama dengan pH 7. Cara pemeriksaan pH urine dengan pH *Indicator Strips* merupakan penentuan pH urine yang mudah, cepat dan tepat (Kosasih dan Kosasih, 2008). Makanan vegetarian dan makanan yang mengandung lemak *polyunsaturated* merupakan makanan pembentuk basa tubuh. Apabila pH urine sudah normal, untuk monitor kenormalan pH urine selanjutnya adalah pada dua belas minggu kemudian, dan monitor pH urine tiga minggu sekali apabila kondisi pH urine belum normal (Young, 2006).

Walaupun saat metabolisme sel, selalu terbentuk produksi asam yang akan dilepaskan ke dalam darah, pH tubuh selalu dipertahankan normal. Hal ini penting karena semua enzim yang terlibat dalam aktivitas metabolisme dalam tubuh tergantung pada pH. Faktor-faktor yang berperan dalam mempertahankan pH darah konstan adalah buffer darah, pertukaran gas dalam paru dan mekanisme ekskresi ginjal. Beberapa buffer dalam darah antara lain : ion bikarbonat, fosfat inorganik ( $H_2PO_4$ ) dan proteinat (protein plasma yang menjadi buffer, termasuk albumin dan Hb). Menurut definisi Bronsted, asam adalah substansi yang di dalam larutan akan melepaskan ion H (donor proton), sedangkan basa adalah substansi yang mampu mengikat ion H (akseptor proton) (Murray *et al.*, 2003).

## 2.10 Keunggulan Tempe M-2

Kedelai varietas Wilis (Kusamba, Klungkung, Bali), bahan baku tempe M-2, menjadikan tempe M-2 berasa lebih enak dan gurih dikonsumsi segar, dibanding tempe yang ada di pasaran, yang berbahan baku kedelai impor. Disamping itu tempe M-2 mengandung gizi dan nirgizi yang bermanfaat bagi kesehatan lebih tinggi daripada tempe biasa (Agung, 2002).

Perebusan kedelai dalam pembuatan tempe M-2 dilaksanakan dua kali, hal ini dapat meningkatkan nilai cerna, gizi, nirgizi dan sensoris (Agung, 2002), sesuai dengan penelitian dari Karmini (1997) bahwa perebusan yang ideal dalam pembuatan tempe dilakukan sebanyak dua kali dengan tujuan akhir memaksimalkan jumlah isoflavon tempe, meningkat 58,7% daripada sekali perebusan. Perebusan dua kali dalam pembuatan tempe M-2 menghasilkan tempe lebih bersih, lebih lama daya simpan dan rasanya lebih enak.

Kandungan protein kedelai dan tempe hampir sama, namun melalui proses fermentasi, terjadi peningkatan asam amino bebas sebesar  $\pm 35$  kali (Kiers, 2001). Asam amino tertinggi pada tempe setelah fermentasi adalah arginin. Penelitian Ghozali (2008) menunjukkan bahwa asam amino arginin tempe mengalami kenaikan dibanding kedelai, dengan rata-rata peningkatan sebesar 68,8%. Tingginya rasio arginin/lisin dihubungkan dengan tingginya konsentrasi serum glukagon (Torres *et al.*, 2006), yang berperan dalam homeostatis lipid. Sisa protein yang tidak dapat dicerna yaitu peptida hidrofobi akan mengikat asam empedu dan kolesterol dalam lumen usus menyebabkan penurunan absorpsi kolesterol (Utari, 2011).

Tempe mengandung dua tipe protein yaitu globulin 11 S (glycinin) dan 7 S ( $\beta$ -conglycinin). Protein 11 S (glycinin) punya peran sebagai antioksidan (Torres *et al.*, 2006). Protein 7 S ( $\beta$ -conglycinin) dilaporkan dapat menurunkan akumulasi kolesterol dalam aorta, sehingga dapat mencegah PJK.

Proses fermentasi pada pembuatan tempe menyebabkan peningkatan asam amino, asam lemak dan isoflavon total tempe, jauh lebih tinggi dibanding kedelai (Utari, 2011). Isoflavon memberikan efek hipokolesterol melalui kemampuannya dapat mengatur aktivitas reseptor LDL. Isoflavon meningkatkan aktivitas enzim SOD diduga karena induksi gen yang bertanggungjawab pada sintesis enzim antioksidan (Suarsana, 2009). Ditegaskan pula bahwa kultur sel yang diberikan genistein dapat meningkatkan ekspresi MnSOD yang kemungkinan melalui mekanisme interaksi genistein dengan reseptor estrogen. Dari berbagai makanan, yang paling banyak mengandung isoflavon adalah tempe (Winarsi, 2007).

Enzim lipase tempe melarutkan sebagian lemak kedelai, meningkat 30% atau 50-70 kali asam lemak bebas dibanding bentuk kedelai. Peningkatan asam lemak ini dapat meningkatkan daya cerna tempe. Asam lemak yang dominan adalah asam linoleat, disusul asam oleat, asam linolenat dan asam palmitat, yang semuanya tergolong asam lemak tidak jenuh rantai panjang dan jumlahnya sekitar 80% dari total asam lemak, Asam lemak linoleat (omega-3) tergolong esensial yaitu tidak dapat disintesa di dalam tubuh sehingga harus diperoleh dari konsumsi makanan (Ghozali, 2008; Utari, 2011).

Minyak yang berasal dari tempe mempunyai daya tahan yang kuat terhadap peroksidasi lemak saat penyimpanan dalam suhu kamar, bahkan tidak berubah saat penyimpanan dalam suhu kamar, bahkan tidak berubah kadarnya ketika disimpan sekitar dua tahun, hal ini berbeda dengan minyak dari kedelai yang cenderung rentan terhadap peroksida saat penyimpanan (Utari, 2011).

Asam oleat mempunyai kemampuan untuk meningkatkan HDL yang merupakan lemak yang dapat menurunkan resiko PJK, sehingga asam oleat juga sering diklaim untuk mencegah penyakit jantung (Mann dan Stewart, 2007). Begitu juga dengan asam linoleat pada tempe bersifat meningkatkan kadar HDL dan menurunkan LDL.

Asam linoleat dan asam linolenat tidak hanya dibutuhkan untuk semua membran sel tetapi juga mengalami elengasi dan denaturasi menjadi rantai lebih panjang dan merupakan prekursor komponen eicosanoid yang menyerupai hormon, prostaglandin dan leukotrienes. Asam linoleat akan dikonversi menjadi asam arakhidonat, sedangkan asam linolenat akan dikonversi menjadi *eicosapentaenoic acid* (EPA) dan *docosahexosenoic acid* (DHA) (Mann dan Stewart, 2007). EPA dan DHA dapat mencegah timbulnya platelet darah. Platelet dalam darah ini dalam jumlah besar akan mengganggu aliran darah dan merupakan faktor utama penyebab serangan jantung dan stroke. EPA dan DHA juga dapat memperbaiki trigliserida darah pada individu dengan hipertrigliserida (Utari, 2011).

Asam linolenat merupakan ketiga terbanyak dalam tempe, lebih efektif menurunkan trigliserida darah dibanding asam linoleat. Namun harus diwaspadai karena jika dikonsumsi terlalu banyak pada individu yang kadar LDLnya tinggi justru akan semakin meningkatkan kadar LDL serta menurunkan kadar HDL (Mann dan Stewart, 2007). Keunggulan dari tempe adalah karena asam linolenat bukan asam lemak bebas utama, sehingga lebih leluasa untuk dikonsumsi dalam jumlah banyak khususnya pada orang dengan dislipidemia tanpa mengurangi manfaatnya. Peran lain dari asam linoleat dan asam linolenat adalah : (1) untuk kekuatan membran sel, (2) untuk membantu transport dan metabolisme kolesterol sehingga dapat menurunkan kadar kolesterol darah, (3) mengatur produksi enzim, yang dibutuhkan untuk sintesa asam lemak non esensial dalam hati, (4) meningkatkan imunitas dan mencegah kerentanan terhadap infeksi, merupakan prekursor komponen aktif prostaglandin yang dibutuhkan dalam semua jaringan tubuh dan aktivitasnya mempengaruhi tekanan darah, pembekuan darah dan fungsi jantung (Schlenker dan Sara, 2007).

Kandungan serat pada tempe meningkat tujuh kali dibanding pada kedelai, oleh karena pertumbuhan miselium *Rhizopus*. Dalam serat juga terkandung saponin yang mampu menghambat penyerapan kolesterol (Ghozali, 2009).

Kapang tempe dapat menghasilkan enzim fitase yang akan menguraikan asam fitat (yang mengikat beberapa mineral) menjadi fosfor dan inositol. Dengan terurainya asam fitat, mineral-mineral tertentu seperti besi, kalsium, magnesium, dan seng menjadi lebih tersedia untuk dimanfaatkan tubuh. Ditegaskan oleh Astuti (1996) yang menguji distribusi Fe, Cu dan Zn pada sel tikus dan ternyata mineral tersebut jauh lebih tinggi pada tikus yang diberi tempe dibanding yang diberi kasein atau kedelai.

Tempe mengandung cukup tinggi vitamin B<sub>12</sub>, yang berkorelasi negatif dengan homosistein serum, kadar homosistein memicu peningkatan hidrogen peroksida sehingga menimbulkan resiko kerusakan sel endotel dan timbulnya platelet pada pembuluh darah yang akan mengakibatkan stroke atau PJK (Utari, 2011).

Dibandingkan dengan kedelai sebagai bahan bakunya, tempe mempunyai beberapa keunggulan dalam mutu gizi. Proses fermentasi selain menjadikan nilai gizi tempe meningkat, menghilangkan bau langu yang terdapat dalam kedelai menjadi aroma khas tempe. Tempe mempunyai tekstur seluler yang unik sehingga mudah dicerna dan diserap. Disamping itu tempe juga mempunyai kandungan zat berkhasiat antibiotik dan stimulasi pertumbuhan. Enzim fitase yang dihasilkan oleh kapang akan menguraikan asam fitat, membebaskan fosfor dan biotin sehingga dapat dimanfaatkan tubuh. Penyerapan mineral yang tadinya terganggu oleh adanya asam fitat menjadi lebih baik (Ridwan, 1997).

## BAB 3

### TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

#### 3.1 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

- (1). Mengkaji normometabolik *food combining* tempe *M-2* dengan wortel dalam meningkatkan pH pada aterosklerosis dislipidemia.
- (2). Mengkaji normometabolik *food combining* tempe *M-2* dengan wortel dalam meningkatkan Kapasitas Antioksidan Total pada aterosklerosis dislipidemia.
- (3). Mengkaji normometabolik *food combining* tempe *M-2* dengan wortel dalam menurunkan kadar IL-6 pada aterosklerosis dislipidemik.

#### 3.2 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber informasi ilmiah yang baru mengenai :

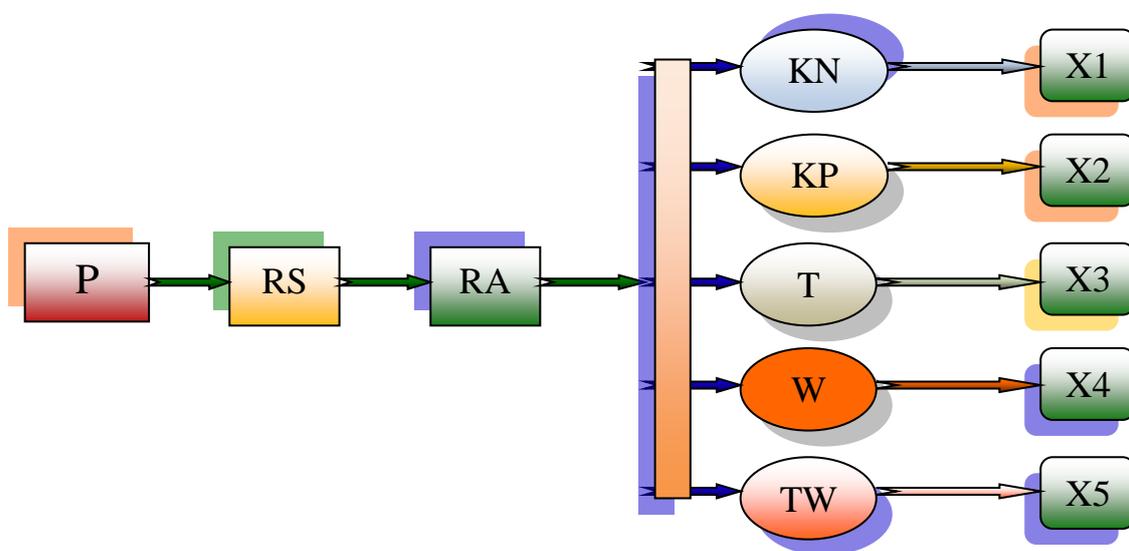
- (1) Potensi normometabolik *food combining* tempe *M-2* dengan wortel sebagai sumber antioksidan yang kuat dan lengkap,
- (2) Kemampuan *food combining* tempe *M-2* dengan wortel dalam menormometabolik aktivitas pH, Kapasitas Antioksidan Total dan IL-6, dalam penanggulangan aterosklerosis dislipidemia dengan mudah, murah dan terjangkau masyarakat luas.

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimen sungguhan (*true experimental*) dengan rancangan *The Randomized Post-test Only Control Group Design* dan Rancangan Acak Lengkap pola Faktorial (Leedy,1974). Bagan rancangan dapat dilihat pada Gambar 4.1. Pada penelitian ini juga dilaksanakan penelitian deskriptif untuk mengetahui perubahan pH urine.



Gambar 4 .1  
Rancangan Penelitian

Keterangan :

- P : Populasi sampel
- RS : Random sampling
- RA : Random alokasi
- KN : Kontrol negatif, pemberian makanan standar/pellet (50 g/kg bb/hari)
- KP : Kontrol positif, pemberian minyak babi : pellet (1: 9) (50 g/kg bb/hari)
- T : Pemberian minyak babi : pellet (1: 9), serta tempe *M-2* (20 g/kg bb/hari)
- W : Pemberian minyak babi : pellet (1: 9), serta wortel (20 g/kg bb/hari)
- TW : Pemberian minyak babi : pellet (1: 9), serta tempe *M-2* (20 g/kg bb/hari), dan wortel (20 g/kg bb/hari)
- X1 : rata-rata kadar TAC, dan IL-6 pada KN
- X2 : rata-rata kadar TAC, dan IL-6 pada KP
- X3 : rata-rata kadar TAC, dan IL-6 pada T
- X4 : rata-rata kadar TAC, dan IL-6 pada W
- X5 : rata-rata kadar TAC, dan IL-6 pada TW

## **4.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan (UPHP) Laboratorium Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana, untuk perlakuan dengan hewan percobaan, kemudian dilanjutkan dengan analisis HDL, LDL, TAC, IL-6, pH urine dilakukan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana. Waktu penelitian dilakukan bulan Desember 2011 sampai bulan Oktober 2012.

## **4.3 Populasi dan Sampel**

### **4.3.1 Populasi**

1. Populasi target pada penelitian eksperimental adalah seluruh tikus putih jantan Wistar aterosklerosis dislipidemia.
2. Populasi terjangkau adalah meliputi tikus putih jantan Wistar aterosklerosis dislipidemia, dengan berat badan 250 g sampai dengan 300 g, berumur tujuh bulan sampai dengan tujuh setengah bulan.

### **4.3.2 Sampel**

1. Kriteria inklusi sampel adalah tikus putih jantan Wistar berumur dua bulan, dengan berat badan 250 g sampai dengan 300 g, sehat, tidak cacat fisik serta makan dan minum dengan normal.
2. Kriteria eksklusi sampel adalah tikus putih jantan Wistar dengan kondisi sakit.
3. Kriteria drop out sampel adalah selama penelitian tikus putih jantan Wistar mati.

### **4.3.3 Besaran Sampel**

Besaran sampel adalah jumlah sampel yang akan dipakai dalam penelitian mengikuti prosedur yang dilakukan oleh Federer (1963 dalam Rochiman, 1989) yaitu dihitung berdasarkan rumus :  $(t - 1)(r - 1) \geq 15$

Keterangan : t : banyaknya perlakuan; r : ulangan

Dalam penelitian ini  $t = 5$ , sehingga menjadi:  $(5-1)(r-1) \geq 15$ , dengan memakai rumus tersebut diperoleh  $r = 4,75$ , sehingga dalam penelitian ini jumlah sampel minimal yang digunakan adalah  $5 \times 5 = 25$  ekor tikus.

## **4.4. Variabel**

### **4.4.1 Identifikasi dan Klasifikasi Variabel**

#### **(1) Variabel Bebas**

Dalam penelitian ini yang menjadi variabel bebas adalah : pemberian makanan standar/pellet (50 g/kg bb/hari); pemberian makanan aterogenik (minyak babi : pellet (1:

9)); pemberian makanan aterogenik (minyak babi : pellet (1: 9)) serta tempe *M-2*(20 g/kg bb/hari); pemberian makanan aterogenik (minyak babi (1: 9)) serta wortel (20 g/kg bb/hari); pemberian makanan minyak babi : pellet (1: 9), serta kombinasi tempe *M-2* (20 g/kg bb/hari) dan wortel (20 g/kg bb/hari) pada tikus aterosklerosis dislipidemia.

## **(2) Variabel Tergantung**

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar TAC serum, dan IL-6 plasma.

## **(3) Variabel Kendali**

Variabel kendali adalah variabel yang dikendalikan, meliputi jenis tikus, jenis kelamin tikus, kesehatan fisik tikus, umur tikus, berat badan, makanan dan minuman. Faktor yang lain seperti jenis dan ukuran kandang, waktu pemberian makan, dan lingkungan kandang juga diseragamkan.

### **4.4.2 Definisi Operasional Variabel**

Untuk keseragaman penelitian, maka variabel penelitian ini perlu didefinisikan sebagai berikut :

1. Tempe *M-2* : tempe modifikasi yang dihasilkan dari proses pembuatan tempe kedelai lokal varietas Wilis (dari petani Kusamba, Klungkung), yang pada saat perebusan I kacang kedelai, kedelai dengan air rebusan ditambah asam laktat (teknis) 1 % (v/v) kemudian direbus selama 30 menit, didinginkan 30 menit, setelah itu dibersihkan kulit luar dan kulit arinya dan dicuci bersih. Kemudian direbus lagi (perebusan II) seperti perlakuan perebusan I selama 30 menit. Setelah itu ditiriskan, didinginkan, dan terakhir dilaksanakan inokulasi dengan menggunakan inokulum *Rhizopus oligosporus* dan *Rhizopus oryzae* dengan perbandingan 2 : 1, sejumlah 3 g/kg kedelai, dan difermentasi selama 48 jam.
2. Wortel adalah wortel varietas lokal dari perkebunan wortel di daerah Pupuan Tabanan.
3. Kapasitas Antioksidan Total adalah kadar total antioksidan yang terkandung dalam darah tikus Wistar. Pemeriksaan ini dilakukan dengan metode Elisa (Biovision, 2012).
4. Interleukin-6 adalah kadar Interleukin-6 plasma darah tikus Wistar. Pemeriksaan dilakukan dengan metode Elisa (Biovision, 2012).
5. pH urine adalah nilai pH urine tikus Wistar. Pemeriksaan dilakukan dengan pH-Indicator Strips (pH 0-14), *Universal Indicator*, merk KgaA 64271 Demstadt, Germany.
6. Umur tikus adalah umur tikus yang dihitung berdasarkan tanggal, bulan, dan tahun kelahiran yang sama.
7. Keseragaman pakan standar adalah makanan standar dari pakan standar Merk yang sama yaitu *Confeed Pars Pellet* (Arjuna, 2003).

8. Pakan aterogenik adalah pakan tinggi kolesterol (makanan yang terdiri atas campuran 1% otak babi kering, 5% kuning telur ayam matang, 10% lemak babi, 1% minyak kelapa, dan 83% makanan standar (Julyasih, 2011) yang diberikan sampai umur tikus tujuh bulan. Untuk mempercepat proses aterosklerosis tikus diberikan injeksi inisial adrenalin 0.006 mg/200 g bb sekali, dan dilanjutkan dengan pemberian (dengan *zonde*) diet kuning telur mentah 5 g/200 g bb/hari selama seminggu (Prasetyo, 2003). Pemberian pakan aterogenik dalam penelitian (50 g/kg bb/hari) adalah campuran minyak babi dengan pellet pakan standar (1 : 9) (Prasetyo, 2003; Wahyuni, 2011).
9. Air minum yang dipakai adalah air minum isi ulang.
10. HDL adalah kadar kolesterol-HDL tikus yang dihitung dengan metode Elisa untuk kadarnya dalam serum (Biovision, 2012).
11. Aterosklerosis adalah kelainan metabolisme lipid yang ditandai dengan penurunan HDL, sebesar minimal dua kali kadar HDL tikus normal (Prasetyo *et al.*, 2003).

#### **4.5. Bahan dan Alat Penelitian**

##### **4.5.1 Bahan penelitian**

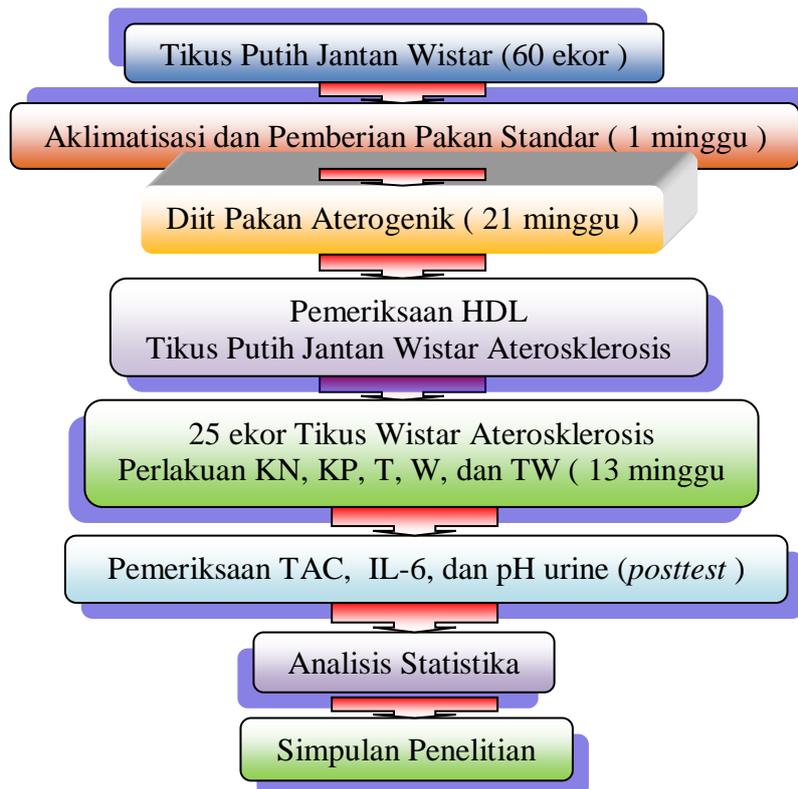
Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah tempe *M-2*, wortel, pakan standar, minyak babi, adrenalin, kuning telur dan Kit, serta bahan lain untuk pemeriksaan L, HDL, TAC, dan IL-6.

##### **4.5.2 Alat Penelitian**

Alat yang digunakan adalah alat suntik, timbangan hewan, timbangan analitik, zonde tikus, pipet kapiler, hematokrik, Elisa, *microtube*, *micropipette*, *sentrifuge*, *vortex*, *well plate*, dan alat bedah tikus.

#### **4.6 Prosedur penelitian**

Untuk lebih mempermudah dalam pelaksanaan penelitian maka dibuat alur penelitian yang ditunjukkan dengan bagan alur penelitian pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2

Bagan Alur Penelitian

Keterangan :

HDL : *High Density Lipoprotein*

KN : Kontrol negatif, pemberian makanan standar/pellet (50 g/kg bb/hari)

KP : Kontrol positif, pemberian minyak babi : pellet (1: 9)

T : Pemberian minyak babi : pellet (1: 9), serta tempe *M-2* (20 g/kg bb/hari)

W : Pemberian minyak babi : pellet (1: 9), serta wortel (20 g/kg bb/hari)

TW : Pemberian minyak babi : pellet (1: 9), serta tempe *M-2* (20 g/kg bb/hari), dan wortel (20 g/kg bb/hari)

#### 4.7 Analisis Statistik

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini selanjutnya dianalisis dengan SPSS 19 for Windows (Trihendradi, 2011) dan (Permana, 2007) sebagai berikut :

1. **Analisis deskriptif.** Data ditabulasi dan dihitung rerata pH, kadar TAC, dan Interleukin-6 pada kelompok kontrol dan kelompok eksperimen sesudah perlakuan, dengan SPSS 19 (Trihendradi, 2011).
2. **Uji komparabilitas.** Uji ini dilakukan untuk membandingkan rerata data *posttest* (kadar TAC dan Interleukin-6). Uji komparabilitas yang dipakai adalah *Simple Factorial Anova* dengan Excel 2007 (Permana, 2007).
3. Apabila terdapat perbedaan bermakna di antara perlakuan pada uji anova, maka dilanjutkan dengan : *Multiple Comparison t-test Independent*.

## BAB 5

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 5.1 Hasil Penelitian

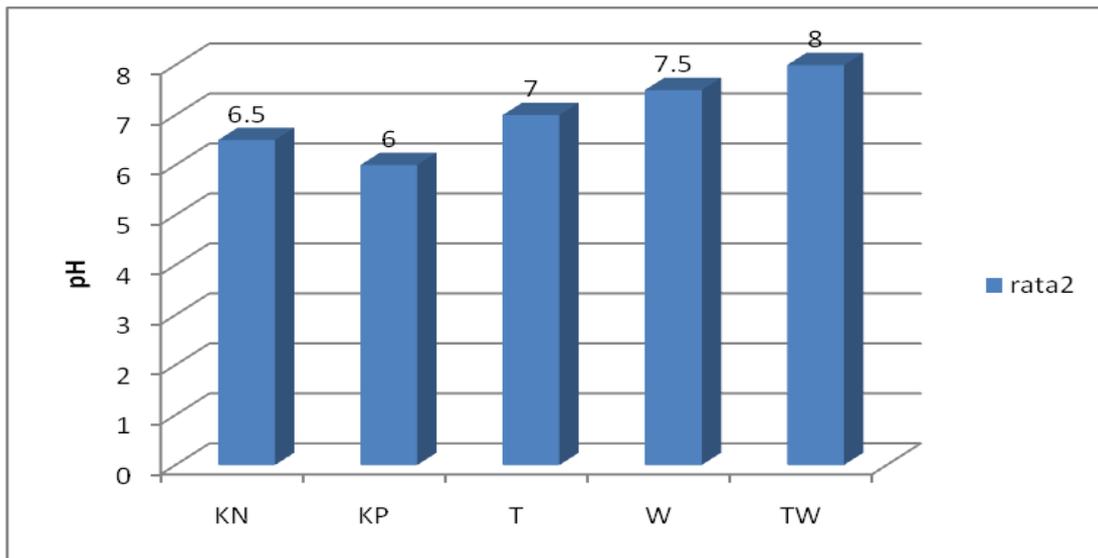
Setelah mendapatkan data hasil penelitian, selanjutnya melakukan uji deskriptif, uji normalitas *Kolmogorov-Smirnov* maupun *Shapiro-Wilk* dengan SPSS 19 (Trihendradi, 2011). Uji normalitas data bertujuan untuk membuktikan distribusi data dalam suatu variabel yang akan digunakan dalam penelitian. Data yang baik dan layak untuk membuktikan model-model penelitian adalah data yang memiliki distribusi normal. Hasil uji normalitas *Kolmogorov-Smirnov* maupun *Shapiro-Wilk* semua data hasil penelitian menunjukkan nilai  $p > \alpha$ , berarti semua data berdistribusi normal, ditampilkan pada Lampiran 1.

Selanjutnya, melakukan uji homogenitas *Levene's test*. Uji homogenitas membuktikan varian antar kelompok adalah sama. Data yang baik dan layak untuk membuktikan model-model penelitian adalah data yang memiliki varian yang homogen. Hasil uji homogenitas varian untuk semua kelompok penelitian menunjukkan varian antar kelompok adalah sama ( $p > \alpha$ ), ditampilkan pada Lampiran 1.

##### 5.1.1 Pemeriksaan Kenormalan pH Urine Tikus Wistar

Pemeriksaan kenormalan pH urine tikus Wistar dengan menggunakan alat pH *Indicator Strips*, dan dengan ketentuan sebagai berikut : (1) katagori 1 adalah pH urine normal ( $pH \geq 7$ ), dan (2) katagori 2 adalah pH urine tidak normal ( $pH < 7$ ).

Hasil pemeriksaan kenormalan pH urine tikus Wistar yang termasuk katagori 1 adalah pada perlakuan TW (perlakuan pakan aterogenik dengan *food combining* tempe *M-2* dengan wortel) dengan hasil rata-rata pH urine sebesar 8, pada perlakuan T (perlakuan pakan aterogenik dengan tempe *M-2*) dengan hasil rata-rata pH sebesar 7, dan pada perlakuan W (perlakuan pakan aterogenik dengan wortel) dengan hasil rata-rata pH sebesar 7,5. Hasil pemeriksaan kenormalan pH urine tikus Wistar termasuk katagori 2 adalah pada perlakuan KN (perlakuan kontrol negatif/perlakuan pakan standar) dengan hasil rata-rata pH sebesar 6,5, dan pada perlakuan KP (perlakuan kontrol positif/ perlakuan pakan aterogenik) dengan hasil rata-rata pH sebesar 6, dan disajikan pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1

pH Urine Tikus Wistar pada Perlakuan KN, KP, T, W dan TW.

Keterangan :

KN : Kontrol negatif, pemberian makanan standar/pellet (50 g/kg bb/hari)

KP : Kontrol positif, pemberian minyak babi : pellet (1: 9) (50 g/kg bb/hari)

T : Pemberian minyak babi : pellet (1: 9), serta tempe *M-2* (20 g/kg bb/hari)

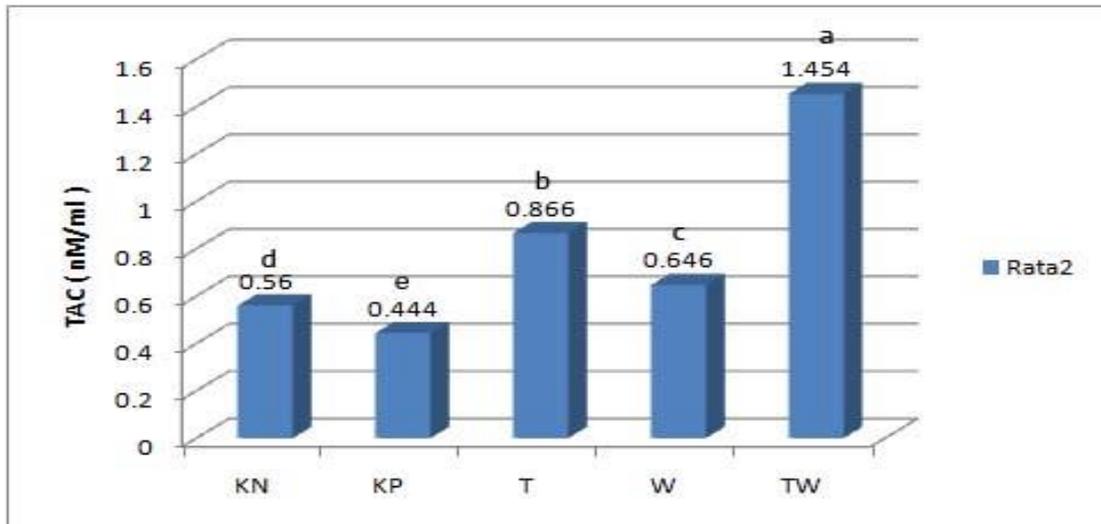
W : Pemberian minyak babi : pellet (1: 9), serta wortel (20 g/kg bb/hari)

TW : Pemberian minyak babi : pellet (1: 9), serta *food combining* tempe *M-2* (20 g/kg bb/hari), dengan wortel (20 g/kg bb/hari)

### 5.1.2 Kadar Kapasitas Antioksidan Total (TAC) serum Tikus Wistar.

Rata-rata kadar TAC serum tertinggi terdapat pada *food combining* tempe *M-2* dengan wortel (TW) yaitu  $1,454 \pm 0,01$  nM/mL, kemudian pada perlakuan pakan aterogenik dengan tempe *M-2* yaitu  $0,866 \pm 0,04$  nM/mL, kemudian pada perlakuan pakan aterogenik dengan wortel yaitu  $0,646 \pm 0,02$  nM/mL, kemudian pada perlakuan kontrol negatif dengan pakan standar yaitu  $0,560 \pm 0,02$  nM/mL, dan terendah pada kontrol positif dengan pakan aterogenik yaitu  $0,444 \pm 0,03$  nM/mL, disajikan pada Gambar 5.2.

Analisis keragaman kadar TAC serum menggunakan uji Anova dengan Excel 2007 (Permana, 2007). Hasil analisis keragaman kadar TAC serum tikus Wistar menunjukkan perbedaan sangat bermakna ( $p < 0,01$ ) pada berbagai perlakuan, *food combining* tempe *M-2* dengan wortel menunjukkan pengaruh interaksi yang sangat bermakna ( $p < 0,01$ ), disajikan pada Tabel 5.1.



Gambar 5.2  
Kadar TAC serum Tikus Wistar pada Perlakuan KN, KP, T, W dan TW.

Keterangan :

- KN : Kontrol negatif, pemberian makanan standar/pellet (50 g/kg bb/hari)
- KP : Kontrol positif, pemberian minyak babi : pellet (1: 9) (50 g/kg bb/hari)
- T : Pemberian minyak babi : pellet (1: 9), serta tempe *M-2* (20 g/kg bb/hari)
- W : Pemberian minyak babi : pellet (1: 9), serta wortel (20 g/kg bb/hari)
- TW : Pemberian minyak babi : pellet (1: 9), serta *food combining* tempe *M-2* (20 g/kg bb/hari), dengan wortel (20 g/kg bb/hari)

Rata-rata TAC dengan huruf yang tidak sama berbeda nyata pada taraf 1%.

Pada perlakuan *food combining* tempe *M-2* dengan wortel disebutkan hipotesis pada pengamatan kadar TAC sebagai berikut :

1. Kadar TAC serum tikus Wistar aterosklerosis diberikan diet aterogenik dan food combining tempe *M-2* dengan wortel (TW) lebih tinggi dibandingkan dengan yang diberikan pakan standar (KN/Kontrol Negatif), dengan yang diberikan diet aterogenik tanpa tempe *M-2* maupun wortel (KP).
2. Kadar TAC serum tikus Wistar aterosklerosis diberikan diet aterogenik dan food combining tempe *M-2* dengan wortel (TW) lebih tinggi dibandingkan dengan yang diberikan diet aterogenik dengan tempe *M-2* (T).
3. Kadar TAC serum tikus Wistar aterosklerosis diberikan diet aterogenik dan food combining tempe *M-2* dengan wortel (TW) lebih tinggi dibandingkan dengan yang diberikan diet aterogenik dengan wortel (W).
4. Ada pengaruh interaksi antara perlakuan tempe *M-2* dengan wortel (TW) terhadap kadar TAC serum tikus Wistar aterosklerosis.

**Tabel 5.1**  
**Analisis Keragaman Kadar TAC serum Tikus Wistar Diberikan Diet Aterogenik dan**  
***Food Combining* Tempe M-2 dengan Wortel**

Sumber Keragaman	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F. Hitung	Sig	P	F. Tabel	
							5%	1%
Ulangan	4	0.00412	0.00103	2.070352	NS	0.133	3.01	4.77
Perlakuan	4	3.19972	0.79993	1607.899	**	0.000	3.01	4.77
KN Vs KP	1	0.34223	0.34223	687.8894	**	0.000	4.49	8.53
Perlk TW	3	2.8575	0.9525	1914.57	**	0.000	3.24	5.29
T	1	1.89113	1.89113	3801.256	**	0.000	4.49	8.53
W	1	0.78012	0.78012	1568.09	**	0.000	4.49	8.53
TxW	1	0.18625	0.18625	374.3618	**	0.000	4.49	8.53
Galat	16	0.00796	0.0005					
Total	24	3.2118	0.13383	-				

KK= 2.81%

Keterangan : \*\* berbeda sangat bermakna ( $p < 0,01$ )

NS berbeda tidak bermakna ( $p > 0,05$ )

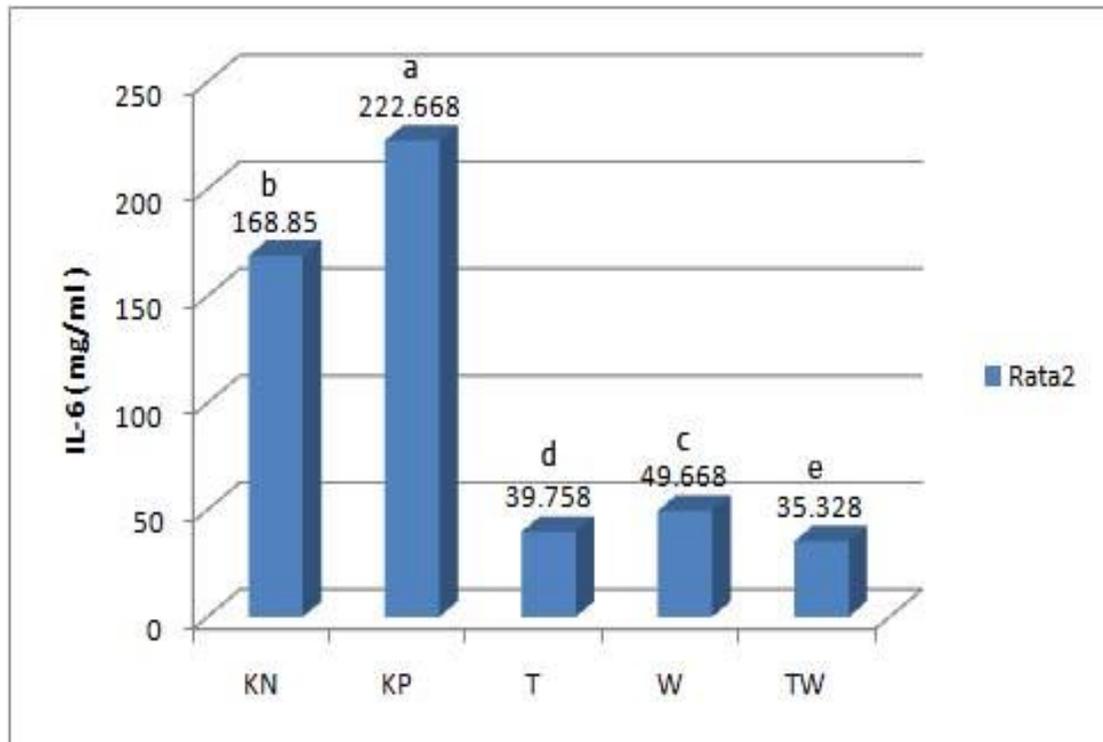
Jadi dari Gambar 5.2 dan Tabel 5.1 dapat disimpulkan bahwa :

1. Rata-rata kadar TAC perlakuan *food combining* tempe M-2 dengan wortel menunjukkan nilai yang paling tinggi dan menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ( $p < 0,01$ ) dibandingkan dengan perlakuan KN, KP, T maupun W.
2. *Food combining* tempe M-2 dengan wortel dapat meningkatkan kadar TAC secara sangat bermakna ( $p < 0,01$ ).
3. Ada pengaruh interaksi yang sangat bermakna ( $p < 0,01$ ) antara perlakuan tempe M-2 dengan wortel terhadap kadar TAC serum tikus Wistar aterosklerosis
4. Hal ini membuktikan kebenaran hipotesis 1, hipotesis 2, hipotesis 3 dan hipotesis 4 pada pengamatan kadar TAC.

### 5.1.3 Kadar IL-6 plasma Tikus Wistar.

Rata-rata kadar IL-6 plasma tikus terendah pada perlakuan pakan aterogenik dan *food combining* tempe M-2 dengan wortel (TW) yaitu  $35,328 \pm 1,000$  pg/dl, pada perlakuan pakan

aterogenik dengan tempe *M-2* (T) yaitu  $39,758 \pm 1,64$  pg/dl, pada perlakuan pakan aterogenik dengan wortel yaitu  $49,668 \pm 1,440$  pg/dl, pada perlakuan pakan standar (kontrol negatif) yaitu,  $168,85 \pm 11,29$  pg/mL, tertinggi pada perlakuan pakan aterogenik (kontrol positif) yaitu  $222,668 \pm 10,56$  pg/mL, dan disajikan pada Gambar 5.3.



Gambar 5.3

Kadar IL-6 serum Tikus Wistar pada Perlakuan KN, KP, T, W dan TW.

Keterangan :

- KN : Kontrol negatif, pemberian makanan standar/pellet (50 g/kg bb/hari)
- KP : Kontrol positif, pemberian minyak babi : pellet (1: 9) (50 g/kg bb/hari)
- T : Pemberian minyak babi : pellet (1: 9), serta tempe *M-2* (20 g/kg bb/hari)
- W : Pemberian minyak babi : pellet (1: 9), serta wortel (20 g/kg bb/hari)
- TW : Pemberian minyak babi : pellet (1: 9), serta *food combining* tempe *M-2* (20 g/kg bb/hari), dan wortel (20 g/kg bb/hari)

Rata-rata IL-6 dengan huruf yang tidak sama berbeda nyata pada taraf 1%.

Analisis keragaman kadar IL-6 plasma tikus menggunakan uji *Anova* dengan Excel 2007 (Permana, 2007). Hasil analisis keragaman kadar IL-6 plasma tikus Wistar menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ( $p < 0,01$ ) pada berbagai perlakuan, *food combining* tempe *M-2* dengan wortel menunjukkan pengaruh interaksi yang sangat bermakna ( $p < 0,01$ ), disajikan pada Tabel 5.2.

**Tabel 5.2**  
**Analisis Keragaman Kadar IL-6 plasma Tikus Wistar Diberikan Diet Aterogenik dan**  
***Food Combining* Tempe M-2 dengan Wortel**

Sumber Keragaman	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F. Hitung	Sig	P	F. Tabel	
							5%	1%
Ulangan	4	73.63326	18.40831	0.32527	NS	0.857	3.01	4.77
Perlakuan	4	150398.4	37599.6	664.369	**	0.000	3.01	4.77
KN Vs KP	1	26892.39	26892.39	475.177	**	0.000	4.49	8.53
Perlk TW	3	123506	41168.67	727.432	**	0.000	3.24	5.29
T	1	48634.45	48634.45	859.35	**	0.000	4.49	8.53
W	1	39351.76	39351.76	695.328	**	0.000	4.49	8.53
TxW	1	35519.81	35519.81	627.619	**	0.000	4.49	8.53
Galat	16	905.5119	56.59449					
Total	24	151377.6	6307.398	-				

**KK = 7.29%**

Keterangan : \*\* berbeda sangat bermakna ( $p < 0,01$ )

NS berbeda tidak bermakna ( $p > 0,05$ )

Pada perlakuan kombinasi tempe *M-2* dengan wortel disebutkan hipotesis pada pengamatan kadar IL-6 sebagai berikut :

1. Kadar IL-6 tikus Wistar aterosklerosis diberikan diet aterogenik dan *food combining* tempe *M-2* dengan wortel (TW) lebih rendah dibandingkan dengan yang diberikan pakan standar (Kontrol Negatif/KN), dengan yang diberikan diet aterogenik tanpa tempe *M-2* maupun wortel (Kontrol Positif/KP).
2. Kadar IL-6 tikus Wistar aterosklerosis diberikan diet aterogenik dan *food combining* tempe *M-2* dengan wortel (TW) lebih rendah dibandingkan dengan yang diberikan diet aterogenik dengan tempe *M-2* (T).
3. Kadar IL-6 tikus Wistar aterosklerosis diberikan diet aterogenik dan *food combining* tempe *M-2* dengan wortel (TW) lebih rendah dibandingkan dengan yang diberikan diet aterogenik dengan wortel (W).
4. Ada pengaruh interaksi pada perlakuan *food combining* tempe *M-2* dengan wortel (TW) terhadap kadar IL-6 tikus Wistar aterosklerosis.

Jadi dari Gambar 5.3 dan Tabel 5.2 dapat disimpulkan bahwa :

1. Rata-rata kadar IL-6 perlakuan *food combining* tempe *M-2* dengan wortel menunjukkan nilai yang paling rendah dan menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ( $p < 0,01$ ) dibandingkan dengan perlakuan KN, KP, T maupun W.
2. *Food combining* tempe *M-2* dengan wortel dapat menurunkan kadar IL-6 secara sangat bermakna ( $p < 0,01$ ).
3. Ada pengaruh interaksi yang sangat bermakna ( $p < 0,01$ ) antara perlakuan *food combining* tempe *M-2* dengan wortel terhadap kadar IL-6 plasma tikus Wistar aterosklerosis.
4. Hal ini membuktikan kebenaran hipotesis 1, hipotesis 2, hipotesis 3 dan hipotesis 4 pada pengamatan kadar IL-6.

## 5.2 PEMBAHASAN

### 5.2.1 Subyek Penelitian

Penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus Novergicus*) galur Wistar, jantan, dewasa, aterosklerosis dislipidemia, berumur 7-7,5 bulan, dan dengan berat badan 250-300 g. Penelitian ini menggunakan tikus Wistar, karena memiliki sifat-sifat yang mudah dipelihara, merupakan hewan yang relatif sehat dan cocok untuk berbagai macam penelitian. Disamping itu tikus memiliki keunggulan dibanding dengan hewan coba yang lain, adalah tidak dapat muntah, karena struktur anatomi yang tidak lazim di tempat esophagus bermuara ke dalam lambung, dan tikus tidak mempunyai kandung empedu (Kusumawati, 2004).

Penelitian ini menggunakan sampel awal sebanyak 60 ekor tikus Wistar yang mendapatkan perlakuan aterosklerosis dengan pakan tinggi kolesterol (Julyasih, 2011) selama lima bulan, dilaksanakan analisa profil lipid di Instalasi Laboratorium Patologi Klinik Rumah Sakit Sanglah, dengan hasil kolesterol total sebesar  $\pm 78,50$  mg/dl, dan HDL sebesar  $\pm 58,29$  mg/dl. Menurut standar protokol dalam penelitian laboratorik, kadar kolesterol total normal tikus adalah 10-54 mg/dl, dan kadar HDL normal tikus adalah  $\pm 69$  mg/dl (Kusumawati, 2004; Setyaji, 2011), maka tikus Wistar telah hiperkolesterol. Szmítko, *et al.* (2003) dan Kumar *et al.* (2007) menyebutkan bahwa aterosklerosis merupakan penyakit yang tumbuhnya lambat, selama bertahun-tahun. Disebutkan oleh Miyamoto *et al.* (2006) bahwa kondisi dislipidemia saja tidak cukup memfasilitasi terjadinya aterosklerosis, stress oksidasi lebih proaterosklerosis dibandingkan dengan dislipidemia saja tanpa stress oksidasi. Penelitian lebih lanjut menyatakan bahwa LDL kecil (fenotip B) berkaitan dengan profil lipoprotein yang aterogenik, karena lebih rentan terhadap oksidasi, karena mengandung asam lemak tidak jenuh jamak yang tinggi dibandingkan kandungan antioksidan, lebih lama berada dalam

sirkulasi, afinitas terhadap proteoglikan sel endotel lebih besar sehingga mempermudah masuk ke dalam lapisan subendotel dimana proses oksidasi LDL akan berlangsung (Chait, 1994), hal ini akan terjadi pada individu dengan penurunan kolesterol HDL (Tribble, 1995; Freeman dan Junge, 2008). Oleh karena itu untuk menginduksi/mempercepat proses aterosklerosis, tikus Wistar diinjeksi inisial adrenalin secara intravena 0,006 mg/200 g BB pada semua tikus pada hari pertama saja, dan hari selanjutnya berturut-turut setiap hari selama seminggu diberikan/disonde diet kuning telur mentah 5 g/200 g BB/hari (Prasetyo *et al.*, 2003), selanjutnya dilaksanakan analisa kolesterol HDL di Laboratorium Klinik Prodia Denpasar, dan hasilnya adalah sebesar  $\pm 16,9$  mg/dl, ternyata telah dislipid lebih dari setengah kali dari kadar HDL normal, dan disebutkan oleh Prasetyo (2003) bahwa tikus Wistar telah menunjukkan proses aterosklerosis tingkat awal. Hal ini dipertegas dengan hasil penelitian dari Wahyuni (2011) yang menunjukkan telah terjadinya aterosklerosis karena asupan minyak babi selama 13 minggu. Penelitian telah siap dilaksanakan, dipilih 25 ekor tikus Wistar, dibagi ke dalam 5 kelompok perlakuan (KN/kontrol negatif/perlakuan pakan standar, KP/kontrol positif/perlakuan pakan aterogenik, T/perlakuan pakan aterogenik dengan tempe M-2, W/perlakuan pakan aterogenik dengan wortel, dan TW/perlakuan pakan aterogenik dengan *food combining* tempe M-2 dengan wortel), dan pada setiap kelompok terdapat 5 ulangan.

Sebelum penelitian dimulai, dilaksanakan penelitian pendahuluan selama seminggu untuk penetapan dosis tempe M-2 dan wortel, yang diberikan pada pagi dan sore hari, sebelum diberikan pakan standar maupun pakan aterogenik, didapatkan rata-rata habis makan tempe M-2 maupun wortel seberat 25 g/kg BB/hari. Berdasarkan hasil penelitian dari Karyadi dan Hermana (1995) menemukan dosis konsumsi tempe sebesar 150 g/hari, selama dua minggu dapat menurunkan kolesterol, karena pada penelitian ini bertujuan untuk penanggulangan aterosklerosis dan berdasarkan konversi perhitungan dosis pada Lampiran 2, maka ditetapkan perlakuan dosis tempe M-2 seberat 20 g/kg BB/hari. Penetapan dosis wortel berdasarkan temuan dari Muchtadi (2009) dan Sunita (2009) bahwa konsumsi beta karoten yang berasal dari tanaman bersifat aman dan tidak akan memberikan efek toksik sampai 100.000 IU per hari, maka ditetapkan perlakuan dosis wortel seberat 20 g/kgBB/hari.

### **5.2.2 Pemeriksaan Kenormalan pH Urine Tikus Wistar**

Perlakuan *food combining* tempe M-2 dengan wortel menghasilkan pH urine yang normal, hal ini membantu menormalkan proses metabolisme, sehingga dapat menurunkan secara signifikan IL-6, serta dapat meningkatkan kadar TAC. Kombinasi tempe M-2 dengan

wortel merupakan kombinasi makanan yang sangat serasi, satu dengan yang lain saling bersinergi menormalkan pH darah (pH 7,3 -7,5), maupun pH urine (pH 7 – 8) atau lebih ke arah basa. Kombinasi makanan yang tepat bertujuan mencapai keseimbangan asam dan basa, sehingga terhindar dari gangguan fungsi tubuh dan penyakit (Gunawan, 2001; Marsden, 2008; Farida dan Amalia, 2009). Keseimbangan dalam kondisi sedikit basa tersebut senantiasa dipertahankan agar enzim-enzim yang berperan dalam proses metabolisme dapat bekerja optimal. Jika pH bergeser, maka kerja enzim terhambat, keadaan ini dapat menyebabkan timbulnya sakit dan penyakit (Rampisela, 2009).

Ditegaskan oleh Reagan *et al.* (2007) bahwa kondisi basa pH urine tikus adalah pada lebih besar atau sama dengan pH 7,5, sedangkan kondisi asam, pH urine tikus adalah pada lebih kecil atau sama dengan pH 7. Cara pemeriksaan pH urine dengan pH *Indicator Strips* merupakan penentuan pH urine yang mudah, cepat dan tepat (Kosasih dan Kosasih, 2008). Apabila pH urine sudah normal, untuk monitor kenormalan pH urine selanjutnya adalah pada dua belas minggu kemudian, dan monitor pH urine tiga minggu sekali apabila kondisi pH urine belum normal (Young, 2006).

Wortel yang kaya dengan beta karoten, merupakan makanan pembentuk basa di dalam tubuh. Kunci kesehatan tubuh yang paling utama adalah menjaga kesehatan fungsi pencernaan. Fungsi pencernaan akan sehat bila asam basa tubuh seimbang. Keseimbangan asam basa jaringan dan darah manusia harus berada pada pH 7,3 – 7,5 agar tetap sehat dan berfungsi optimal. Oleh sebab itu tubuh memerlukan lebih banyak makanan pembentuk basa daripada makanan pembentuk asam. Porsi sayuran dan buah-buahan segar sebaiknya menempati persentase 60-70 % dari seluruh menu satu hari. Dengan komposisi demikian, keseimbangan asam basa di dalam tubuh akan selalu terjaga (Gunawan, 2001). Dr. Robert O Young menyebutkan bahwa penyebab penyakit adalah karena darah dalam kondisi asam (Young, 2010). Apabila keasaman darah meningkat secara tidak seimbang, maka limpa, hati, jantung, ginjal dan sebagainya, yang kesemuanya merupakan organ pembersih darah, akan menderita beban yang terlalu besar. Akibatnya, karena bekerja terlalu berat membersihkan darah, semua organ itu berangsur menjadi lemah dan akhirnya tidak mampu bekerja sebagaimana mestinya (Sarkar, 2008).

Makanan yang dapat menurunkan keasaman tubuh atau membentuk efek basa mengandung lebih banyak mineral logam, seperti potasium/kalium (K), sodium/natrium (Na), magnesium (Mg), zat besi (Fe), dan kalsium (Ca). Semua jenis buah dan sayur-mayur (termasuk selada, umbi-umbian, dan sayuran rambat) adalah makanan pembentuk basa kecuali tomat (terutama yang masak) (Gunawan, 2001). Tempe M-2 dengan wortel sama-

sama merupakan sumber mineral logam natrium, magnesium, zat besi, kalsium dan utamanya kalium, kandungan mineral logam inilah yang dapat membantu menetralkan asam dalam darah. Tempe *M-2* dengan wortel sama-sama sebagai sumber antioksidan yang kuat. Kombinasi antioksidan dapat menetralkan pH dan radikal bebas, aktivitasnya penting dalam perlindungan dari beberapa penyakit, seperti aterosklerosis, kardiovaskular, saraf dan kanker (Gunawan, 2001; Johnson, 2002; Thumbekait, 2006). Tempe *M-2* merupakan makanan yang difermentasi, adalah pembentuk basa, karena perubahan status mikrobiologis dan nutrisi, meningkatkan flora usus yang baik, membantu menyintesis lebih banyak enzim dan vitamin, serta meningkatkan pencernaan protein (Marsden, 2008). Dipertegas oleh Young (2006) bahwa makanan vegetarian dan makanan yang mengandung lemak *polyunsaturated* merupakan makanan pembentuk basa tubuh.

### **5.2.3 Kadar Kapasitas Antioksidan Total (TAC) serum Tikus Wistar.**

Rata-rata kadar TAC serum tertinggi terdapat pada *food combining* tempe *M-2* dengan wortel yaitu  $1,454 \pm 0,01$  nM/mL. Hasil analisis keragaman kadar TAC serum tikus Wistar menunjukkan perbedaan sangat bermakna ( $p < 0,01$ ) pada berbagai perlakuan, *food combining* tempe *M-2* dengan wortel menunjukkan pengaruh interaksi yang sangat bermakna ( $p < 0,01$ ), yang dapat disimpulkan bahwa *food combining* tempe *M-2* dengan wortel dapat meningkatkan kadar TAC secara sangat bermakna ( $p < 0,01$ ) dan terdapat pengaruh interaksi yang sangat bermakna ( $p < 0,01$ ). Hal ini sesuai dengan hipotesis 1,2, 3 dan 4 bahwa kadar TAC serum tikus Wistar lebih tinggi pada perlakuan *food combining* tempe *M-2* dengan wortel dibandingkan dengan perlakuan yang lain, dan tempe *M-2* memberikan pengaruh sebesar 59,56% lebih besar dari pengaruh wortel. Hal ini disebabkan karena tempe *M-2* adalah sumber antioksidan yang sangat baik, seperti protein, vitamin E, Omega-3, vitamin B<sub>2</sub>, seng (Zn), tembaga (Cu), Selenium (Se), Fe, isoflavon, SOD (Agung, 2002; Winarsi, 2007; Mindell, 2008; Sunita, 2009). Isoflavon tempe dapat meningkatkan aktivitas enzim SOD, katalase dan glutathion peroksidase (Winarsi, 2007).

Wortel mengandung antioksidan beta karoten sangat tinggi, sebesar 66 µg/g wortel. Beta karoten memiliki aktivitas antioksidan terbaik, berperan dalam pencegahan dan penyembuhan penyakit kardiovaskular (Sergio dan Russel, 1999; Deming *et al.*, 2002; Sunita, 2009). Diet rendah karotenoid, tetapi cukup dalam semua zat gizi lain menghasilkan tanda-tanda berkurangnya TAC darah. Asupan beta karoten dapat meningkatkan kadar beta karoten dalam plasma sebesar 13 % (Het, 2000). Aktivitas katalase meningkat ketika laki-laki sehat diintervensi dengan karotenoid yang berasal dari jus tomat, wortel dan bayam

selama dua minggu (Bub, 2000). Wortel mengandung antioksidan Se, vitamin C, dan B<sub>2</sub>, serta yang paling penting adalah wortel kaya antioksidan beta karoten (provitamin A). Beta karoten wortel bersifat aman dan tidak akan memberikan efek toksik sampai 100.000 IU per hari. Pada umumnya penggunaan beta karoten sebagai antioksidan berkombinasi dengan sumber antioksidan yang lain (Winarsi, 2007). Berg *et al.* (2001) dan Block *et al.* (2001) menyebutkan bahwa antioksidan dalam bekerjanya merupakan suatu *network*. Ketersediaan beta karoten meningkat dengan kehadiran vitamin E dan antioksidan lain dalam tempe *M-2* (Sunita, 2009). Berbagai penelitian menemukan bahwa tokoferol ( $\alpha$  atau  $\gamma$ ) yang terkandung dalam tempe *M-2* melindungi beta karoten dari autooksidasi (Palozza dan Krinsk, 1992). Beta karoten dan isoflavon penting perannya dalam menginduksi status antioksidan tubuh (Winarsi *et al.*, 2003). Isoflavon tempe *M-2* dan beta karoten dapat meningkatkan aktivitas katalase. Isoflavon dan selenium mempengaruhi aktivitas enzim glutation peroksidase (Winarsi, 2007). Diet rendah beta karoten, tetapi cukup dalam semua zat gizi lain menghasilkan tanda-tanda berkurangnya Kapasitas Total Antioksidan darah (Omaye *et al.*, 1997). Suplemen pada diet harian dengan 90 mg beta karoten telah menunjukkan peningkatan TAC plasma (Sergio dan Russell, 1999). Pada umumnya penggunaan beta karoten sebagai antioksidan berkombinasi dengan sumber antioksidan lain (Winarsi, 2007). Beta karoten berperan sebagai sparing effect vitamin E. Bila tekanan oksigen dalam tubuh tinggi, vitamin E diangkut darah melalui LDL dan HDL. Namun bila tekanan oksigen rendah, vitamin E digantikan oleh beta karoten. Hal ini sesuai dengan hipotesis 4, bahwa ada interaksi tempe *M-2* dengan wortel pada perlakuan *food combining* tempe *M-2* dengan wortel terhadap kadar TAC serum tikus Wistar.

#### **5.2.4 Kadar IL-6 Plasma Tikus Wistar.**

Rata-rata kadar IL-6 plasma terendah pada perlakuan pakan aterogenik dan *food combining* tempe *M-2* dengan wortel yaitu  $35,328 \pm 1,000$  pg/dl. Hasil analisis keragaman kadar IL-6 plasma tikus Wistar menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ( $p < 0,01$ ) pada berbagai perlakuan. Tempe *M-2* dengan wortel menunjukkan pengaruh interaksi yang sangat bermakna ( $p < 0,01$ ). Hal ini sesuai dengan hipotesis 1, 2, 3 dan 4 pada kadar IL-6 plasma.

Pengaruh tempe *M-2* dalam menurunkan kadar IL-6 lebih tinggi 28,05 % dari pada pengaruh wortel pada perlakuan kombinasi tempe *M-2* dengan wortel. Hal ini sesuai dengan pendapat Omoigui (2007) yang menyebutkan bahwa IL-6 dapat dihambat secara tidak langsung melalui pengaturan sintesa kolesterol endogen, dan isoflavon tempe *M-2* dapat

menekan terbentuknya IL-6, penghambatan langsung pada jalur reaksi sinyal transduksi. Disebutkan pula bahwa aktivitas *antiresorptive phytoestrogen* sebagai mediatornya.

Asam lemak tidak jenuh Omega-3 pada tempe *M-2* dapat mengurangi sekresi sitokin proinflamasi dan pengaturan penurunan proses peradangan. Suplementasi Omega-3 selama 18 minggu menghambat signal pada basal dan *Lipopolysaccharide* (LPS) yang merangsang IL-6 atau produksi monosit (Abbate *et al.*, 1996; Sunita, 2009). Tempe *M-2* dapat meningkatkan kadar tiroksin plasma darah, sehingga mengurangi tingkat inflamasi. Tempe *M-2* mengandung antioksidan zat anti mutagenik (Simanjuntak dan Sudaryati, 1998).

Tempe *M-2* juga mengandung estrogen yang dapat mengatur produksi IL-6 (Rifas *et al.*, 1995). Ditegaskan oleh Manolagas (1995) dan Keller *et al.* (1996) bahwa estrogen menghambat ekspresi gen IL-6, melalui represi aktivasi transkripsi dari gen IL-6 melalui efek estrogen reseptor dalam aktivitas transkripsi dari sequens proksimal 225-bp dari promoter.

Isoflavon yang terdapat pada tempe, dapat meniru peranan dari hormon estrogen, dapat berikatan dengan reseptor estrogen sebagai aktivitas hormonal, menyebabkan serangkaian reaksi yang menguntungkan tubuh. Pada saat kadar hormon estrogen menurun, akan terdapat banyak kelebihan reseptor estrogen yang tidak terikat walaupun afinitasnya tidak sebesar estrogen. Target terapi untuk mengontrol beberapa penyakit, mencakup inhibisi IL-6 ((Baziad, 2003; Kim *et al.*, 2003; Koswara, 2006; Omoigui, 2007).

Optimalnya aktivitas perasan umbi wortel tidak hanya beta karoten yang bertanggung jawab dalam memberikan antiinflamasi. Kemungkinan antioksidan lain yang terkandung dalam perasan umbi wortel, seperti vitamin C juga memberikan peran antiinflamasi (Esvandary *et al.*, 2007). Penurunan aktivitas enzim lipoksigenase menyebabkan tidak terbentuknya leukotrien yang dapat mengaktivasi leukosit yang memacu terjadinya peradangan (Lieber dan Leo, 1999). Adanya hambatan pada oksidasi asam arakhidonat dan penetralan oksigen reaktif menyebabkan beta karoten berefek antiinflamasi. Reseptor IL-6 dikendalikan oleh vitamin A (Parakkasi, 1999). Hasil penelitian Utami dan Wijoyo (2007) menyebutkan bahwa wortel signifikan memiliki daya antiinflamasi.

Okopien *et al.* (2001) menyebutkan bahwa tingkat IL-6 secara signifikan lebih tinggi pada pasien dengan dislipidemia. Diduga ada hubungan antara kadar IL-6 dengan dislipidemia, karena IL-6 terlibat langsung dalam mekanisme aterogenesis (Dubinski dan Zdrojewicz, 2007; Hong, 2007; Yudkin *et al.*, 1999), dan ditemukan meningkat pada kejadian aterosklerosis (Calabro *et al.*, 2003). Omoigui (2007) menghipotesiskan bahwa IL-6 memediasi teroksidasinya LDL menjadi *ox-LDL*.

Secara umum, IL-6 berhubungan dengan TNF- $\alpha$  dan IL-1 dimana ketiga sitokin tersebut dapat saling berkoordinasi pengeluarannya dari monosit yang aktif. IL-1, TNF- $\alpha$ , dan IL-6 dapat menginduksi pengeluaran sitokin lainnya. IL-1 dan TNF- $\alpha$  sebagai *proximal cytokin* dapat menginduksi pengeluaran IL-6, tetapi sebaliknya IL-6 tidak dapat menginduksi ekspresi IL-1 dan TNF- $\alpha$  (Kresno, 2001).

## BAB 6

### SIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1 Simpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian ini, maka dapat dikemukakan beberapa simpulan sebagai berikut :

- (1). Normometabolik *food combining* tempe *M-2* dengan wortel dapat meningkatkan pH urine paling tinggi dibandingkan dengan tikus Wistar aterosklerosis dislipidemik diberikan diet aterogenik tanpa maupun dengan tempe *M-2* maupun wortel.
- (2). Normometabolik *food combining* tempe *M-2* dengan wortel dapat meningkatkan Kapasitas Antioksidan Total paling tinggi secara sangat bermakna dibandingkan dengan tikus Wistar aterosklerosis dislipidemik diberikan diet aterogenik tanpa maupun dengan tempe *M-2* maupun wortel.
- (3). Normometabolik *food combining* tempe *M-2* dengan wortel dapat menurunkan kadar IL-6 plasma paling rendah secara sangat bermakna dibandingkan dengan tikus Wistar aterosklerosis dislipidemik diberikan diet aterogenik tanpa maupun dengan tempe *M-2* maupun wortel.

#### 6.2 Saran

1. Perlu penelitian lebih lanjut peran normometabolik *food combining* tempe *M-2* dengan wortel terhadap biomarker yang lainnya seperti F<sub>2</sub>-Isoprostan, yang secara spesifik dapat mencerminkan proses aterosklerosis sejak dini.
2. Perlu dikembangkan pangan fungsional yang berasal dari *food combining* tempe *M-2* dengan wortel.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S. 2007. *Cellular and Molecular Immunology*. Six Edition. Philadelphia : Saunders Elsevier. p. 267-274.
- Agung, A. 2002. Pengaruh Pengasaman dan Lama Fermentasi Tempe Kedelai terhadap Kandungan Antinutrisi Tanin dan Uji Sensoris. *J. Saintex* Vol. 2 Untag Surabaya: 15- 20.
- Agung, A. 2011. Senyawa Bioaktif pada *Food Combining* TempeM-2 dengan Wortel (*Daucus carota*) yang Menunjang Kesehatan Tubuh. Denpasar. Pascasarjanan Unud. p. 32.
- Ahmed, E. 2001. Immune Mechanism in Atherosclerosis. *Dissertation*. Konferensrummet, Centrum for Molekular Medicin, Karolinska Sjukhuset.
- Alrasyid, H. 2007. Peranan Isoflavon Tempe Kedelai, Fokus pada Obesitas dan Komorbid. *Kedokteran Nusantara J.*, 40 (3) : 17-21.
- Amalia, N. dan Farida, I. 2009. *Diet Sehat dan Efektif dengan Metode Food Combining*. Buku Biru. Yogyakarta. 37-96.
- Anwar, S. 2005. Hipoadipoktinemia sebagai Faktor Risiko Infark Miokard Akut melalui Peningkatan Konsentrasi s-ICAM dan TNF- $\alpha$  Plasma. *Disertasi*. Denpasar. Unud.
- Arjuna, R. 2003. F<sub>2</sub>-Isoprostan sebagai Prediktor Dini Aterogenesis Fase Awal Akibat Dislipidemia. [cited 2010 Feb. 15]. Available from : URL : <http://www.adln.lib.unair.ac.id/go.php?id=jiptunair-gdl-S3-2003-arjuna>.
- Asgar, A., Musaddad, D. 2006. Optimalisasi Cara, Suhu, dan Lama Blansing Sebelum Pengeringan pada Wortel. *J. Hort.* 16 (3): 245-248.
- Astawan, M. 2004. Tempe. [cited 2009 Agust. 9]. Available from : URL : <http://id.wikipedia.org/wiki/Tempe>.
- Astuti. 1996. *Superoxide dismutase in Tempeh, an Antioxidant Enzyme, and its Implication on Health and Disease*. Indonesian Tempeh Foundation. Jakarta.
- Bagiada, N.A. 2001. Proses Penuaan dan Penanggulangannya. Unud. Denpasar. p.7-33.
- Bast, H., Guido,R.M.N., Hoenim.1991. Oxidants and Antioxidants State of the Art. *Am J.Med*: 225-235
- Baxter, N.J., Lilley,T.H., Haslam, E., Williamson, M.B. 1997. Multiple Interactions between Polyphenols and a Salivary Proline-Rich protein Repeat Result in Complexation and Precipitation. Departement of Molecular Biology and Biotechnology. The Krebs Institute for Biomolecular Research, University of Sheffield U.K. p.31.
- Baziad, A. 2003. *Menopause dan Andropause*. Yayasan Bina Pusaka Sarwono. p. 36.

- Berg, V.D.R., Vliet, V.T., Broekmans, W.M. 2001. Vegetable/Fruit Concentrate with High Antioxidant Capacity Has no Effect on Biomarkers of Antioxidant Status in Male Smokers. *J. Nutr.* 131 : 1714-1722.
- Bhagavan, N.V. 2002. *Medical Biochemistry*. Fourth Edition. Sandiago. Harcourt/Academic Press : 157-161.
- Biovision. 2012. Quantification Kit. [cited 2012 Jan. 25]. Available from URL : <http://www.biovision.com>.
- Block, G., Norkus, E., Hudes, M., Mandel, S., Helzlsouer, K. 2001. Which Plasma Antioxidant are Most Related to Fruit and Vegetable Consumption?. *Am. J. Epidemiol.* 154: 1113-1118.
- Boweris, A., Alvarez, S., Navarro, A. 2002. The Role of Mitochondrial Nitric Oxide Synthase in Inflammation and Septic Shock. *Free Rad Biol Med*, 33: 1186-1193.
- Browatzki, M., Schmidt, J., Kubler, W., dan Kranzhofer, R. 2000. Endothelin-1 induces interleukin-6 release via activation of the transcription factor NF-kappaB in human vascular smooth muscle cells. *Basic Res. Cardiol.*, 95(2): 98-105.
- Bub, A. 2000. Moderate Intervention with Carotenoid-Rich Vegetable Products Reduces Lipid Peroxidation in Men. *Nutrition J.*, 130. 2200-2206.
- Budi, I.M. 2009. Sari Buah Merah Memberi Harapan Besar Bagi Pengidap HIV/AIDS. [cited 2010 Feb. 18]. Available from URL : <http://health.dir.groups.yahoo/warta/aids>
- Calabro, P., Willerson, J.T., Yeh, E.T.H. 2003. Inflammatory Cytokines Stimulated C-Reactive Protein Production by Human Coronary Artery Smooth Muscle Cell. *Circulation* 108: 1930-1932.
- Cao, G., Prior, R.L. 2009. Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays 1 US Department of Agriculture, Agriculture Research Service, Jean Mayer Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University, Boston, MA 02111. Nutrient Requirements: 1-3.
- Carmona, A. 1996. Tannins: Termostable Pigments which Complex Dietary Proteins and Inhibit Digestive Enzymes. *Arch Latinoam Nutr.* 44 (4. Suppl 1) Dec 1996: 315 – 355.
- Cesari, M., Penninx B.W., Newman, A.B., Kritchevsky, S.B., Nicklas, B.J., Sutton-Tyrrell, K., Rubin, S.M., Ding, J., Simonsick, E.M., Harris, T.B., Pahor, M. 2003. Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study. *Circulation* 108(19): 2317-22.
- Chait, A., and Heinecke, J.W. 1994. Lipoprotein Modification : Cellular Mechanism. *Curr. Opin Lipidol*, 5: 385-370.

- Chatterjee, S.; Podowal, T.B.; Tilak, J.C.; Devasagayam, T.P. 2005. Total Antioxidant Capacity (Crocetin Assay). *Clin Chim Acta*, 352 (1-2): 155-163.
- Chuang, C.C., Shieh, S.C., Chi, C.H., Tu, Y.F., Hor, L.I., Shieh, C.C., Chen, M.F. 2006. Serum Total Antioxidant Capacity Reflects Severity of Illness in Patients with Severe Sepsis. *Critical Care*, 10: 36.
- Collins, A.R., Harrington, V., Drew, J., Melvin, R. 2003. Nutritional Modulation of DNA Repair in A Human Intervention Study. *Carcinogenesis*, 2003;24. 511-5.
- Cooke, P.S., Naaz, A. 2004. Role of Estrogens in Adipocyte Development and Function. *Exp Biol Med*, 229, 11: 27-35.
- Craig, R. 2005. Nutritional Report. [cited 2010 Jun. 9]. Available from: URL: [http://www.essentialhearthandwellnesscentre.com/Essential Nutrition Report.htm](http://www.essentialhearthandwellnesscentre.com/Essential%20Nutrition%20Report.htm).
- Croston, G. 2000. *Nerve Growth Factor Pathway*. USA Biocarto: 15
- Dandona, P., Aljada, A. 2001. A Rational Approach to Pathogenesis and Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus, Insulin Resistance, Inflammation and Atherosclerosis. *Am Cardiol* 90: 154-160.
- Dewaraj, S., Jialal, L. 1997. Laboratory Assessment of Lipoprotein Oxidation. Dalam *Hand Book of Lipoprotein Testing*. Washington AACC Press: 357-361.
- Dimayuga, F.O., Wang, C., Clark, J.M., Dimayuga, E.R., Dimayuga, V.M., Keller, A.J.B. 2006. SOD Overexpression Alters Production and Reduces Neurotoxic Inflammatory Signaling in Microglial Cells. *J Neuroimmunol*, 182: 89-99.
- Droge, W. 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev.*, 82: 47-95.
- Dubinski, A., Zdrojewicz, Z. 2007. The Role of IL-6 in Development and Progression of Atherosclerosis. *Pol. Merkus Lekarski*, 22 (130): 291-294.
- Eberhardt, M.K. 2001. *Reactive Oxygen Metabolites ;Chemistry and Medical Consequences*. New York: CRC Press. p. 1-27.
- Endemann, D.H., and Schiffrin, E.L. 2004. Endothelial Dysfunction. *Am. Soc. Nephrol.*, 15: 1983-1992.
- Esvandary, E., Utami, M.F.S., dan Wijoyo, Y. 2007. "Efek Analgetik dan Antiinflamasi Beta Karoten pada Mencit". (tesis). Yogya. Fakultas Sanata Dharma.
- Fogarty, A., dan Davey, G. 2005. Paracetamol, Antioxidants and Asthma. *Clin. Exp. Allergy* 35: 700-702
- Freeman, M.W., Junge, C. 2008. *Kolesterol Rendah, Jantung Sehat*. Second Edition. Jakarta: Bhuana Ilmu Populer, Group Gramedia. p. 31

- Garcia, Casal, M.N. 1998. Vitamin A and Beta Carotene can Improve Nonheme Iron Absorption from Rice, Wheat and Corn by Humans. *Nutrition, J.* 128. 646-650.
- Gaziano, J.M., Hatta, A., Flynn, M., Johson, E.J., Krinsky, N.I., Ridker, P.M., Hennekens, C.H., Frei, B. 1995. Supplementation with Beta Carotene in Vivo and in Vitro does not Inhibit LDL Oxidation. *Artherosclerosis*, 112: 187-195.
- Giriwijoyo, S. 2004. *Ilmu Faal Olahraga Fungsi Tubuh Manusia pada Olahraga*. Fakultas Pendidikan Olahraga Kesehatan. Jakarta: Universitas Pendidikan Indonesia. p. 98-112.
- Giannoudis, P.V., Hilderbrand, F., Pape, H.C. 2004. Inflammatory Serum Markers in Patient With Multiple Trauma : Can They Predict Outcome?. *JBJS.*, [cited 2010 Januari. 9]. Available from: URL: <http://www.JBJS.com>.
- Gunawan, A. (2001). *Food Combining, Kombinasi Makanan Serasi Pola Makan untuk Langsing dan Sehat*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta. 24-75.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Cross, C.E. 1992. Free Radicals, Antioxidants, and Human Disease: Where Are We Now?. *J Clin Lab Med*, 119: 598-620.
- Halliwell, B. 1994. Free Radicals, Antioxidants and Human Disease : Curiosity Cause, or Consequence. *The Lancet J.* 344: 721-724.
- Halliwell, B. 1996. *Antioxidant, dalam Present Knowledge in Nutrition Knowledge in Nutrition* (Zinglar E.E. dan Filer L.J.). 7 th ed. ILSI Press Washington DC: 596-601.
- Halliwell, B. 2002. *Food-Derived Antioxidant: How to Evaluate Their Importance in Food and in Vivo*. Dalam : Cedenas E, Packer L. Hand Book of Antioxidant. 2<sup>nd</sup> Ed. Los ngeles: Marcel Dekker. p. 1-46.
- Hamid, AAT. 2005. *Biokimia : Metabolisme Biomolekul*. Bandung: Alfabeta. p. 99.
- Harbarth, S., Haleckova, K., Fruidevaux, C., Pittet, D., Ricou, B., Grau, G.E., Vadas, L., Pugin, J. 2001. Diagnostic Value of Procal Citoning IL-6 and IL-8 in Critical III Patients Admitted with Suspected Sepsis. *Am. J. Repir. Crit. Care Med.*, 164: 396-402.
- Harborne, J.B. 1987. *Meetode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. ITB. Bandung. 102-105.
- Harlinawati, Y. 2006. *Terapi Jus untuk Kolesterol dan Ramuan Herbal*. Jakarta. Puspa Swara. 8-14.
- Hastuti, T. 2005. *Faktor-Faktor Resiko Terbaru untuk Penyakit Kardiovaskular*. Jakarta: Prodia: 1-25.

- Hendromartono. 2009. *Bridging the Gap in Dislipidemia (Focus on HDL Raiser)*. Division of Endocrinology ad Metabolism, Departemen of Internal Medicine dr Soetomo Teaching Hospital , Airlangga University School of Medicine, Surabaya., [cited 2009, Agustus. 28]. Available from : URL : <http://medicalborneo.com>.
- Hermana dan Karmini. 1996. *Pengembangan Teknologi Pembuatan Tempe*. Yayasan Tempe Indonesia. Jakarta. 151-167.
- Het, V.K.H., West, C.E., Weststrate, J.A. 2000. Dietary Factors that Affect the Bioavailability of Carotenoids. *Journal of Nutrition* , 130: 503-506.
- Huang, H., Patel, D.D., Manton, K.G. 2005. The Immune System in Aging: Roles of Cytokines, T Cells and NK Cells. *Front Biosci*, 10: 192-215.
- Jawi, M. 2012. Peran Nutrisi dalam Mencegah Stres Oksidatif. *Journal Medicina*, 43(1): 1-2
- Johan. 2005. Tempe dan Kolesterol Darah., [cited 2009 Agust. 29]. Available from : URL : <http://www.fatmawati.com>.
- Johnson. 2002. Antioxidant Enzyme Expression in Health and Disease : Effects of Exercise and Hypertension. *Comp. Biochemical Physiol*, 133 c: 443-505
- Kampa, M., Nistikaki, A., Tsaousis, V., Maliraki, N., Notas, G., Gastonas, E. 2002. A New Automated Method for the Determination of TAC of Human Plasma Based on Crocin Bleaching Assay. *BMG Clin Pathol*, 2: 3-21.
- Karnen, G.B., Rengganis, I. 2009. *Imunologi Dasar*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. p. 217-287.
- Karyadi, D. 2008. Cegah Penyakit Jantung Sebelum Terlambat. *CNI* , Agustus 2008. Jakarta. 9.
- Keller, E.T., Wanagat, J., Ershler, W.B. 1996. Molecular and Cellular Biologyof Interleukin-6 and Its Reseptor. *Frontiers in Bioscience*, 1: 340-357., [cited 2010, Januari]. Available from: URL: <http://www.bioscience.org/1996/v1/d/keller2/htmls/340-357.htm>.
- Kharb, S. 2000. Vitamin E dan C in Preeclampsia. *Eur. J .Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 93 (1): 37-39.
- Kim, P.K., Deutschmann, C.S. 2000. Inflammatory Responses and Mediators. *Surgical Clinical of North America*, 80: 3.
- King, R.A. 2002. Soy Isoflavones in Foods: Processing Effects and Metabolism. *Asa Technology Bulletin*, 87 (10): 1-10.
- Kohlmeier, M. 2003. *Nutrient Metabolism*. California. USA. Elsevier Ltd. p.92-475.

- Koracevic, D., Koracevic, G., Djordjevic, V. 2001. Method for the Measurement of Antioksidant Activity in Human Fluids. *J.Clin.Pathol.*, 54: 356-361.
- Kosasih, E.N., Kosasih, A.S. 2008. *Hasil Pemeriksaan Laboratorium Klinik*. Karisma Publishing Group. Jakarta. p. 399-401.
- Koswara, S. 2006. Isoflavon, Senyawa Multi Manfaat dalam Kedelai. [cited 2010, Januari]. Available from: URL: <http://www.e-book pangan.com>.
- Kresno, S.B. 2001. *Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. p. 27-31.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. 2004. *Pathologic Basis of Disease*. Elsevier saunders. p.16-18.
- Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L. 2007. *Patologi 2*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran. p. 376-377.
- Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Yogyakarta. Gadjah Mada University Press. p. 9-97.
- Lameschow, S., Hosmer, D.W., Klar, J., Lwangsang, K.S. 1990. Adequacy of Sample Size in Health Studies. John Wiley & Sons. New York: 159.
- Lampe, J.W. 1999. *Health Effects of Vegetables and Fruit Assessing Mechanisms of Action in Human Experimental Studies*. John Wiley and Sons. New York: 159
- Lemieux, I., Pascot, A., Homme, D.P., Almeras, N., Bogaty, P., Nadeau, A. 2001. Elevated C-Reactive protein, Another Component of the Atherothrombotic Profile of Abdominal Obesity. *ATVB*, 21: 961-967.
- Lieber, C.S. and Leo, M.A. (1999). Alcohol, Vitamin A and B,C, Adverse Interactions, Including Hepatotoxicity and Carcinogenicity. *Am. J. Clin Nutr*, 69 (6). 1071-1085.
- Manolagas, S.C. 2000. *Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis*. *Endocrine Reviews* Vol. 21, No 2: 115-137.
- Marinetti, G.V. 1990. *Disorders of Lipoprotein Metabolism, dalam Disorders of Lipid Metabolism*. Plenum Press, New York. p. 101.
- Mashayekhi, F., Salehi, Z. 2005. Expression of Nerve Growth in Cerebrospinal Fluid of Congenital Hydrocephalic and Normal Children. *Eur J. Neurol*, 12 (8): 632-634
- McMichael, M. 2004. Ischemia-Reperfusion Injury: Assessment and Treatment, part II. *J. Vet. Emerg. Crit. Care*, 14: 242-252.
- Mehansho, H., Butler, L.G., Carlson, D.M. 1987. Dietary Tannins and Salivary Proline-Rich Proteins: Interactions, Inductions, and Defense Mechanisms. *Ann Reviews Nutr*. 7. Annual Review Inc. p. 423.

- Mikael, S., Community, S.D. 2007. *SPSS 15*. Jakarta: Gramedia . p. 79-81.
- Miller, D.T. 2007. Atherosclerosis: The Path from Genomics to Therapies. *J.Am Coll Cardiology*, 49.1589.
- Mindell, E. 2008. *Terapi Kedelai*. Jakarta: Delapratrasa. p. 57-58.
- Milner, J.A. 2000. *New Insights Into the Mechanism of Action of Antioxidants*. Bethesda: National Cancer Institute. p. 1-11.
- Miyamoto, T.,Yumoto,H., Takakashi, Y.,Davsony, M., Gibson, FC., Genco. Patogen accelerated Atherosclerosis Occur Early after Exposure and can be Prevented via Immunization. *Infection and Immunity J.*; 2006; 74: 1376-1380.
- Morel, E., Lescoat, G., Cogrel, P., Sergent, O. 1993. Antioxidant and iron-Chelating Activities of the Flavonoids Catechin, Quercetin and Diosmetin on Iron-Loaded Rat Hepatocyte Cultures. *Biochem. Pharmacol*, 45: 13-19.
- Morow; Lemos, D. 2009. Biomarker dalam Gagal Jantung. [cited 2010, Januari]. Available from: URL: [http://www.jantungku.com/tag/gagal\\_jantung](http://www.jantungku.com/tag/gagal_jantung).
- Morrison, G., Hark, L. 1999. *Medical Nutrition Disease*. Tokyo Blacwell Science. 177.
- Muchtadi, D. 2009. *Gizi Anti Penuaan Dini*. Bandung: Alfabeta. p. 5-79.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. 2009. *Biokimia Harper*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran. p. 270-281.
- Murwani, S., Ali, M., Muliarta, K. 2006. Diet Aterogenik pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus* strain Wistar) sebagai Model Hewan Aterosklerosis. *Jurnal Kedokteran Brawijaya XXII* (1): 7-9.
- Nawawi, H., Osman, N.S., Annuar, R., Khalid, B.A., Yusoff, K. 2003. Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 and IL-6 Levels Reflect Endothelial Dysfunction in Patients with Primary Hipercholesterolemia Treated wih Atorvastatin. *Atherosclerosis*, 169 (2). 283-291.
- Nelson, K.E, Pellan, Schofield, P., Zinders. 1995. Isolation and Characteristic of an Anaerobic Ruminant Bacterium Capable of Degrading Hidrolyzable Tannins. *Appl. Environ Microbial* 61(9). Departemen of Animal Science, Cornel University New York: 3293-3298.
- Nicoletta, P., Serafini, M., Colombi, B., Rio, D.,D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F. 2005. *Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy by Three Different In Vitro Assays*. Nutrient Requirements, Departement of Public Health University of Parma, Italy: 1-25.
- Norma, E.D. 2005. Atherosclerosis an Inflammatory Process. *J.Insur.Med.*,37. 72-75.

- Okopien, B., Hyper, M., Kowalski, J., Belowski, D., Madej, A., Zielinski, M., Tokarz, D., Kalina, Z., Herman, Z.S. 2001. A New Immunological Marker of Atherosclerotic Injury of Arterial Wall. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 109(3-4): 241-8.
- Omaye, S.T., Krinsky, N.I., Kagan, V.E., Mayne, S.T., Liebler, D.C., Bidlack, W.R. 1997. Beta Carotene : Friend or Foe ?. *Fundam. Appl. Toxicol*, 40: 163-174.
- Omoigui, S. 2007. *The Interleukin-6 Inflammation Pathway from Cholesterol to Aging-Role of Status, Bisphosphorates and plant polyphenols in Aging and Age-related Diseases*. Division of Inflammation and Pain Medicine, L.A. Pain Clinic, Los Angeles, USA. p. 31-33.
- Opal, S.M. 2003. Clinical Trial Design and Outcomes in Patients with Severe Sepsis. *Shock*, 20: 295-302.
- Ozcan, E. 2003. To Develop a Novel Colorimetric and Automated Direct Measurement Method for TAC. *Clinical Biochemistry*, 37: 153-157.
- Paloza, P., Krinsky, N.I. 1992. Beta Carotene and  $\alpha$ -Tocopherol are Synergistic Antioxidants. *Arch Biochem. Biophys.*; 297: 184-187.
- Papendorf, B.G., Barz, W. 1991. Metabolisms of Isoflavones and Formation of Factor-II by Tempe Producing Microorganisms. Tempe Workshop, October 21, 1991, Cologne, Germany: 54-59.
- Patrick, L.N.D. 2000. Beta-Carotene: the Controversy Continues. *Alternative Medicine Review*, 5 (6): 530-535.
- Patrono, C. 1997. Isoprostanes : Potential Markers of oxidant Stress in Atherothrombotic Disease. *Thromb. Vasc. Biol.*, 17: 2309-2315.
- Pawiroharsono, S. 1997. Metabolisme Isoflavon dan Faktor II pada Proses Pembuatan Tempe. Prosiding Simposium Nasional Pengembangan Tempe dalam Industri Pangan Modern, UGM dan Yayasan Tempe Indonesia: 165-168.
- Pawiroharsono, S. 2000. Characterisation of Microorganism and its Implementation for Active Substances Improvement of Tempe. *Prosiding Masa Depan Industri Tempe Menghadapi Millenium Ketiga*. Yayasan Tempe Indonesia: 1-17.
- Prasetyo, A., Sarjadi, Pudjadi. 2003. Pengaruh Injeksi Inisial Adrenalin dan Diet Kuning Telur terhadap Kadar Lipid, Jumlah Sel Busa dan Ketebalan Dinding Aorta Abdomalis Tikus Wistar. *Media Medika Indonesiana*, 38 (1).
- Purwanto. 2001. Pengubahan Kacang Kedelai menjadi Tempe terhadap Kandungan Zat Antinutrisi Asam Fitat. (Tesis). Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga: 17-19.
- Rahmi, F.L. 1993. Pengaruh Diet Apel (Malus Sylvestris) Kering terhadap Kadar Kolesterol Total, Kolesterol HDL dan Kolesterol LDL Serum Tikus. (Tesis) Unair Surabaya. p. 87.

- Ridwan, E. 1997. Tempe Mampu Menghambat Proses Ketuaan. *J. Cermin Dunia Kedokteran* 120. Jakarta: PT Kalbe Farma: 14.
- Reagan-Shaw, S., M. Nihal and N. Ahmad. 2007. Dose Translat from Animal to Human Studies Revisited. vol. 22 March 2007 :659-661.
- Roberts, C.S., Pape, H.C., Jones, A.L., Malkani, A.L., Rodroquez, Giannoudis, P.V. 2005. Damage Controle Orthopaedics. Evolving Concepts in the Treatment of patient Who Have Sustained Orthopaedics Trauma. *JBJS Am.*, 87: 434-449.
- Roche. 2000. Vitamin;, Beta Karoten. [cited 2009 Des. 21]. Available from : URL:<http://www.roche.com/vitamins/what/hnh/vits/bc.html>.
- Rochiman, K. 1989. *Dasar Perancangan Percobaan*. Surabaya. Unair.
- Salvayre, A.N., Dousset, N., Ferretti, G., Bacchetti, T., Curalola, G., Salvayre, R. 2006. Antioxidant and Cytoprotective Properties of High- Density Lipoproteins in Vascular Cells. *Free Radical Biology and Medicine* Vol. 41 (7): 1031 – 1040.
- Sander, TAB., Dean, TS., Grainger, D. 2002. Moderate Intakes of Intact Soy protein Rich in Isoflavones Compared with Ethanol-Extracted Soy Protein Increase HDL but Do Not Influence Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Concentrations and Hemostatic Risk Factors for Coronary Heart Disease in Heathy Subjects. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 373-377.
- Sargowo, J. 2003. *Disfungsi Endotel pada Penyakit Kardiovaskular*. Bayumedia Publishing, Malang. 118-120.
- Sarkar, S.P. 2008. *Yogic Tratment and Natural Remedies*. Ananda Marga. Jakarta. 1.
- Serafini, M., Bellocco,R., Wolk,A., Ekstrom, A.M. 2002. Total Antioxidant Potential of Fruit and Vegetable and Risk of Gastric Cancer. *Gastroenterology*, 123: 985-999.
- Sergio, A.R.P., Russell, R.M.D. 1999. Beta Carotene and Other Carotenoids as Antioxidants. *J. of the American College of Nutrition*, 18(5): 426-433.
- Sies, H., Stahl, W., Sevanian, A. 2005. Nutritional, Dietary and Postprandial Oxidative Stress. American Society for Nutrional Sciences. *J. Nutrition*: 969-972.
- Sikka, C.S. 1996. *Oxidative Stress and Role of Antioxidants in Normal and Abnormal Sperm Function*. Departement of Urology, Tulane University School of Medicine, New Orleans, Louisiana, USA. 33.
- Simanjuntak, D.H.; Sudaryati, E. 1998. Aspek Pencegahan Radikal Bebas melalui Antioksidan. *Majalah kedokteran Indonesia*, vol. 48 No. 1.
- Sofia, D. 2005. Antioksidan dan Radikal Bebas. [cited 2010, Januari]. Available from: URL: <http://www.chem-15-try.org/artikel-kimia/berita/antioksidan-dan-radikal-bebas>.

- Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S. 2005. Phenolic as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*, 579(1-2): 200-13.
- Suarsana, N. 2006. Pemanfaatan Senyawa Bioaktif Tempe terhadap Fungsi Hati dan Enzim Antoksidan Seluler pada Jaringan Hati Tikus Akibat Stres. (*Tesis*). IPB
- Sunita, A. 2009. Prinsip Dasar Ilmu Gizi. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama. p. 51-75.
- Surjohudojo, P. 2000. *Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekuler*. Jakarta: CV Sagung Seto. p.31-47.
- Suyono, S. 1991. Aspek Klinis dan Pengobatan Dislipidemia. Surabaya: *Simposium Nasional : Perkembangan Mutakhir Endokrinologi Metabolisme*: p. 544-563.
- Tharn, D.M. 1998. Potential Health Benefits of Dietary Phytoestrogens. A Review of the Clinical, Epidemiological and Mechanistic Evidence. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 2223-2235.
- Tribble, D.L. 1995. Lipoprotein Oxidation in Dyslipidemia: Insight Intogeneral Mechanisms Affecting Lipoproteins Oxidative Behaviour. *Curr.Opin. Lipidol.* 6. 196-208.
- Trumbeckaite, S., Bernatoniene, J., Majkne, D., Jakstas, V., Savickas, A., Toleikis, A. 2006. The Effect of Flavonoids on Rat Heart Mitochondrial Function. *Biomed. Pharmacotherapy*, 60: 245-248.
- Utami, M.F.S., Wijoyo, Y. 2007. *Efek Analgetik dan Antiinflamasi Beta Karoten pada Mencit*. Fakultas Sanata Dharma. Yogya. 75.
- Utari, D.M. 2011. "Efek Intervensi Tempe terhadap Profil Lipid, SOD, LDL, HDL dan MDA pada Wanita Menopause". (*Tesis*). Bogor. IPB.
- Vallerie, N. 2009. *Empat Pilar Kesehatan, Panduan Memilih dan Mengonsumsi Vitamin, Suplemen, dan Herbal*. Edisi pertama. Jakarta : Prestasi Pustaka publisher. p. 26-28.
- Wahyuni, S. 2011. Asupan Minyak Ikan Lemuru sebagai Anti Inflamasi, dan Anti Dislipidemia Melalui Penurunan TNF- $\alpha$ , IL-6, LDL, MDA, serta Peningkatan HDL pada Tikus Wistar. (*Disertasi*). Unud.
- Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw, W.D., Kang, M.I., Kobayashi, A., Yamamoto, M. 2004. Protection Against Electrophile and Oxidant Stress by Induction of the Phase 2 Response : Fate of Cysteines of the Keap 1 Sensor Modified by Inducers. *PANS*, 101: 2040-2045.
- Winarsi, H., Muchtadi, D., Zakaria, F.R., Purwantara, B. 2003. *Status Antioksidan Wanita Premenopause yang Diberi Minuman Suplemen "Susumeno"*. Yogyakarta: Dalam Proseding Seminar Nasional PATPI. p. 21-27.

- Winarsi, H. 2004a. *Efek Minuman Fungsional yang Disuplementasi Isoflavon kedelai dan Zn terhadap Profil Lipid dan Produk MDA Plasma Wanita Premenopause*. Yogyakarta: Proseding Seminar Nasional PBBMI : Peran Biokimia dan Biologi Molekuler dalam Eksplorasi dan Pemanfaatan Sumber Daya Hayati Berkelanjutan. p. 10-15.
- Winarsi, H. 2004b. *Status Antioksidan Enzimatis Intraseluler dan Ekstraseluler Wanita Premenopause yang Disuplementasi dengan Isoflavon Kedelai dan Zn*. Jakarta: Proseding Seminar dan Kongrs PATPI. p. 23-27.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan alami dan Radikal Bebas, Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius. p. 9-108.
- Wirakusumah, E.S. 1997. *Buah dan Sayur untuk Terapi*. Penebar Swadaya. Jakarta. 29-33.
- Woods, A., Brull, D.J., Humphries, S.E., Montgomery, H.E. 2000. Genetics of Inflammation and Risk of Coronary Artery Disease; the Central Role of Interleukin-6. *Eur Heart J.*, 21: 1574-1583.
- Yeum, K.J., Russel, R.M. 2002. Carotenoid Bioavailability and Bioconversion. *Annu. Rev. Nutr*; 22 : 483-504.
- Youngson, R. 2005. *Antioksidan, Manfaat Vitamin C dan E bagi Kesehatan*. Arcan, Jakarta. p. 1-86.
- Young, R.O. 2006. Understanding and Testing the pH of Urine and Saliva. [cited 2013, Januari, 25]. Available from: URL: [www.phmiraaacleliving.com/Articles-testing-pH.html](http://www.phmiraaacleliving.com/Articles-testing-pH.html).
- Young, R.O. 2010. *What is The Acid-Alkaline Diet ?*. [cited 2010, Agustus, 2]. Available from: URL: <http://www.energiseforlife.com>.
- Yudkin, J.S., Stehouwer, C.D.A., Emeis, J.J., Oppack, S.W. 1999. *C. Reactive Protein in Healthy Subjects : Associations with Obesity, Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction, A Potential Role for Cytokines Originating from Adipose Tissue*. *ATVB*, 19: 972-978.
- Yulyasih, K.S.M. 2011. "Ekstrak Bulung Boni (*Caulerpa* spp.) dan Bulung Sangu (*Gracilaria* spp.) Memperbaiki Profil Lipid, Menurunkan Kadar MDA, dan Enzim HMG Reduktase Tikus Wistar Diberikan Diet Tinggi Kolesterol". (*Disertasi*). Denpasar : Universitas Udayana.
- Yuniastuti, A. 2008. *Gizi dan Kesehatan*. Graha Ilmu, Yogya. p. 95-98.
- Zakaria, F.R., Irawan, B., Pramudya, S.M., Sanjaya. 2000. *Intervensi Sayur dan Buah Pembawa Vitamin C dan E Meningkatkan Sistem Imun Populasi Buruh Pabrik di Bogor*. *Buletin Teknologi dan Industri Pangan*, 11(2): 21-27.

## DAFTAR LAMPIRAN

### LAMPIRAN 1. ANALISIS STATISTIK

#### Lampiran 1.1 ANALISIS STATISTIK KADAR TAC

##### Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
TACKN	5	,54	,58	,5598	,01527
TACKP	5	,42	,50	,4444	,03350
TACT	5	,82	,91	,8660	,03598
TACW	5	,62	,67	,6458	,01912
TACTW	5	1,44	1,47	1,4536	,01057
Valid N (listwise)	5				

##### Tests of Normality TAC

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
TACKN	,121	5	,200(*)	,994	5	,991(*)
TACKP	,305	5	,145(*)	,787	5	,064(*)
TACT	,165	5	,200(*)	,978	5	,924(*)
TACW	,239	5	,200(*)	,925	5	,564(*)
TACTW	,197	5	,200(*)	,971	5	,884(*)

(\*) Data berdistribusi normal ( $p > 0,05$ )

##### Test of Homogeneity of Variances Kadar TAC

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,829	4	20	,163(*)

Data homogen ( $p > 0,05$ )

#### LAMPIRAN 1.2 ANALISIS STATISTIK KADAR IL-6

##### Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
ILKN	5	153,18	184,55	168,8500	11,29386
ILKP	5	211,10	238,33	222,6680	10,55796
ILT	5	37,57	41,25	39,7580	1,63917
ILW	5	48,20	51,17	49,6680	1,44068
ILTW	5	34,32	36,74	35,3280	1,00108
Valid N (listwise)	5				

##### Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
ILKN	,239	5	,200(*)	,958	5	,795
ILKP	,196	5	,200(*)	,963	5	,827
ILT	,292	5	,189(*)	,861	5	,232
ILW	,246	5	,200(*)	,843	5	,172
ILTW	,184	5	,200(*)	,938	5	,652

(\*) Data berdistribusi normal ( $p > 0,05$ )

##### Test of Homogeneity of Variances IL-6

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4,136	4	20	,013

Data homogen ( $p > 0,05$ )

## Lampiran 2

### Lampiran 2.1 Hewan Coba dalam Kandang Individu dan Denah Penelitian



Foto 1. Hewan Coba (Tikus Wistar)



Foto 2. Hewan Coba dalam Kandang Individu sesuai Denah Penelitian

### Lampiran 3 Tempe *M-2* dan Wortel

#### Lampiran 3.1 Bahan dan Peralatan Pembuatan Tempe *M-2*



Foto 3. Bahan (Kedele lokal/varietas Wilis, ragi tempe, asam laktat, minyak babi) dan Peralatan Membuat Tempe *M-2*

#### Lampiran 3.2 Tempe *M-2*



Foto 4. Tempe *M-2*

### Lampiran 3.3 Wortel



Foto 5. Wortel Lokal (Bedugul, Bali)

### Lampiran 4. Bahan dan Peralatan Analisa pH urine, TAC dan IL-6

#### Lampiran 4.1 Alat Pengukur pH Urine



Foto 6. pH Indikator Strips

#### Lampiran 4.2 Alat Sentrifuge untuk Analisa TAC dan IL-6



Foto 7. Alat Sentrifuge di Laboratorium Patologi FKH Unud

#### Lampiran 4.3 Bahan/Kit Analisa TAC dan IL-6



Foto 8. Kit untuk Analisa TAC dan IL-6

**Lampiran 4.4 Alat Elisa untuk Mengukur TAC dan IL-6**



Foto 9. Alat Elisa di Laboratorium Patologi FKH Unud