



UNIVERSITAS INDONESIA

ANTIOKSIDAN YANG DIHASILKAN KAPANG *Aspergillus* spp.
DAN PENGARUHNYA TERHADAP PERBAIKAN JARINGAN
HATI TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus* L.) GALUR Sprague
Dawley

TESIS

CISCA LASMARIA

0806420322

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI BIOLOGI
PROGRAM PASCASARJANA
DEPOK
Juli 2011



UNIVERSITAS INDONESIA

ANTIOKSIDAN YANG DIHASILKAN KAPANG *Aspergillus* spp.
DAN PENGARUHNYA TERHADAP PERBAIKAN JARINGAN
HATI TIKUS (*Rattus norvegicus* L.) GALUR Sprague-Dawley

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains

CISCA LASMARIA
0806420322

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI BIOLOGI
PROGRAM PASCASARJANA
DEPOK
Juli 2011

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Cisca Lasmaria

NPM : 0806420322

Tanda Tangan :

Tanggal : 15 Juli 2011

ANTIOKSIDAN YANG DIHASILKAN KAPANG *Aspergillus* spp. DAN
PENGARUHNYA TERHADAP PERBAIKAN JARINGAN HATI TIKUS
PUTIH (*Rattus norvegicus* L.) GALUR Sprague Dawley

Nama : Cisca Lasmaria

NPM : 0806420322

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc
Pembimbing I

Dr. Dadang Kusmana, M.S
Pembimbing II

2. Penguji

Drs. Iman Santoso, M.Phil
Penguji I

Dr. Luthfiralda Sjahfirdi, M.Biomed
Penguji II

3. Ketua Pasca Sarjana Biologi
FMIPA UI

4. Ketua Program Pascasarjana
FMIPA UI

Dr. Luthfiralda Sjahfirdi, M.Biomed

Dr. Adi Basukriadi, M.Sc

Tanggal Lulus 15 Juli 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh

Nama : Cisca Lasmaria
NPM : 0806420322
Program Studi : Biologi
Judul Tesis : ANTIOKSIDAN YANG DIHASILKAN
KAPANG *Aspergillus* spp DAN
PENGARUHNYA TERHADAP PERBAIKAN
JARINGAN HATI TIKUS PUTIH (*Rattus
norvegicus* L.) GALUR Sprague Dawley

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc (.....)
Pembimbing II : Dr. Dadang Kusmana M.S (.....)
Penguji I : Drs. Iman Santoso,, M. Phil (.....)
Penguji II : Dr. Luthfiralda Sjahfirdi, M.Biomed (.....)

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 15 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur bagi Allah yang selalu melimpahkan berkat dan anugerahNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan tesis yang berjudul “ Antioksidan yang dihasilkan Kapang *Aspergillus* spp. dan pengaruhnya terhadap perbaikan jaringan hati tikus (*Rattus norvegicus* L.) galur Sprague

- Dawley. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangat sulit bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada :

- (1) Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc, dan Dr. Dadang Kusmana, M.S selaku pembimbing tesis, yang dengan penuh kesabaran dan ketekunan memberikan bekal ilmu, arahan, dan dukungan hingga selesainya penelitian dan penyusunan tesis ini.
- (2) Drs. Iman Santoso, M.Phil. dan Dr. Luthfirda Sjahfirdi, M.Biomed. selaku dosen penguji.
- (3) Dr. Luthfirda Sjahfirdi M.Biomed. dan Dr. Nisyawati selaku Ketua dan Sekretaris Program Studi Pascasarjana, Departemen Biologi, FMIPA-UI, yang banyak membantu dalam memberikan semangat, pengarahan, dan pengurusan administrasi.
- (4) Head of School Stella Maris Anna Indarwati, M.Pd dan Titut Sutiyoso, S.T serta Kepala Sekolah SMA Stella Maris Bumi Serpong Damai (BSD) Yosef Suwanto, S.Ag dan Wakil Kepala Sekolah Lucie Retno Atmawati SH,S.Pd, yang telah banyak membantu dan memberikan kesempatan seluas-luasnya kepada penulis untuk menempuh dan menyelesaikan jenjang pendidikan S-2 di Universitas Indonesia.
- (5) Yanti Rafliyanti S.Pd, M.Si teman seperjuangan, Selamat yang terkasih dan sahabatku Betty Ruliana yang selalu menemani dalam suka dan duka. Ricca, lisa dan keluarga yang telah memotivasi penulis dari segi moril maupun material. Pak Ahmad Supriyadi S.I.P. dan Pak Surya yang banyak membantu

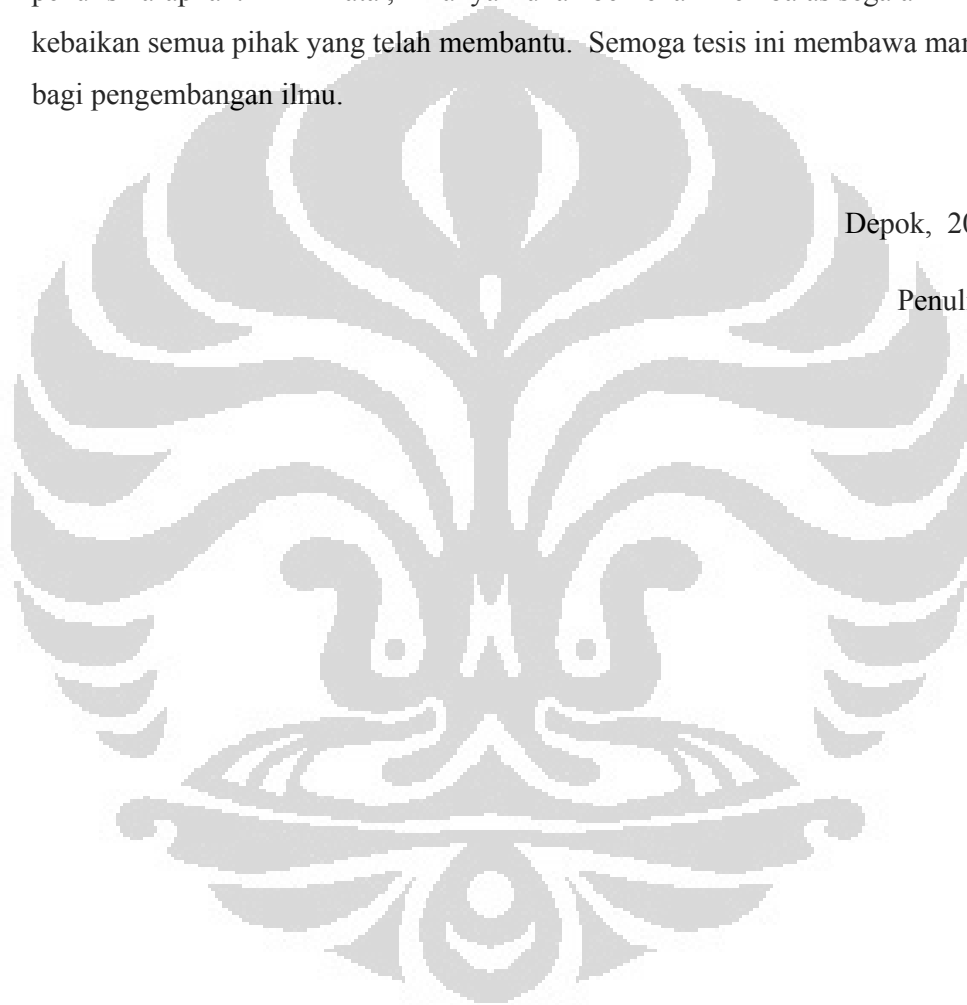
dalam pelaksanaan penelitian, serta seluruh rekan kerja di SMA Stella Maris, BSD yang banyak membantu penulis dalam pelaksanaan tugas di sekolah.

- (6) Papa, mama yang terkasih serta adik-adik yang selalu mendorong untuk lebih maju.

Penelitian dan penulisan tesis ini masih jauh dari yang diharapkan karena keterbatasan ilmu penulis miliki, sehingga saran dan kritik membangun sangat penulis harapkan. Akhir kata, Kiranya Tuhan berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Depok, 2011

Penulis



**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai Civitas Akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Cisca Lasmaria
NPM : 0806420322
Program Studi : Pasca Sarjana
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Tesis

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

**ANTIOKSIDAN YANG DIHASILKAN KAPANG *Aspergillus* spp. DAN
PENGARUHNYA TERHADAP PERBAIKAN JARINGAN HATI TIKUS
PUTIH (*Rattus norvegicus* L.) GALUR Sprague Dawley**

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan).

Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 15 Juli 2011

Yang menyatakan

(Cisca Lasmaria)

Name : Cisca Lasmaria (0806420322)
Title : Antioxidant produced by *Aspergillus* spp. and the effect to recovered liver tissues on Rat (*Rattus norvegicus*) Strain Sprague-Dawley.

Thesis Adviser: Dr. Wibowo Mangunwardoyo M.Sc
Dr. Dadang Kusmana M. S

SUMMARY

The change of lifestyle in the developing country like in Indonesia has triggered a degenerative disease. The disease that caused by the damage of cell or tissue as the result of an unbalanced system between free radicals compound and endogenous antioxidant compound that produced by the body. Therefore the body needs antioxidant substance that can scavenge the free radical. So it can't induct the disease.

Antioxidant has a function which scavenge the free radical, so it can detain the degenerative disease. The search of natural antioxidant has to be continued because synthetic antioxidant like t-butyl hydroxy toluene (BHT) and t-butyl hydroxy anisol (BHA) can trigger a negative effect to our health. The anxiety through the negative effect of the synthetic antioxidant make the natural antioxidant is able to make the natural antioxidant become an alternative choice.

Nowadays, the development of natural antioxidant compound has been replaced replacing the synthetic antioxidant compound that the using of them already had spread widely. Some natural antioxidants originated intensively microorganism has been isolated. Indonesia as megabiodiversity country has got a various natural sources, but only a small amount of them explored.

Kawai *et al.* 1993 said that antioxidant compound was produced by *Penicillium chevalieri* and *Aspergillus niger*. University of Indonesia Culture Collection (UICC) has many collections of microorganism culture hasn't optimized well used exactly for human importance in food sector, industry,

agriculture and health. One of the culture collection UICC which used in this research is the group of *Aspergillus* spp.

The research presented two title. The first one is the antioxidant produced by *Aspergillus* spp. intend to screen the twelve strains *Aspergillus* spp. UICC collection and produce antioxidant compound also analyze chemically Phytochemical method and Thin Layer Chromatography method and examine antioxidant compound activity with DPPH method. The second title is : The Effect of *Aspergillus* spp. extract antioxidant to the liver tissue recovery of white rat *Rattus norvegicus* L. strain Sparague-Dawley. It is intended to verify the effect of antioxidant given which produced by selected *Aspergillus* spp. to recover inside liver tissue organ of the test animals. The research is implemented in microbiology laboratory and reproduction and development laboratory. Chemical analysis laboratory, pharmacy department, mathematic and science faculty, University of Indonesia, Balitro, Bogor. Research time : August 2009 – September 2010.

The analysis result of extract of etyl acetat of 12 culture *Aspergillus* spp. that have been tested contains alkaloid, flavonoid, triterpenoid and glycoside group compound and doesn't contain saponin, tannin, fenolic and steroid group compound. Alkaloid, flavonoid, triterpenoid, and glycoside compound that contain inside etyl acetat extract has an activity as antioxidant. Alkaloid compound indicates a very strong positive (+++) in *A niger*, *A. phoenicus* UICC 13, *A. niger* UICC 75, *A. awamori* UICC 9, *A. awamori* UICC 30, *A. ficuum* UICC 5, *A. ficuum* UICC 46 and *A. niger* UICC 77 culture. Alkaloid compound indicates a strong positive (++) in *A. tubingensis* UICC 27, *A. niger* UICC 371, *A. awamori* UICC 31, *A. ficuum* UICC 41 culture. Triterpenoid compound indicates a very strong positif (+++) in *A. niger* UICC 371 culture. Triterpenoid compound indicates a positive only in *A. awamori* UICC 9. Triterpenoid contents indicates a weak positive (+) in *A. niger*, *A. tubingensis* UICC 27, *A. phoenicus* UICC 13, *A. ficuum* UICC 5, *A. ficuum* UICC 46, *A. ficuum* UICC 41 and *A. niger* UICC 77 culture. Flavonoid compound contents in the 12 *Aspergillus* spp. culture indicates a weak positive (+). Glycoside contents shows a very strong positive (+++) in *A.*

phoenicus UICC 13 culture. Glycoside contents indicates a strong positive in *A. niger*, *A. tubingensis* UICC 27, *A. niger* UICC 75, *A. niger* UICC 371, *A. awamori* UICC 9, *A. awamori* UICC 31, *A. ficuum* UICC 5, *A. ficuum* UICC 46, *A. ficuum* UICC 41 & *A. niger* UICC 77.

Antioxidant production on the 12 *Aspergillus* spp. that's grown on MYPG medium, was incubated for 14 days, in room temperature (26-29°C) without shaking condition and fermentation result was extracted with etyl-acetat (1:1). The average percentage of antioxidant extract production is 0.19 – 1.82. The highest is *Aspergillus niger* and the lowest is *Aspergillus niger* UICC 77.

When the fermentation process changing, the 12 *Aspergillus* spp. make pH changed. The first fermentation pH is 6.8 and the last of fermentation pH is 7.0. It means that there is a pH decreasing to acid between pH 6 (*Aspergillus niger*, *A. tubingensis* UICC 27, *A. niger* UICC 371, *A. awamori* UICC 30, *A. awamori* UICC 31, *A. ficuum* UICC 5, *A. ficuum* UICC 46, *A. ficuum* UICC 41 and *A. niger* UICC 77), while in *A. phoenicus* UICC 13, *A. niger* UICC 75 and *A. awamori* UICC 9, the pH increases into pH neutral (7.0).

Thin Layer Chromatography analysis uses a silica gel F₂₅₄ flake, observed in λ 254 nm, with eluen chloroform : methanol (88: 12) (v/v). The value of observed Rf was 0.15 – 0.22 and standard antioxidant Rf is 0.16.

The sample with the highest Rf is *Aspergillus niger* UICC 77 and *Aspergillus niger* UICC 371 and the lowest is *Aspergillus ficuum* UICC 5. The sample which has an equal standard with Rf is *Aspergillus awamori* UICC 9. *Aspergillus niger*, *Aspergillus phoenicus* UICC 13. These show that these three samples contain antioxidant, which is analyzed using Thin Layer Chromatography (TLC) method. Hanani *et al.* (2005) reported that for determinating the antioxidant compound inside *Callyspongia* sp, extract with Thin Layer Chromatography (TLC) Rf sample has the same Rf value Rf standard is 0.33.

Spectro-densitometre is a tool which used for analyzing the quantity and quality of the presence of a compound. Picture 1.3 shows the 3-dimension picture from antioxidant compound which produced by 12 *Aspergillus* spp. UICC

collection. Analyzing using TLC scanner CAMAG 3, shows the peak of antioxidant standard curve (139.72), the lowest found at *A. ficuum* UICC 41 (49.53) and the highest is at *A. awamori* UICC 9 (179.08).

The result of antioxidant activity using DPPH method shows *Aspergillus awamori* UICC 9 extract using etyl-acetat has 1359.5 ppm of EC_{50} . It shows that extract has a weak antioxidant activity because it contain more than 200 μ g/ml of EC_{50} . *Aspergillus awamori* UICC 9 extract that using etyl-acetat contains antioxidant compounds semi polar and having a possibly to extract the small amount polar compound.

Based on macroscopic observation, the liver texture of rat *Rattus norvegicus* Sparague-Dawley looks glossy and red on treatment K1 group (control negative). On the treatment of 0.36 mg/day dose (KP1), liver texture still glossy but its colour changed a little bit pale in red. On the treatment of 1.08 mg/day (KP3) there is no colour changing and still glossy .

Average of the diameter of central veins K1, K2, KP1, KP2 and KP3 consecutive 56.81; 72.82; 69.15; 66.86 and 61.61 (μ m). Whereas the result of biochemical and histopatologic examination, the collateral of the liver tissue found of control (K2) compared to K1, KP1, KP2 and KP3. From the histological smear of indicates KP1, KP2 and KP3 that hepatocyte cell repaired. The result of serum glutamate oxaloacetic transferase (SGOT) analysis after giving antioxidant *Aspergillus awamori* UICC 9 extract with KP1 treatment (0.36 mg/day), KP2 treatment (0.72 mg/day) and KP3 treatment (1.08 mg/day) indicate decreasing of concentration if compared with K2 (positive control). It has a significant differences through all doses ($P > 0.05$). The best decreasing of SGOT concentration found in KP3 treatment (1.08 mg/day). The result serum glutamate piruvate transferase (SGPT) analysis after giving antioxidant *Aspergillus awamori* UICC 9 extract with KP1 treatment (0.36 mg/day), KP2 treatment (0.72 mg/day) and KP3 treatment (1.08 mg/day) indicate decreasing of concentration if compared with K2 (positive control). It has a significant differences through all doses ($P > 0.05$) The best decreasing of SGPT concentration found in KP3 treatment (1.08 mg/day).

ABSTRAK

Nama : CISCA LASMARIA
Program Studi : BIOLOGI
Judul : ANTIOKSIDAN YANG DIHASILKAN
KAPANG *Aspergillus* spp. KOLEKSI
UNIVERSITY OF INDONESIA CULTURE
COLLECTION (UICC)

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan skrining kapang *Aspergillus* spp. koleksi *University of Indonesia Culture Collection* (UICC), fermentasi dan analisis produksi antioksidan. Hasil skrining antioksidan dari 12 biakan *Aspergillus* spp. menggunakan metode fitokimia mengandung senyawa antioksidan: flavonoid, triterpenoid, alkaloid dan glikosida. Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan BHT sebagai standart dari 12 *Aspergillus* spp. menunjukkan *Aspergillus awamori* UICC 9 memiliki nilai Rf yang hampir sama dengan standart. Analisis DPPH (2,2 diphenil-1-pikrihidrazil) mengkonfirmasi antioksidan *Aspergillus awamori* UICC 9 memiliki EC₅₀ sebesar 1359.5 ppm.

Kata kunci :

Aspergillus spp., Antioksidan, fitokimia, Kromatografi Lapis Tipis (KLT), 2,2 diphenil-1-pikrihidrazil (DPPH), EC₅₀

ABSTRACT

The aim of this research is to screen *Aspergillus* spp molds, that belonged to the University of Indonesia Culture's Collection (UICC) for antioxidant production. The result of phytochemical analysis process of 12 *Aspergillus* spp. consist of flavonoid, triterpenoid, alkaloid and glycoside. The Thin Layer Chromatography (TLC) using BHT as standart to analyse of 12 *Aspergillus* spp. show that Rf value of *Aspergillus awamori* UICC 9 has Rf value is same as standart (0.16). An antioxidant activity using DPPH (2,2 diphenil-1-pikrihidrazil) analysis confirmed that *Aspergillus awamori* UICC 9 has EC₅₀ is 1359.5 ppm.

Keywords.:

Aspergillus spp., antioksidant, phytochemical, Thin Layer Chromatography (TLC), 2,2 diphenil-1-pikrihidrazil (DPPH), EC₅₀

ABSTRAK

Nama : CISCA LASMARIA
Program Studi : BIOLOGI
Judul : PENGARUH ANTIOKSIDAN EKSTRAK
Aspergillus spp. TERHADAP PERBAIKAN
JARINGAN HATI TIKUS PUTIH (*Rattus
norvegicus* L.) GALUR SPRAGUE-DAWLEY

Aspergillus spp merupakan kapang penghasil senyawa metabolit sekunder yang berperan sebagai antioksidan. Penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus *Rattus norvegicus* L yang dibagi secara acak dalam 5 kelompok, masing-masing terdiri dari 5 ekor : K1 (diberi aquades), K2 (CMC5%), Kelompok perlakuan pemberian ekstrak *Aspergillus awamori* dengan tiga macam dosis: KP1 (0,36 mg/hari); KP2 (0,72 mg/hari) & KP3 (1,08 mg/hari) dan menganalisis pengaruhnya terhadap perbaikan jaringan hati tikus putih, Percobaan dilakukan selama 9 hari. CCl₄ diberikan pada hari ke-10, kecuali kelompok K1. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak antioksidan dari fermentasi *Aspergillus awamori* pada dosis 0,36 mg/ hari; 0,72 mg/hari dan 1,08 mg/hari secara statistik dengan analisis varians berpengaruh nyata pada rerata diameter vena sentralis, kadar SGOT dan SGPT darah tikus putih dibandingkan dengan kontrol (P<0,05). Hasil DMRT menunjukkan bahwa rerata diameter vena sentralis antar kelompok perlakuan tidak terdapat perbedaan yang bermakna, tetapi dibanding dengan K2 berbeda secara bermakna, rerata kadar SGOT menunjukkan kelompok perlakuan KP2 dan KP3 berbeda secara bermakna dengan KP1 dan K2; rerata kadar SGPT antar kelompok perlakuan tidak terdapat perbedaan yang bermakna, Kelompok perlakuan dosis 1,08 mg/hari (KP3) berbeda secara bermakna jika dibandingkan dengan K2. Hasil yang paling baik dalam memperbaiki kerusakan jaringan hati pada penelitian ini adalah kelompok dosis 1,08 mg/hari (KP3).

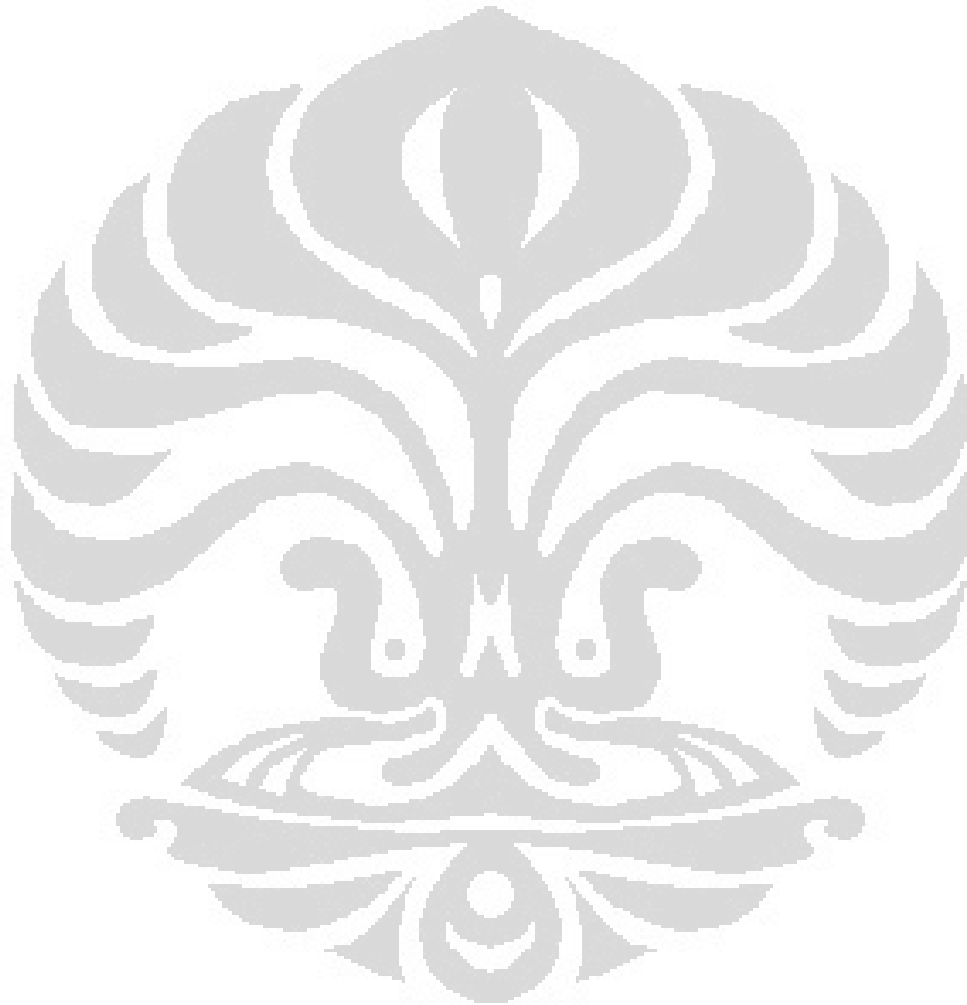
Kata kunci : Antioksidan, Serum Glutamat Oksaloasetat Transaminase (SGOT), Serum Glutamat Piruvat Transaminase (SGPT)

ABSTRACT

Apergillus spp are molds produced secondary metabolite as antioxidant. In this study using 25 rats are divided by randoms in 5 groups. Every group consist of 5 rats : K1 (aquades); K2 (CMC5%); Three groups are given by extract antioxidant produced from fermentation of *Aspergillus awamori* UICC 9 with various of doses (0.36 mg/day; 0.72 mg/day; 1.08 mg/day) on the rats and examined the effect on repaired in liver tissues of rats for 9 days. CCl₄ given to every group on the 10th days except group K1. The research show that extract of antioxidant dose are given 0.36 mg/day; 0.72 mg/day; 1.08 mg/day are significant effect of mean diametre of centralis of vein, Concentration of Serum Glutamate Oxaloacetat Transferase (SGOT) and Serum Glutamat Piruvat Transferase (SGPT) compared

with negative control (K1). The result of DMRT shows mean diameter of centralis vein between of the treatment non significant, if compared by K2 are significant effect. The mean concentration of SGOT shows treatment KP2 and KP3 are significant compared by KP1 and K2. The mean concentration of SGPT shows non significant between the treatment. The best result of repaired liver tissues on this research are extract antioxidant dose 1.08 mg/day.

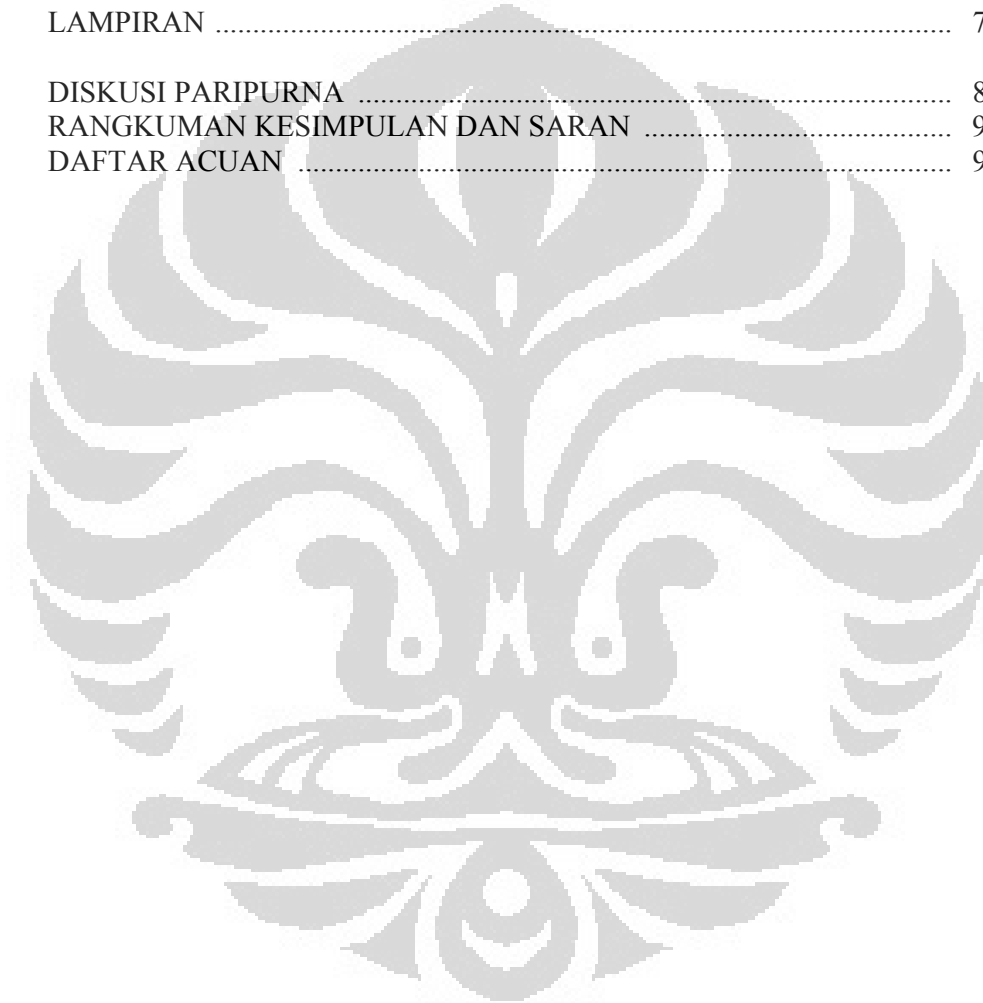
Key words : *Antioxidant, Serum Glutamat Oksaloasetat Transaminase (SGOT), Serum Glutamat Piruvat Transaminase (SGPT)*



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
LEMBAR PENGESAHAN.....	v
KATA PENGANTAR	vi
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	viii
SUMMARY	ix
ABSTRAK	xiii
DAFTAR ISI.....	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xviii
DAFTAR TABEL.....	xix
PENGANTAR PARIPURNA	1
MAKALAH I: ANTIOKSIDAN YANG DIHASILKAN KAPANG <i>Aspergillus</i> spp. KOLEKSI UNIVERSITY OF INDONESIA CULTURE COLLECTION (UICC)	
I. PENDAHULUAN	5
1.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	7
1.2 Bahan, Alat dan Cara Kerja	7
2. HASIL DAN PEMBAHASAN	14
2.1 Pengamatan makroskopis dan mikroskopis <i>Aspergillus</i> spp.....	14
2.2 Uji Antioksidan <i>Aspergillus</i> spp. dengan metode fitokimia	14
2.3 Analisis kualitatif dan kuantitatif Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	18
2.4 Perubahan pH awal dan akhir selama fermentasi	24
2.5 Produksi antioksidan dan <i>Aspergillus awamori</i> UICC 9.....	25
2.6 Analisis aktivitas antioksidan <i>Aspergillus awamori</i> UICC 9 dengan metode DPPH.....	27
3. KESIMPULAN DAN SARAN	30
3.1 Kesimpulan	30
3.2 Saran	30
DAFTAR ACUAN	31
LAMPIRAN	36
MAKALAH II : PENGARUH EKSTRAK ANTIOKSIDAN KAPANG <i>Aspergillus</i> spp. TERHADAP PERBAIKAN JARINGAN HATI TIKUS (<i>Rattus norvegicus</i> L.) GALUR Sprague Dawley	
1. PENDAHULUAN	48
1.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	50

1.2 Alat, Bahan dan Cara Kerja	50
2. HASIL DAN PEMBAHASAN	55
2.1 Pengamatan makroskopis hati hewan uji	55
2.2 Pengamatan mikroskopis hati hewan uji.....	57
2.3 Analisis kadar SGOT dan SGPT dalam darah hewan uji	65
3. KESIMPULAN DAN SARAN	69
3.1 Kesimpulan	69
3.2 Saran	69
DAFTAR ACUAN	70
LAMPIRAN	74
DISKUSI PARIPURNA	85
RANGKUMAN KESIMPULAN DAN SARAN	93
DAFTAR ACUAN	95



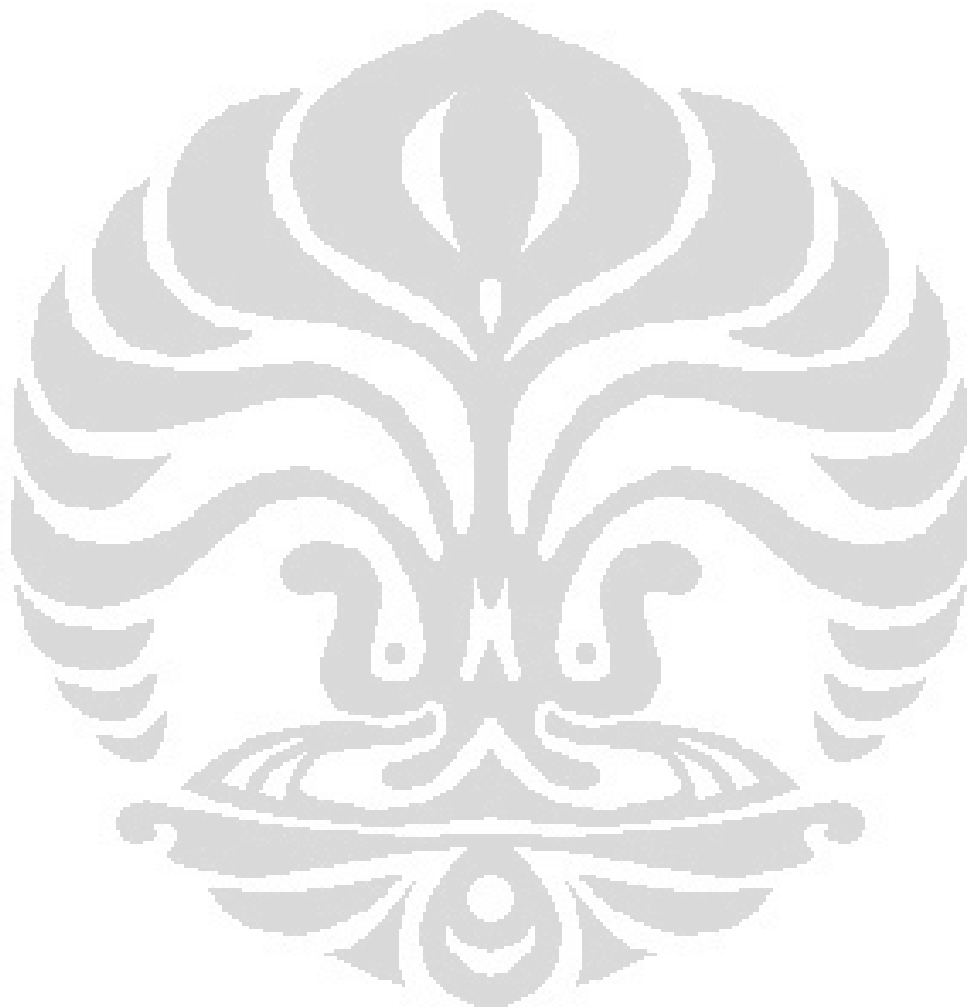
DAFTAR GAMBAR

GAMBAR	Hal
1.1 Diagram batang kadar rendemen ekstrak <i>Aspergillus</i> spp. koleksi University of Indonesia Culture Collection (UICC)	18
1.2 Grafik nilai Rf dua belas sampel <i>Aspergillus</i> spp.koleksi University of Indonesia Culture Collection (UICC)	19
1.3 Densitogram dua belas sampel <i>Aspergillus</i> spp. koleksi University of Indonesia Culture Collection UICC	21
1.4a Diagram % BHT ekstrak <i>Aspergillus</i> spp. Kolekisi University of Indonesia Culture Collection (UICC)	23
1.4b Diagram % BHT bahan <i>Aspergillus</i> spp. Kolekisi University of Indonesia Culture Collection (UICC)	24
1.5 Diagram perubahan pH medium pada awal dan akhir fermentasi	25
1.6. Grafik persentase penghambatan radikal bebas dengan ekstrak etil asetat <i>Aspergillus awamori</i> UICC 9	28
2.1 Gambar organ hati <i>Rattus norvegicus</i> tiap kelompok perlakuan	55
2.2 Diagram rerata berat basah organ hati <i>Rattus norvegicus</i> (gram)	56
2.3 Diagram batang rerata diameter vena sentralis hati <i>Rattus norvegicus</i> L	57
2.4 Gambaran histologis organ hati normal <i>Rattus norvegicus</i> L.....	59
2.5 Gambaran histologis organ hati <i>Rattus norvegicus</i> tiap kelompok Perlakuan dengan perbesaran 10 x 40	60
2.6 Diagram batang persentase rata-rata lobulus hati normal dan Kerusakan lobulus hati (derajat 1,2 dan 3) tiap kelompok Perlakuan	64
2.7 Diagram batang rerata kadar SGOT <i>Rattus norvegicus</i> L. (μ /L)	65
2.8 Diagram batang rerata kadar SGPT <i>Rattus norvegicus</i> L. (μ /L)	66

DAFTAR LAMPIRAN

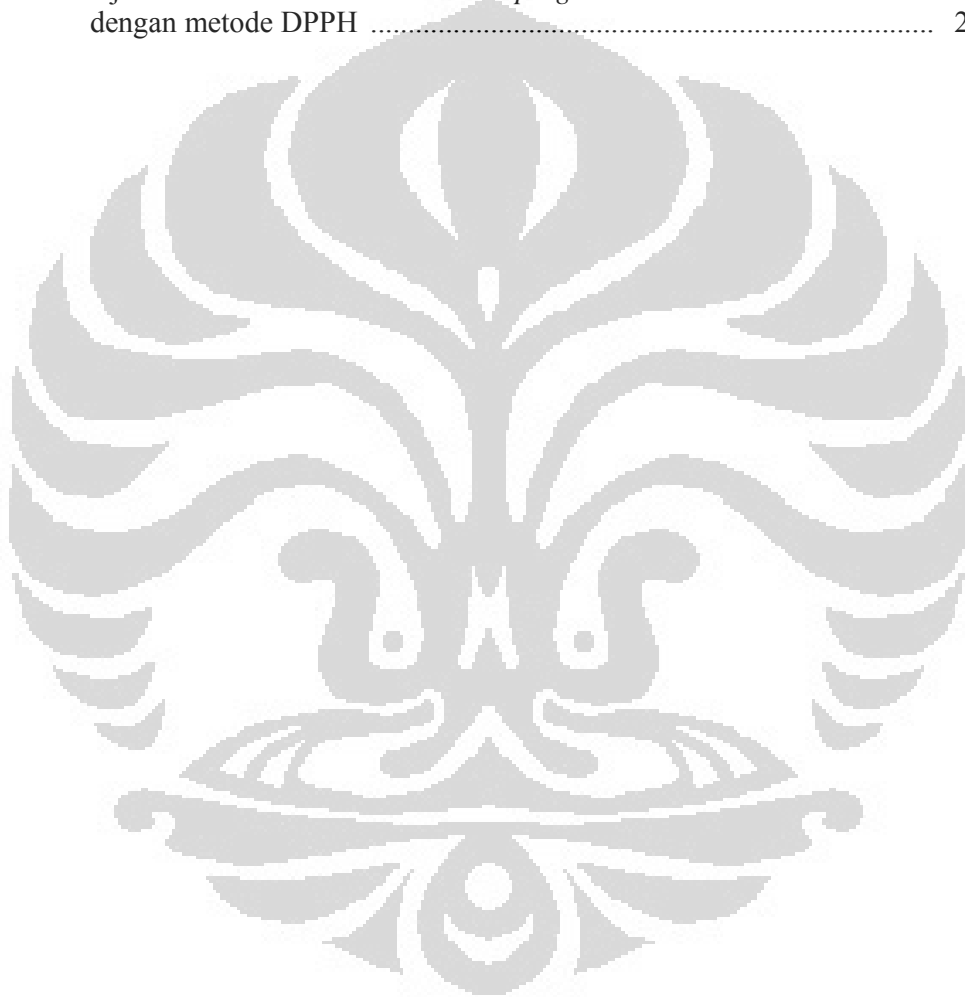
Lampiran	Hal
1.1 Pengamatan makroskopis dan mikroskopis 12 <i>Aspergillus</i> spp. koleksi UICC.....	34
1.2 Alur kerja persiapan inokulum 12 <i>Aspergillus</i> spp. Koleksi UICC.....	36
1.3 Alur kerja fermentasi produksi antioksidan	37
1.4 Alur kerja analisis kadar antioksidan dengan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis)	38
1.5 pH awal dan pH akhir medium MYPG pada fermentasi <i>Aspergillus</i> spp. koleksi UICC	39
1.6 Rendemen ekstrak <i>Aspergillus</i> spp. koleksi UICC	39
1.7 Fermentasi kultur terendam <i>Aspergillus awamori</i> UICC 9	40
1.8 Nilai Rf <i>Aspergillus</i> spp. koleksi UICC	44
2.1 Komposisi nutrisi dalam pakan uji <i>Rattus norvegicus</i> L.	74
2.2 Gambar pemberian ekstrak antioksidan secara oral menggunakan sonde	74
2.3 Hasil pengamatan makroskopis dan mikroskopis <i>Aspergillus awamori</i> UICC 9	75
2.4. Pengambilan darah pada tikus melalui sinus orbitalis	75
2.5 Komposisi larutan yang digunakan dalam pembuatan persediaan Histologist	76
2.6 Berat hati <i>Rattus norvegicus</i> L. (gram).....	76
2.7 Rerata diameter vena sentralis hati <i>Rattus norvegicus</i> L	77
2.8 Data persentase rata-rata lobulus hati normal dan derajat kerusakan lobulus hati tiap kelompok perlakuan (%)	78
2.9 Kadar SGOT darah <i>Rattus norvegicus</i> (μ /L)	79
2.10 Kadar SGPT darah <i>Rattus norvegicus</i> (μ /L)	79

2.11 Anova diameter vena sentralis <i>Rattus norvegicus</i> (μ /L).....	80
2.12 Anova kadar SGOT darah <i>Rattus norvegicus</i> L.....	81
2.13 Anova kadar SGPT darah <i>Rattus norvegicus</i> L.....	83



DAFTAR TABEL

TABEL	Halaman
1.1 Uji Fitokimia ekstrak <i>Aspergillus</i> spp, koleksi <i>University of Indonesia Culture Collection</i> (UICC)	17
1.2 Uji aktivitas antioksidan ekstrak <i>Aspergillus awamori</i> UICC 9 dengan metode DPPH	28



PENGANTAR PARIPURNA

Pesatnya perubahan gaya hidup di abad ini, terutama di negara berkembang, sangat berperan pada timbulnya penyakit degeneratif. Penyakit degeneratif seperti kanker, tekanan darah tinggi, penyakit gula, penyakit hati dan lain sebagainya semakin banyak dan mudah ditemui di masyarakat. Penyakit degeneratif diakibatkan karena proses metabolisme tubuh yang menghasilkan radikal bebas berlebihan sehingga mengakibatkan kerusakan pada fungsi sel-sel tubuh (Hellowel & Guttenridge, 1999).

Penggunaan senyawa antioksidan semakin berkembang baik untuk makanan maupun untuk pengobatan seiring dengan bertambahnya pengetahuan tentang aktivitas radikal bebas (Boer, 2000). Stress oksidatif merupakan keadaan yang tidak seimbang antara jumlah molekul radikal bebas dan antioksidan didalam tubuh (Trilaksani, 2003). Senyawa antioksidan merupakan suatu inhibitor yang digunakan untuk menghambat autooksidasi yang berperan pada timbulnya penyakit degeneratif. Antioksidan sintetis seperti BHA, BHT dan TBHQ dilaporkan memiliki aktivitas proliferasi sel kanker, saat ini pencarian antioksidan alami menjadi pusat perhatian para peneliti. Antioksidan diketahui dihasilkan oleh beberapa mikroorganisme sebagai hasil metabolit sekunder. Aoyama *et al.* (1982) melaporkan bahwa *Penicilium* sp. menghasilkan senyawa asam curvulic sebagai hasil metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Ge *et al.* (2009) juga melaporkan *Aspergillus fumigatus* menghasilkan senyawa bioaktif alkaloid *9-deacetoxyfumigaclavine C (1)* dan alkaloid *9-deacetoxyfumigaclavine C (2)*. Hopan jenis pentasiklik triterpenoid sebagai senyawa metabolit sekunder yang diisolasi dari kapang *Aspergillus varicolor* B-17 (Wang *et al.* 2009).

Indonesia adalah salah satu negara megabiodiversitas setelah negara Brazil yang sangat kaya akan keanekaragaman hayati, baik dari kelompok tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme, namun hanya sebagian kecil saja yang dieksplorasi, diteliti serta dimanfaatkan (Dharmawan *et al.* 2006). *University of Indonesia Culture Collection* (UICC) mempunyai koleksi *Aspergillus* spp. yang dikoleksi

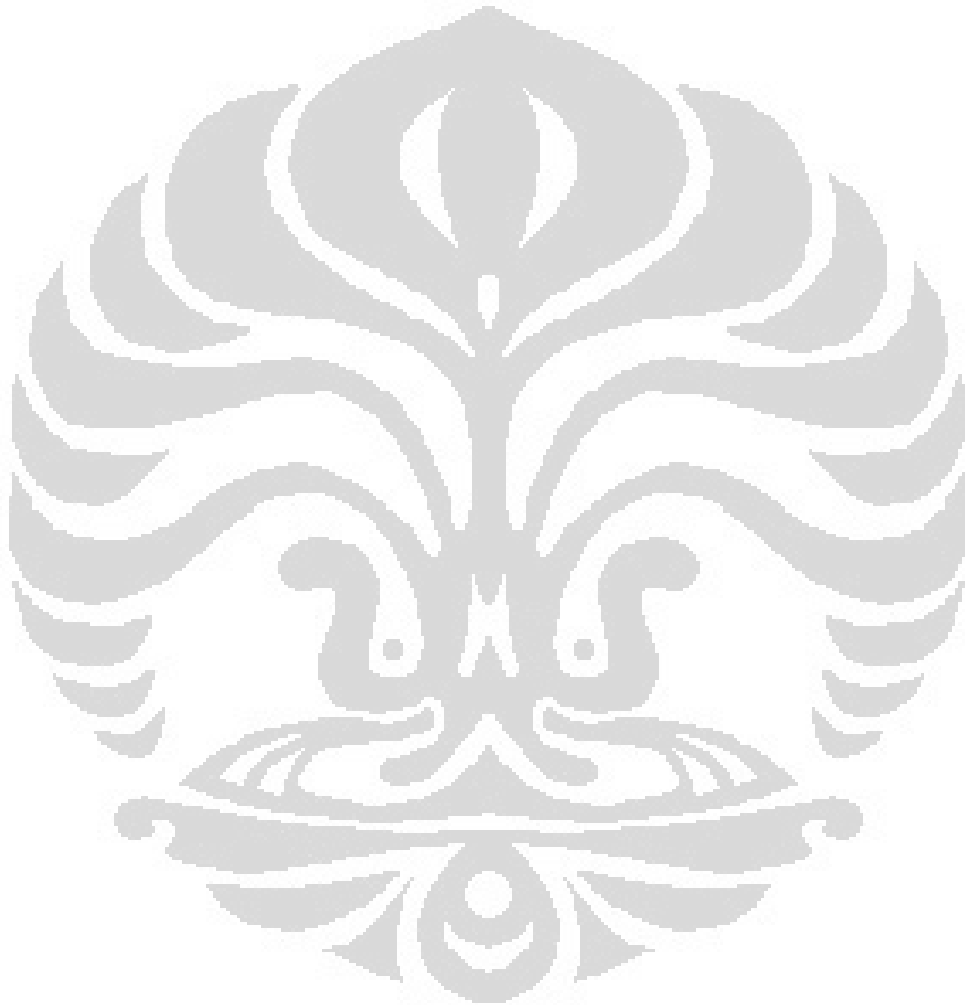
dari berbagai substrat di Indonesia. Hal tersebut dapat menjadi sumber daya potensial Indonesia dalam memproduksi senyawa antioksidan alamiah.

Aspergillus spp. koleksi UICC ditumbuhkan dalam medium MYPG dan diinkubasi selama 14 hari pada suhu kamar (26-29°C) dengan kondisi tanpa pengocokan. Setelah diinkubasi pada hari ke-14 filtrat biakan dipisahkan dari miselium dengan filtrasi menggunakan kertas saring Whatman no.1 dengan di *vacuum pump* kemudian filtrat biakan yang dihasilkan dicampur dengan etil asetat dengan perbandingan sama. Campuran tersebut kemudian digoyang dan dimasukkan dalam suatu *separatory funnel* dan terbentuk lapisan etil asetat yang terakumulasi. Ekstrak etil asetat yang telah melewati kertas saring dan didehidrasi dengan natrium sulfat anhidrat 1%, kemudian pelarut dihilangkan dalam vakum menggunakan evaporator pada suhu 30°C sehingga terbentuk ekstrak sampel (Kawai *et al.* 1994). Identifikasi kandungan kimia menggunakan pereaksi kimia dalam ekstrak sampel *Aspergillus* spp. terhadap senyawa-senyawa antioksidan menggunakan metode fitokimia (Harborne, 1987). Pemeriksaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dalam ekstrak sampel *Aspergillus* spp. dilakukan terhadap adanya senyawa antioksidan yang memberikan hasil positif pada pemeriksaan menggunakan pereaksi kimia (Kawai *et al.* 1994; Nyoman *et al.* 2004).

Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH karena sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel. Senyawa antioksidan akan bereaksi dengan radikal DPPH melalui mekanisme donasi atom hidrogen dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu ke kuning yang diukur pada panjang gelombang 517 nm (Okawa, 2001; Hanani *et al.* 2005).

Penelitian disajikan dalam dua judul makalah. Makalah pertama berjudul : Antioksidan yang dihasilkan kapang *Aspergillus* spp., bertujuan untuk melakukan skrining terhadap dua belas strain *Aspergillus* spp koleksi UICC dan memproduksi senyawa antioksidan serta menganalisis secara kimiawi dengan metode fitokimia dan kromatografi lapis tipis dan aktivitas senyawa antioksidan dengan metode DPPH. Makalah kedua berjudul: Pengaruh Antioksidan ekstrak *Aspergillus* spp. terhadap perbaikan jaringan hati tikus putih *Rattus norvegicus* L. galur Sprague- Dawley, bertujuan menguji pengaruh pemberian antioksidan yang

dihasilkan *Aspergillus* spp. terpilih terhadap perbaikan dalam jaringan hati organ hewan uji.



Makalah I**ANTIOKSIDAN YANG DIHASILKAN KAPANG *Aspergillus*
Spp. KOLEKSI UNIVERSITY OF INDONESIA CULTURE
COLLECTION (UICC)****Cisca Lasmaria**

clmelastoma@gmail.com

ABSTRACT

The aim of this research is to screen *Aspergillus* spp molds, that belonged to the University of Indonesia Culture's Collection (UICC) for antioxidant production. The result of phytochemical analysis process of 12 *Aspergillus* spp. consist of flavonoid, triterpenoid, alkaloid and glycoside. The Thin Layer Chromatography (TLC) using BHT as standart to analyse of 12 *Aspergillus* spp. show that Rf value of *Aspergillus awamori* UICC 9 has Rf value is same as standard (0.16). An antioxidant activity using DPPH (2,2 diphenil-1-pikrihidrazil) analysis confirmed that *Aspergillus awamori* UICC 9 has EC₅₀ is 1359.5 ppm.

Keywords.: *Aspergillus* spp., antioxidant, phytochemical, Thin Layer Chromatography (TLC); 2,2 diphenil-1-pikrihidrazil (DPPH), EC₅₀

1. PENDAHULUAN

Perubahan pola hidup di negara berkembang seperti di Indonesia, akan memicu munculnya penyakit degeneratif yaitu penyakit yang timbul karena terjadinya kerusakan sel atau jaringan akibat ketidakseimbangan antara senyawa radikal bebas dengan senyawa antioksidan endogen yang dihasilkan tubuh (Irene dan Kusnandar, 1999; Nainggolan, 2005). Berbagai faktor fisika dan kimia dapat memicu penyakit degeneratif, misalnya, adanya logam-logam berat, asam lemak tak jenuh, pemanasan yang berlebihan, bahan pewarna, pengawet dan cahaya radiasi akibat *global warming* (Lisdawati *et al.* 2006). Radikal bebas adalah atom atau molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif karena mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Untuk mencapai kestabilan atom atau molekul, radikal bebas akan bereaksi dengan molekul disekitarnya dalam usaha memperoleh pasangan elektron. Reaksi ini akan berlangsung terus-menerus di dalam tubuh dan bila tidak dihentikan akan menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini, serta penyakit degeneratif lainnya. Oleh karena itu, tubuh memerlukan substansi penting berupa antioksidan yang mampu menangkap radikal bebas tersebut sehingga tidak dapat menginduksi penyakit (Andayani *et al.* 2008; Algameta, 2009).

Dalam tubuh manusia sehat, produksi radikal bebas diseimbangkan dengan sistem antioksidan dalam tubuh, akan tetapi stress oksidatif terjadi jika produksi radikal bebas melebihi jumlah antioksidan yang dihasilkan tubuh. Senyawa antioksidan akan bereaksi dengan radikal bebas, mengikat katalis logam bebas dan bertindak sebagai perangkap oksigen. Pencarian antioksidan alami terus dilakukan mengingat antioksidan sintetik seperti t-butil hidroksi toluene (BHT) dan t-butil hidroksi anisol (BHA) menimbulkan efek negatif terhadap kesehatan (Hernawan dan Anwar, 2003). Kekhawatiran terhadap efek samping antioksidan sintetik seperti BHT, BHA menyebabkan antioksidan alami menjadi alternatif (Sunarni *et al.* 2007).

Sampai saat ini pemanfaatan mikroorganisme salah satunya adalah kapang, di Indonesia masih belum optimal terutama di bidang farmakologi.

Kapang adalah kelompok mikroorganisme heterotrof, yang menggunakan senyawa karbon organik sebagai nutriennya dengan mensekresikan enzim secara ekstraseluler yang mengurai molekul organik kompleks menjadi molekul sederhana sehingga mudah diabsorpsi (Pelczar dan Chan, 1986; Gandjar *et al.* 2006). Kapang yang banyak dijumpai pada berbagai substrat antara lain genus *Aspergillus*. Genus *Aspergillus* menghasilkan senyawa metabolit sekunder (Samson dan Pitt, 1995). Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroorganisme pada genus *Aspergillus* banyak menarik perhatian, khususnya bagi industri yang memanfaatkan produk tersebut untuk tujuan komersial. Kapang banyak menghasilkan metabolit sekunder dengan struktur kimia kompleks yang disintesis melalui jalur poliketid atau protein, senyawa kompleks tersebut antara lain adalah senyawa antioksidan (Maryanto, 2004).

Kawai *et al.* (1993) melaporkan bahwa senyawa antioksidan dihasilkan kapang *Penicillium janthinellum*, *Penicillium commune*, *Penicillium herque*, *Eurotium chevalieri* dan *Aspergillus niger*. Penelitian *in vitro* yang dilakukan Nainggolan (2005) menunjukkan bahwa ekstrak *Aspergillus terreus* mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi, ditunjukkan dengan IC_{50} sebesar 44 ppm. Kawai *et al.* (1994) juga melaporkan bahwa ekstrak *Aspergillus niger* memiliki aktivitas antioksidatif tertinggi dibandingkan ekstrak *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus usami* dan *Aspergillus terreus*. Menurut Chin dan Lee, (1997) ekstrak etil asetat *Aspergillus candidus* yang difermentasikan pada medium kultur cair menunjukkan aktivitas antioksidan yang kuat.

University of Indonesia Culture Collection (UICC) memiliki koleksi kapang *Aspergillus* spp. yang belum diteliti kemampuannya dalam menghasilkan senyawa antioksidan. Sebagai upaya pencarian antioksidan alami, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui senyawa antioksidan dari koleksi *Aspergillus* spp. Penelitian bertujuan untuk skrining, memproduksi dan mengetahui adanya senyawa antioksidan yang dihasilkan oleh *Aspergillus* spp. koleksi *University of Indonesia Culture Collection* (UICC).

1.1. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, Depok, Jawa Barat, Ballitro, Bogor. Waktu penelitian : November 2009 – April 2010.

1.2. BAHAN, ALAT DAN CARA KERJA

1.2.1. BAHAN

1.2.1.1. Sampel

Sampel kapang *Aspergillus* spp. diperoleh dari koleksi kapang *Aspergillus* spp. *University of Indonesia Culture Collection* (UICC) . Sampel kapang *Aspergillus* spp. terdiri atas *Aspergillus awamori* UICC 9; *Aspergillus awamori* UICC 30; *Aspergillus awamori* UICC 31; *Aspergillus ficuum* UICC 5; *Aspergillus ficuum* UICC 41; *Aspergillus ficuum* UICC 46; *Aspergillus niger*; *Aspergillus niger* UICC 75; *Aspergillus niger* UICC 77; *Aspergillus niger* UICC 371; *Aspergillus phoenicus* UICC 13; *Aspergillus tubingensis* UICC 27.

1.2.1.2. Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah larutan alkohol 70%, larutan Etil asetat (Merck), Natrium sulfat anhidrat (Merck), Antioksidan Butylated Hydroxy Toluene (BHT) teknis sebagai standar, Larutan 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) (Merck) 1mM, methanol (Merck), Spiritus, Potato Dextro Agar (PDA) (Merck); Malt ekstrak (Merck), Yeast ekstrak-S (Merck), Pepton (Merck), Glukosa (Merck).

1.2.1.3. Medium

Medium isolasi dan peremajaan adalah Potato Dextro Agar (PDA) (Merck) medium fermentasi adalah MYPG terdiri dari: 0,3% malt ekstrak; 0,3% yeast ekstrak-S; 0,5% pepton, dan 1% glukosa (Kawai *et al.* 1993).

1.2.2. ALAT

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah jarum tanam bulat (ose), pembakar spiritus, tabung reaksi, autoklaf (OSK 6500), mikroskop (Olympus), oven (Heracus Instruments), pipet mikro, tip, vortex (Thermolyne), labu

Erlenmeyer, Spektrofotometer (Shimadzu 265), pH meter, Neraca analitis (Ohaus), Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan pelat kaca pralapis silica gel (Merck) (F₂₅₄) berukuran 20 x 20 cm² dengan ketebalan 0,2 mm, *TLC Scanner* CAMAG 3.

1.2.3. CARA KERJA

1.2.3.1. Pembuatan Medium

1.2.3.1.1 Potato Dextrose Agar (PDA)

Sebanyak 19 g bubuk PDA dilarutkan dalam 500 ml akuades, kemudian dipanaskan dan diaduk hingga homogen. Sebagian medium dituang kedalam beberapa tabung reaksi dan sebagian medium dituang ke dalam labu Erlenmeyer. Medium disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 15 menit. Selanjutnya medium dalam tabung reaksi diletakkan miring dan dibiarkan mengeras. Medium dalam labu Erlenmeyer dituang dalam cawan Petri steril masing-masing sebanyak 15 ml dan dibiarkan mengeras.

1.2.3.1.2 Malt Yeast Pepton Glukosa (MYPG) (Kawai *et al.* 1994)

Medium MYPG dibuat dengan mencampur 2,4 g malt ekstrak, 2,4 g yeast ekstrak, 4 g pepton dan 8 g glukosa dan dilarutkan dengan akuades sampai volume akhir 1000 ml. Campuran dipanaskan sambil diaduk hingga homogen. Medium dituang dalam beberapa labu Erlenmeyer 100 ml, masing-masing sebanyak 20 ml untuk uji skrining dan uji aktivitas antioksidan. Medium disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 15 menit.

1.2.3.2 Peremajaan biakan *Aspergillus* spp. Koleksi UICC

Peremajaan 12 biakan *Aspergillus* spp. koleksi UICC, dilakukan dengan memindahkan masing-masing biakan ke dua tabung reaksi berisi medium PDA. Satu sebagai *stock culture* dan yang lain sebagai *working culture*. Masa inkubasi berlangsung pada suhu ruang (26-29°C) selama 7 hari.

1.2.3.3 Pengamatan makroskopis dan mikroskopis biakan *Aspergillus* spp. koleksi UICC

Pengamatan ulang terhadap kemurnian 12 biakan *Aspergillus* spp. koleksi UICC dilakukan untuk mengenal/mengetahui sifat-sifat morfologi secara

makroskopis maupun mikroskopis pertumbuhan biakan *Aspergillus* spp.

Pengamatan dilakukan dengan menggunakan kunci identifikasi dari Raper dan Fennel (1965); Samson dan Pitt (1995) dan Gandjar *et al.* (1999) .

1.2.3.4 Total Plate Count (TPC) *Aspergillus* spp.

Total Plate Count (TPC) kapang *Aspergillus* spp. berumur 7 hari dimulai dengan menambahkan 5 ml H₂O steril ke dalam biakan, lalu mengeriknya dengan ose dan dihomogenkan dengan vortex selama 30 detik. Pengenceran 10⁻¹ dilakukan dengan mengambil 1 ml suspensi spora menggunakan mikropipet, dan memasukkannya ke dalam tabung berisi 9 ml H₂O steril lalu dihomogenkan dengan vortex selama 30 detik. Pengenceran 10⁻² dilakukan dengan mengambil 1 ml hasil pengenceran 10⁻¹ dan dituang ke dalam tabung berisi 9 ml H₂O steril lalu dihomogenkan dengan vortex selama 30 detik. Hal yang sama dilakukan sampai dengan pengenceran 10⁻⁷, 10⁻⁸ dan 10⁻⁹. Selanjutnya 100 µL suspensi spora diambil dari tiga pengenceran terakhir dengan mikropipet, lalu dituang ke dalam cawan petri berisi 15 ml medium PDA. Setelah itu meratakannya dengan spatel *Dryglsky* steril. Masa inkubasi berlangsung selama 48 jam. Selanjutnya menghitung jumlah koloni pada masing-masing pengenceran. Setiap pengenceran dilakukan 3 kali pengulangan. Jumlah spora per ml sampel di hitung berdasarkan Gandjar *et al.* (1992) :

Jumlah koloni rata-rata yang tumbuh

Jumlah volume sampel yang diinokulasi x faktor pengenceran

1.2.3.5. Fermentasi Antioksidan dari 12 *Aspergillus* spp. (Kawai *et al.* 1994).

1.2.3.5.1 Persiapan Inokulum

Dua belas biakan *Aspergillus* spp. yang berpotensi menghasilkan antioksidan diinokulasi dengan metode streak ke dalam tabung reaksi berisi 5 ml medium PDA. Masa inkubasi berlangsung selama 7 hari pada suhu ruang (26 - 29°C). Selanjutnya pembuatan inokulum, dengan menambah 5 ml aquades steril, lalu mengeriknya dengan ose. Terakhir dihomogenkan dengan vortex selama 30 detik (Lampiran 1.2).

1.2.3.5.2 Fermentasi Antioksidan

Fermentasi antioksidan menggunakan Erlenmeyer 250 ml yang berisi 50 ml medium MYPG pada pH 6,8. Pertama melakukan sterilisasi medium dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Medium didinginkan pada suhu ruang, kemudian 1 ml inokulum ($3,5 - 4 \times 10^7$ cfu/ml) ditambahkan ke dalam Erlenmeyer berisi MYPG. Masa inkubasi berlangsung selama 14 hari pada suhu 26- 29°C tanpa pengocokan (*still culture*).

1.2.3.5.3 Pembuatan ekstraksi dengan etil asetat (Chin dan Lee, 1997).

Filtrat biakan dipisahkan dari miselium dengan filtrasi menggunakan kertas saring Whatman no.1 dengan di *vacuum pump* kemudian filtrat biakan yang dihasilkan dicampur dengan etilasetat dengan perbandingan sama. Campuran tersebut kemudian di goyang dan dimasukkan dalam suatu *separatory funnel* dan terbentuk lapisan etilasetat yang terakumulasi. Ekstrak etil asetat yang telah melewati kertas saring dan didehidrasi dengan natrium sulfat anhidrat 1%, kemudian pelarut dihilangkan dalam vakum menggunakan evaporator pada suhu 30°C sehingga terbentuk ekstrak sampel.

1.2.4 Identifikasi senyawa antioksidan dengan metode fitokimia (Harborne, 1987)

1.2.4.1 Identifikasi alkaloid

Sebanyak 0,5 g sampel dicampur dengan 1 ml HCl 2 N dan ditambahkan dengan 9 ml akuades kemudian dipanaskan selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat yang didapat dibagi ke dalam 4 tabung, dan masing-masing bagian ditetesi dengan 2 tetes pereaksi Bouchardat LP, Mayer LP, Dragendorff LP dan Hager. Hasil dinyatakan positif bila setelah ditetesi Bouchardat terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam, ditetesi Dragendorff terbentuk endapan putih, ditetesi pereaksi Hager terbentuk endapan kuning, dan ditetesi pereaksi Meyer terbentuk endapan berwarna putih yang larut dalam methanol, dan ditetesi pereaksi Bouchardat terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam.

1.2.4.2 Identifikasi glikosida

Sebanyak 3 g ekstrak dimasukkan ke dalam labu 50 ml kemudian ditambahkan 30 ml larutan etanol dan dipanaskan selama 10 menit kemudian disaring untuk mendapatkan filtrat setelah itu ditambahkan 25 ml Pb asetat 5%, didiamkan 5 menit, kemudian disaring kedalam corong pemisah dan ditambah campuran chloroform dan isopropanol dengan perbandingan 3 : 3.

Lapisan bawah dimasukkan ke dalam cawan piringan penguap, dipanaskan pada suhu 40°C. Setelah cairan kental ditambahkan 2 ml methanol kedalam tabung reaksi menjadi 3 bagian: tabung pertama diuapkan hingga kering kemudian ditetesi 10 tetes H₂SO₄ pekat dan ditambah 5 ml asam asetat anhidrat sehingga terbentuk warna biru/hijau; tabung kedua diuapkan hingga kering kemudian ditambah 2 ml air dan ditetesi dengan 5 tetes molish kemudian ditambahkan 2 ml H₂SO₄ sehingga terbentuk cincin ungu; tabung ketiga diuapkan hingga kering kemudian ditambahkan 3 ml asam asetat glasial selanjutnya dipanaskan sebentar dan didinginkan, ditambahkan 1 tetes FeCl₃ 1% kemudian ditambahkan pula dengan hati-hati 3 ml asam sulfat (H₂SO₄) pekat. Campuran dibiarkan beberapa menit sehingga terbentuk warna merah kecoklatan dan berubah menjadi cincin berwarna keunguan. Perubahan tersebut menunjukkan adanya glikosida.

1.2.4.3 Identifikasi steroid/triterpenoid

Sebanyak 5 ml ekstrak ditambah dengan pereaksi Lieberman Bouchard yang terdiri dari 5 ml asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat 5 tetes. Terbentuknya warna merah berubah menjadi hijau, ungu dan terakhir biru, menunjukkan hasil positif steroid dan triterpenoid.

1.2.4.4 Identifikasi flavonoid

Sebanyak 1 g ekstrak dilarutkan dalam 50 ml air, dipanaskan dan disaring. Sebanyak 5 ml filtrat dimasukkan ke dalam tabung dan ditambahkan 500 mg serbuk seng serta 2 ml asam klorida 2N, didiamkan 1 menit, ditambahkan 10 ml asam klorida pekat. Terjadinya warna merah dalam 2-5 menit menunjukkan adanya senyawa flavonoid. Sebanyak 5 ml filtrat dalam tabung yang berbeda

ditambahkan 100 mg serbuk magnesium dan 5 ml asam klorida pekat. Terjadinya warna merah jingga sampai merah ungu menunjukkan adanya flavonoid.

1.2.4.5 Identifikasi Saponin

Sebanyak 0,5 g sampel ditambahkan 10 ml air panas, didinginkan, kemudian dikocok sampai muncul buih, didiamkan selama 2 menit dan ditambahkan 1 tetes HCl 2 N, dikocok lagi sampai terbentuk buih yang mantap selama sepuluh menit.

1.2.4.6 Identifikasi Tanin

Ekstrak sebanyak 1 g dilarutkan dalam 10 ml air panas kemudian dipanaskan selama 1 jam dan didinginkan kemudian disaring, filtratnya ditetesi FeCl_3 1%, perubahan warna menjadi biru hitam atau biru hijau menunjukkan adanya tanin.

1.2.5 Analisis senyawa antioksidan menggunakan metode KLT modifikasi (Kawai *et al.* 1994 ; Nyoman *et al.* 2004).

Pelat aluminium pralapis silika gel terlebih dahulu dikeringkan pada suhu 30°C selama 10 menit untuk mengaktifkan silika gel. Masing-masing sampel dilarutkan dalam 1 ml etil asetat. Setelah pelat KLT diaktifkan, sampel dan standar ditotolkan sebanyak $5\mu\text{L}$ dan dikembangkan dalam suatu bejana yang dijenuhkan berisikan larutan pengembang chloroform : methanol (88 : 12). Penotolan dilakukan pada jarak 1,5 cm x 1,5 cm x 1,5 cm dengan jarak totalan 1,5 cm. Setelah larutan pengembang berhenti bergerak, diangkat dari bejana lalu dikeringkan di udara terbuka selama 15 menit.

Hasil KLT dilihat di bawah sinar ultra violet pada panjang gelombang 254 nm. Nilai R_f dari noda-noda pada kromatogram ditentukan dengan cara menghitung perbandingan antara jarak yang ditempuh oleh suatu noda dengan yang ditempuh oleh larutan pengembang, diukur dari titik penotolan. Penentuan kadar secara kuantitatif, plat KLT dibaca dengan alat *TLC-Scanner CAMAG 3* yang dapat mengukur kekuatan pendaran noda berdasarkan nilai absorbansinya yang berbanding lurus dengan kadarnya.

1.2.6 Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (Okawa, 2001)

1.2.6.1 Pembuatan larutan DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrazil) (Molyneux, 2004).

Ditimbang sebanyak 1,97 mg DPPH dan dilarutkan dengan metanol didalam labu ukur sampai dengan 100 ml sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 50 μ M.

1.2.6.2 Pemeriksaan aktivitas antioksidan (Okawa, 2001 dan Hanani *et al.* 2005).

Ekstrak *Aspergillus* spp. terpilih dilarutkan dalam metanol dalam berbagai konsentrasi (400, 800, 1600 dan 3200 ppm) (Lampiran 1.9). Masing-masing sampel dipipet sebanyak 0,2 ml dengan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam vial. Setiap vial ditambahkan 3,8 ml larutan DPPH 50 μ M. Campuran dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit di tempat gelap, serapan diukur pada λ 515 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. EC_{50} dihitung dari prosentase penghambatan serapan dari berbagai konsentrasi ekstrak dihitung menggunakan regresi linier.

2. HASIL DAN PEMBAHASAN

2.1 Pengamatan makroskopis dan mikroskopis *Aspergillus* spp.

Pengamatan makroskopis dan mikroskopis yang dilakukan bertujuan untuk mendapatkan deskripsi morfologi dari biakan kapang *Aspergillus* spp. koleksi UICC dan tidak melakukan identifikasi. Biakan kapang *Aspergillus* spp. diamati secara makroskopis meliputi warna koloni, permukaan koloni dan pengamatan mikroskopis menunjukkan tipe vesikel (uni/biseriate), bentuk konidia dan warna konidia. Koloni biakan kapang *Aspergillus* spp. ditumbuhkan pada medium PDA dengan masa inkubasi selama 7 hari. Hasil pengamatan makroskopis terlihat bahwa warna koloni hitam agak kecoklatan sampai dengan hitam, vesikel biseriate, konidia berbentuk bulat, semi bulat dan berwarna hitam. Pengamatan mengacu pada buku identifikasi Raper dan Fennell (1965) dan Gandjar *et al.* (1999). Hasil pengamatan makroskopis dan mikroskopis dari 12 biakan kapang *Aspergillus* spp. koleksi *University of Indonesia Culture Collection* (UICC) dapat dilihat pada Lampiran 1.1.

2.2. Uji Antioksidan *Aspergillus* spp dengan metode Fitokimia

Hasil analisis fitokimia ekstrak etil asetat 12 biakan kapang *Aspergillus* spp. yang diuji mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, triterpenoid dan glikosida dan tidak mengandung senyawa golongan saponin, tanin, fenolik dan steroid. Senyawa golongan alkaloid, flavonoid, triterpenoid, dan glikosida yang terkandung didalam ekstrak etil asetat memiliki aktivitas sebagai antioksidan (Tabel 1.1).

Kandungan senyawa alkaloid yang menunjukkan positif kuat sekali (++++) terdapat pada biakan *A. niger*, *A. phoenicis* UICC 13, *A. niger* UICC 75, *A. awamori* UICC 9, *A. awamori* UICC 30, *A. ficuum* UICC 5, *A. ficuum* UICC 46 dan *A. niger* UICC 77. Kandungan senyawa alkaloid yang menunjukkan positif kuat (++) terdapat pada biakan *A. tubingensis* UICC 27, *A. niger* UICC 371, *A. awamori* UICC 31, *A. ficuum* UICC 41. Hal ini didukung oleh penelitian Qian *et al.* (2007) yang menunjukkan alkaloid Stephacidin A dan B yang diisolasi dari fermentasi *Aspergillus ochraceus* yang berpotensi sebagai penghambat sel-sel tumor. Tsukamoto *et al.* (2008) mengisolasi kapang *Aspergillus* sp. penghasil notoamide E sebagai prekursor indole alkaloid. Ge *et*

al. (2009) mengisolasi senyawa bioaktif alkaloid *9-deacetylfumigaclavine* dan *9-deacetoxymumigaclavine* dari biakan *Aspergillus fumigatus*.

Kandungan senyawa triterpenoid yang menunjukkan positif kuat sekali (+++) terdapat pada *A. niger* UICC 371. Kandungan senyawa triterpenoid yang menunjukkan positif kuat hanya terdapat pada *A. awamori* UICC 9. Kandungan triterpenoid yang menunjukkan positif lemah (+) terdapat pada *A. niger*, *A. tubingensis* UICC 27, *A. phoenicus* UICC 13, *A. niger* UICC 75, *A. awamori* UICC 30, *A. awamori* UICC 31, *A. ficuum* UICC 5, *A. ficuum* UICC 46, *A. ficuum* 41 dan *A. niger* UICC 77. Patnaik *et al.* (2007) mengisolasi senyawa triterpenoid dari *Terminalia arjuna* yang berpotensi sebagai antimikroba, proteksi jantung, antioksidan. Triterpenoid termasuk senyawa yang merupakan komponen aktif yang digunakan sebagai antifungus, antibakteri atau virus (Robinson, 1995). Senyawa Triterpenoid juga dapat digunakan untuk pengobatan dan terapi (Harborne, 1987).

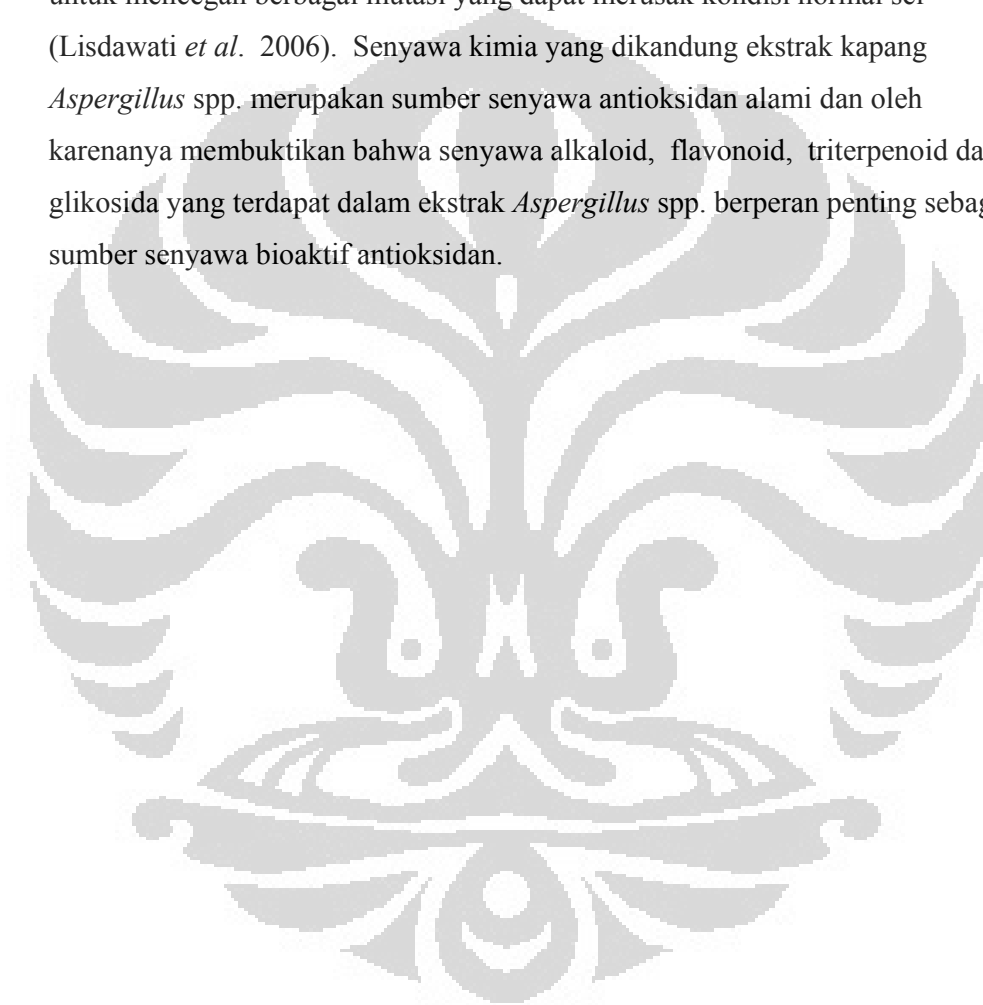
Kandungan senyawa flavonoid pada 12 biakan *Aspergillus spp.* menunjukkan positif lemah (+). Mengonsumsi flavonoid dapat mereduksi inflamasi dan menangkap radikal bebas maupun senyawa oksigen reaktif (ROS), karena flavonoid dapat menghambat enzim-enzim oksidatif (Algameta, 2009).

Kandungan glikosida yang menunjukkan positif kuat sekali (+++) terdapat pada *A. phoenicus* UICC 13. Kandungan glikosida yang positif kuat (++) terdapat pada *A. niger*, *A. tubingensis* UICC 27, *A. niger* UICC 75, *A. niger* UICC 371, *A. awamori* UICC 9, *A. awamori* UICC 31, *A. ficuum* UICC 5, *A. ficuum* UICC 46, *A. ficuum* UICC 41 dan *A. niger* UICC 77. Jensen *et al.* (1998) mengisolasi flavon glikosida sebagai luteolin 7-O- β -D-glucopyranosil-2 sulfat dari *Thallasia testudinum* berperan sebagai anti mikroba.

Berdasarkan hasil uji fitokimia dari beberapa kapang *Aspergillus spp.* pada Tabel 1.1. yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan yang menyerupai senyawa-senyawa yang terkandung dalam antioksidan sintetis BHT dijadikan sebagai standar komponen antioksidan. Berdasarkan hasil analisis fitokimia, BHT sintesis mengandung alkaloid, flavonoid, triterpenoid, dan glikosida. Efek antioksidan terutama disebabkan karena adanya senyawa fenol seperti flavonoid, asam fenolat. Biasanya senyawa-senyawa fenol yang mempunyai gugus hidroksi

yang tersubstitusi pada posisi ortho dan para terhadap gugus -OH dan -OR (Andayani *et al.* 2008). Alkaloid, flavonoid, triterpenoid dan glikosida yang terkandung dalam *Aspergillus* spp. memiliki gugus fungsi yang bersifat antioksidan dengan tugas sebagai hidrogen donor dan menangkap gugus radikal bebas yang ada.

Deaktivasi radikal bebas dengan membuat kondisi stabil amat dibutuhkan untuk mencegah berbagai mutasi yang dapat merusak kondisi normal sel (Lisdawati *et al.* 2006). Senyawa kimia yang dikandung ekstrak kapang *Aspergillus* spp. merupakan sumber senyawa antioksidan alami dan oleh karenanya membuktikan bahwa senyawa alkaloid, flavonoid, triterpenoid dan glikosida yang terdapat dalam ekstrak *Aspergillus* spp. berperan penting sebagai sumber senyawa bioaktif antioksidan.



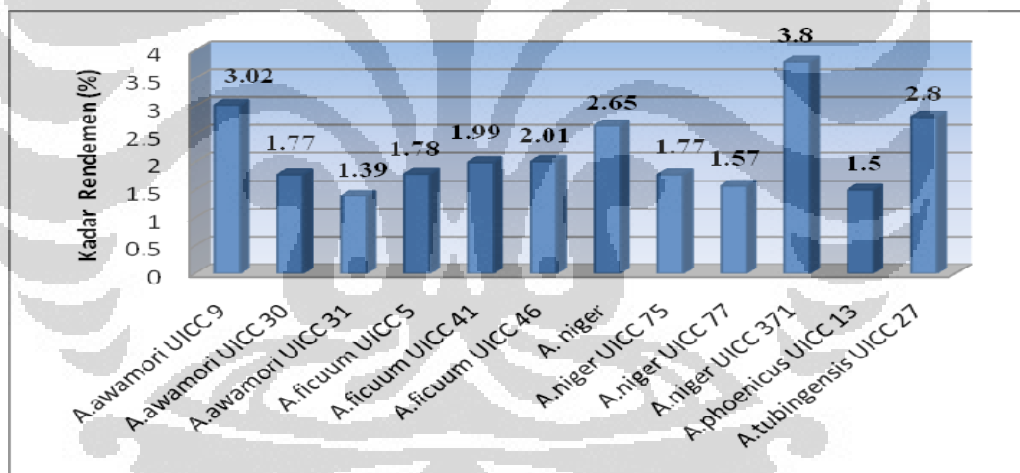
Tabell.1. Uji Fitokimia ekstrak *Aspergillus* spp.koleksi University of Indonesia Culture Collection (UICC)

No	Nama Kapang/ Penguji	Alkaloid	Saponin	Tanin	Fenolik	Flavonoid	Triterpenoid	Steroid	Glikosida
1	<i>A. niger</i>	+++	-	-	-	+	+	-	++
2	<i>A.tubingensis</i> UICC 27	++	-	-	-	+	+	-	++
3	<i>A.phoenicus</i> UICC 13	+++	-	-	-	+	+	-	+++
4	<i>A.niger</i> UICC 75	+++	-	-	-	+	+	-	++
5	<i>A.niger</i> UICC 371	++	-	-	-	+	+++	-	++
6	<i>A.awamori</i> UICC 9	+++	-	-	-	+	++	-	++
7	<i>A.awamori</i> UICC 30	+++	-	-	-	+	+	-	++
8	<i>A.awamori</i> UICC 31	++	-	-	-	+	+	-	++
9	<i>A.ficum</i> UICC 5	+++	-	-	-	+	+	-	++
10	<i>A.ficum</i> UICC 46	+++	-	-	-	+	+	-	++
11	<i>A.ficum</i> UICC 41	++	-	-	-	+	+	-	++
12	<i>A.niger</i> UICC 77	+++	-	-	-	+	+	-	++
13	BHT	++	-	-	-	++	++	-	++

Keterangan : - = negatif + = positif lemah ++ = positif kuat , +++ = positif kuat sekali

2.3. Analisis kualitatif dan kuantitatif Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

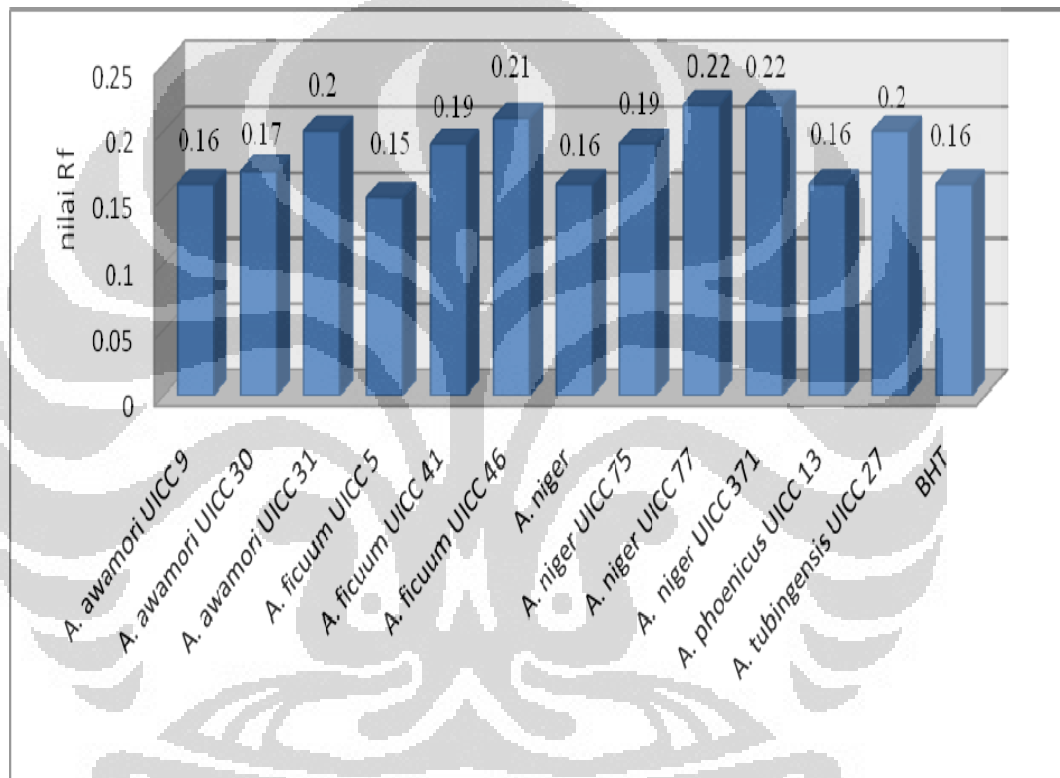
Gambar 1.1. menunjukkan hasil rendemen ekstrak kapang dari ke 12 *Aspergillus* spp. yang ditumbuhkan pada medium Malt Yeast Pepton Glukosa (MYPG). Setiap biakan *Aspergillus* spp. mempunyai kemampuan yang berbeda dalam menghasilkan komponen antioksidan. Hal ini dapat di lihat dari kadar rendemen setiap biakan *Aspergillus* spp. berbeda. *A. niger* memiliki kadar rendemen sebesar 3,80% dan *A. awamori* UICC 9 sebesar 3,08%. Kadar rendemen yang tertinggi hingga yang terendah adalah dihasilkan oleh *A. niger* UICC 371 (3,8%), *A. awamori* UICC 9 (3,02%), *A. tubingensis* UICC 27 (2,80%), *A. niger* (2,65%), *A. ficuum* UICC 46 (2,01%), *A. ficuum* UICC 41 (1,99%), *A. ficuum* UICC 5 (1,78%), *A. awamori* UICC 30 (1,77%), *A. niger* UICC 75 (1,77%), *A. niger* UICC 77 (1,57%), *A. phoenicus* UICC 13 (1,50%) dan *A. awamori* UICC 31 (1,39%).



Gambar 1.1. Diagram batang rendemen ekstrak kapang *Aspergillus* spp.koleksi University of Indonesia (UICC)

Perhitungan rendemen dilakukan untuk mengukur efektifitas jenis pelarut dalam mengekstrak komponen antioksidan. Besarnya rendemen ekstraksi dengan pelarut etil asetat mungkin disebabkan oleh sifat etil asetat yang semipolar sehingga dapat mengekstrak glikon (polar/terikat gula) dan komponen aglikon yang non polar (non polar/bebas gula) yang memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan komponen glikon (Tensiska *et al.* 2007).

Analisis kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan menggunakan lempeng silica gel F₂₅₄. Analisis KLT merupakan suatu analisis secara kualitatif yang digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya senyawa antioksidan pada dua belas sampel *Aspergillus spp.* koleksi UICC, dengan melihat kesamaan nilai Rf yaitu jarak relatif yang ditempuh oleh komponen dengan eluen standart dan sampel (Boyer, 1986). Nilai Rf masing-masing sampel *Aspergillus spp.* dapat di lihat pada Gambar 1.2.

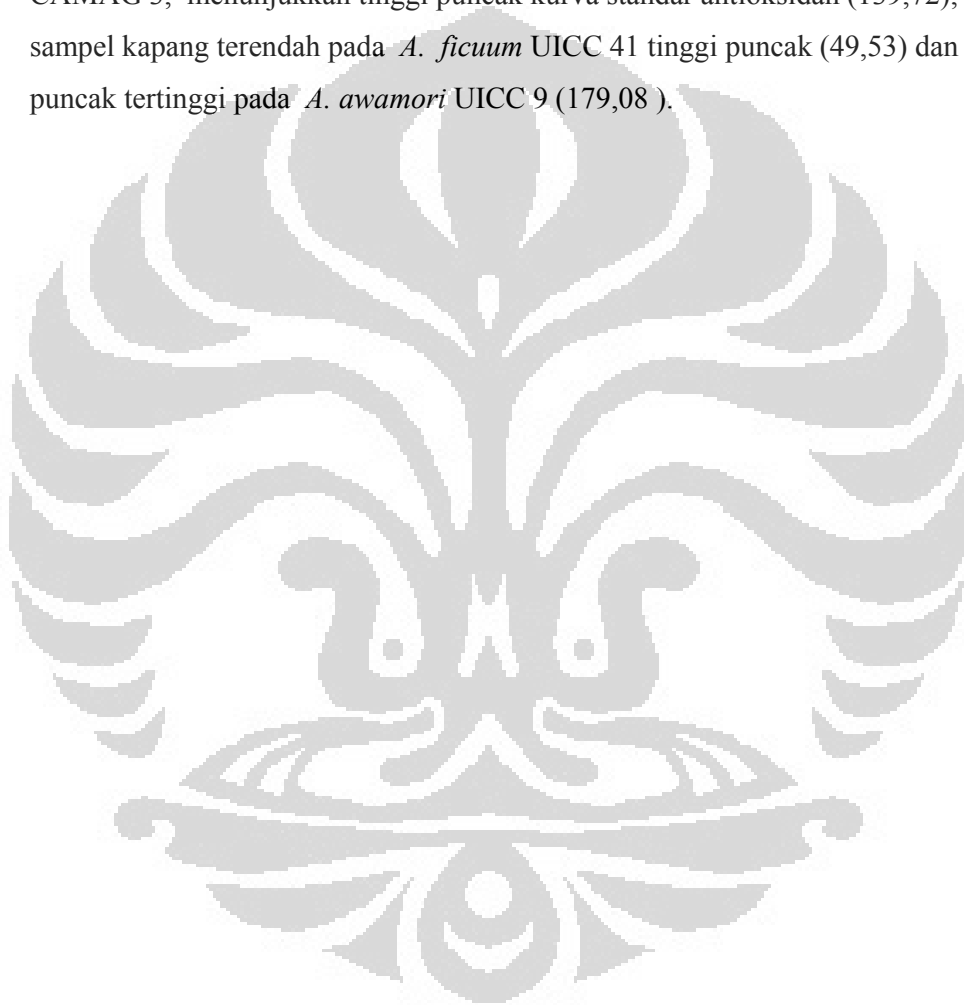


Gambar 1.2. Grafik nilai Rf kapang *Aspergillus spp.* koleksi University of Indonesia (UICC)

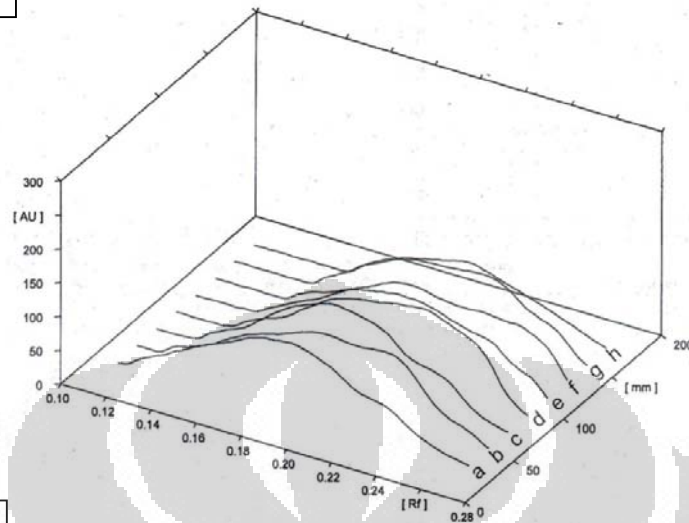
Sampel *Aspergillus spp.* dengan nilai Rf sama dengan standar antioksidan BHT menunjukkan bahwa hasil ekstraksi sampel *Aspergillus spp.* dengan etil asetat tersebut berupa senyawa antioksidan, sedangkan yang mempunyai nilai Rf lebih rendah atau lebih tinggi kemungkinan masih ada senyawa lain yang terkandung dalam ekstrak, karena perbedaan dari masing-masing kapang *Aspergillus spp.* Hanani *et al.* (2005) melaporkan bahwa untuk mendeterminasi

adanya senyawa antioksidan pada ekstrak *Callyspongia* sp, dengan menggunakan KLT menunjukkan nilai Rf yang sama dengan standart yaitu 0,33.

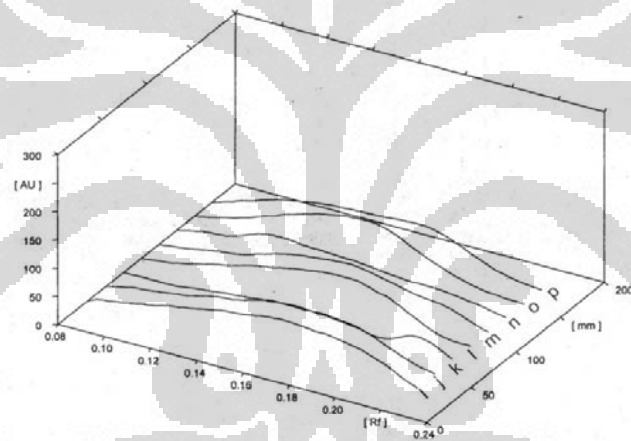
Spectro-Densitometry merupakan alat yang digunakan untuk menganalisis secara kualitatif dan kuantitatif keberadaan suatu senyawa. Gambar 1.5 menunjukkan gambar 3-dimensi dari senyawa antioksidan yang dihasilkan oleh 12 kapang *Aspergillus spp.* koleksi UICC, dianalisis menggunakan *TLC Scanner* CAMAG 3, menunjukkan tinggi puncak kurva standar antioksidan (139,72); sampel kapang terendah pada *A. ficuum* UICC 41 tinggi puncak (49,53) dan puncak tertinggi pada *A. awamori* UICC 9 (179,08).



A



B



Gambar 1.3. Densitogram *Aspergillus spp.* koleksi University of Indonesia (UICC)

Ket:

a & i Standar BHT

b & c *A.niger* UICC 75

d. *A niger* UICC 77

e. *A. tubingensis* UICC 27

f. *A. awamorii* UICC 31

g. *A. niger* UICC 371

j. *A. awamori i* UICC 30

k. *A. ficuum* UICC 5

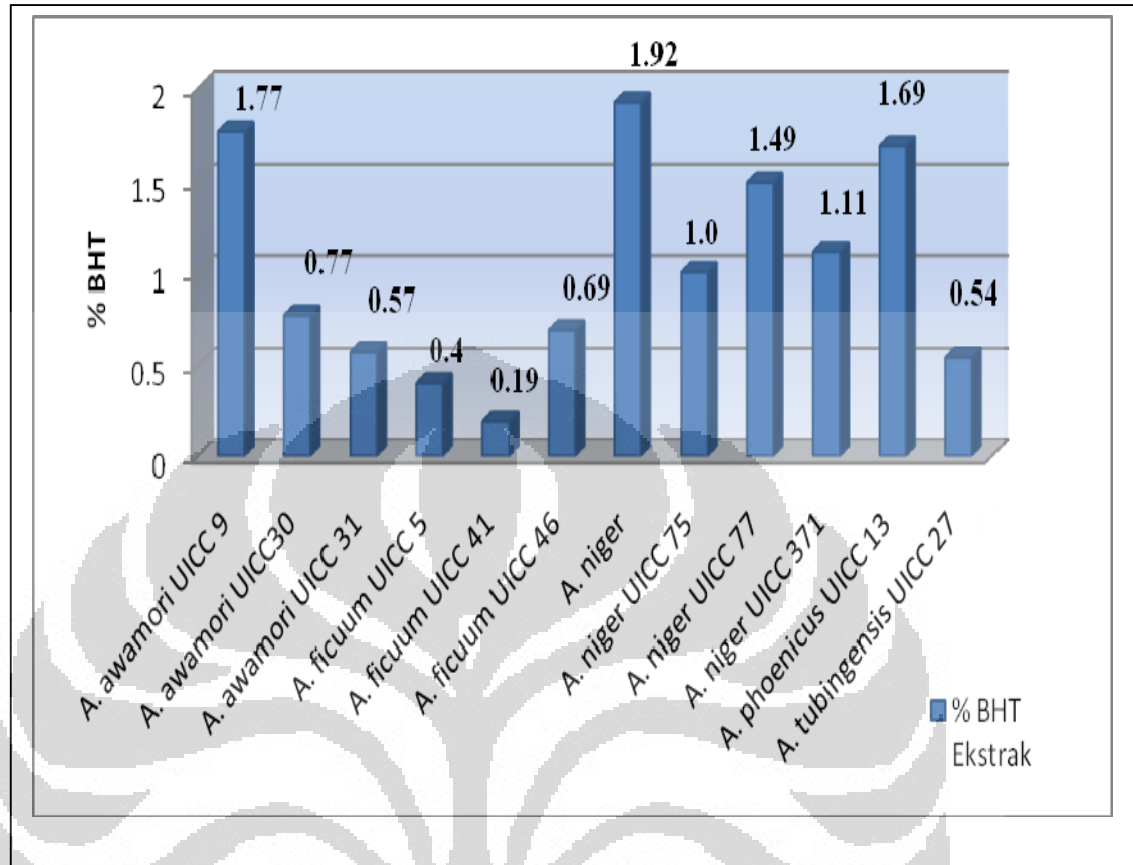
l. *A. phoenicus* UICC 13

m. *A. niger*

n. *A. ficuum* UICC 41

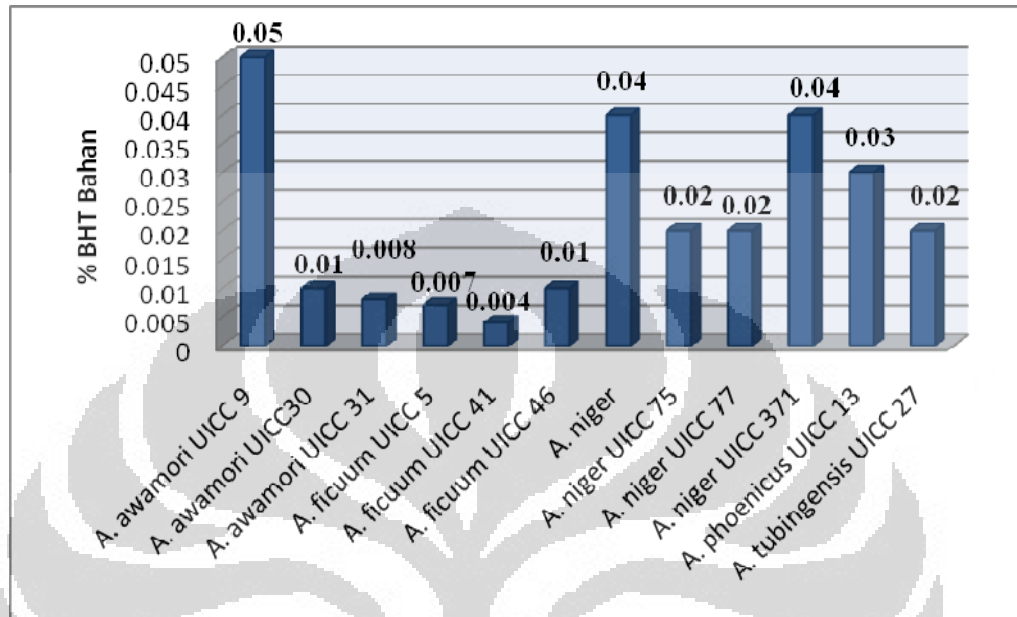
o& p. *A. awamorii* UICC 9

Gambar 1.4a. menunjukkan dua belas biakan *Aspergillus* spp. menghasilkan % BHT ekstrak tertinggi hingga terendah secara berurutan adalah *A. niger* sebesar 1,92, *A. awamori* UICC 9 (1,77), *A. phoenicus* UICC 13 (1,69), *A. niger* UICC 77 (1,49), *A. niger* UICC 371 (1,11), *A. niger* UICC 75 (1), *A. awamori* UICC 30 (0,77), *A. ficuum* UICC 46 (0,69), *A. awamori* UICC 31 (0,57), *A. tubingensis* UICC 27 (0,54), *A. ficuum* UICC 5 (0,4) dan yang terendah *A. niger* UICC 77 sebesar 0,19. Pengujian kadar antioksidan dari setiap sampel ekstrak *Aspergillus* spp. koleksi UICC mengindikasikan % BHT yang dihasilkan setiap sampel. Hal ini karena BHT sebagai antioksidan sintetik dijadikan sebagai standar pengujian kadar antioksidan. Alasan penggunaan BHT sebagai standar karena BHT merupakan senyawa yang tidak larut dalam air, akan tetapi larut dalam pelarut organik dan minyak, berbentuk kristal berwarna putih dan tidak berbau serta merupakan antioksidan terbaik karena memiliki waktu induksi yang paling lama dan lebih stabil pada suhu panas dibanding BHA (Anwar, 1992). Selain itu Hamama dan Nawar (1991) melaporkan bahwa pada perlakuan pemanasan pada suhu 185°C, antioksidan butil hidroksi Toluen (BHT) mengalami kehilangan antioksidan yang lebih rendah dibanding antioksidan sintetik lainnya seperti butil hidroksi anisol (BHA), propyl galat (PG) dan tert-butyl hidroquinon (TBHQ).



Gambar1.4a. Diagram % BHT ekstrak *Aspergillus* spp. koleksi University of Indonesia Culture Collection (UICC)

Hal tersebut mengindikasikan bahwa ekstrak etil asetat *Aspergillus niger* menghasilkan kadar antioksidan yang lebih tinggi dibanding ekstrak etil asetat *Aspergillus* lainnya. Pelarut etil asetat bersifat semipolar sehingga dapat mengekstrak komponen glikon yang polar dan aglikon yang non polar, hal ini terlihat pada % BHT ekstrak tertinggi pada *Aspergillus niger* sebesar 1,92%. Anwar (1992) melaporkan bahwa ekstrak yang memiliki stabilitas terbaik terhadap suhu sterilisasi komersial adalah ekstrak etil asetat. Hal ini mungkin disebabkan oleh sifat etil asetat yang semipolar sehingga dapat mengekstrak komponen glikon yang polar dan aglikon yang non polar sehingga komponen antioksidan dalam setiap miligram ekstrak etil asetat lebih tinggi dibandingkan ekstrak lainnya.

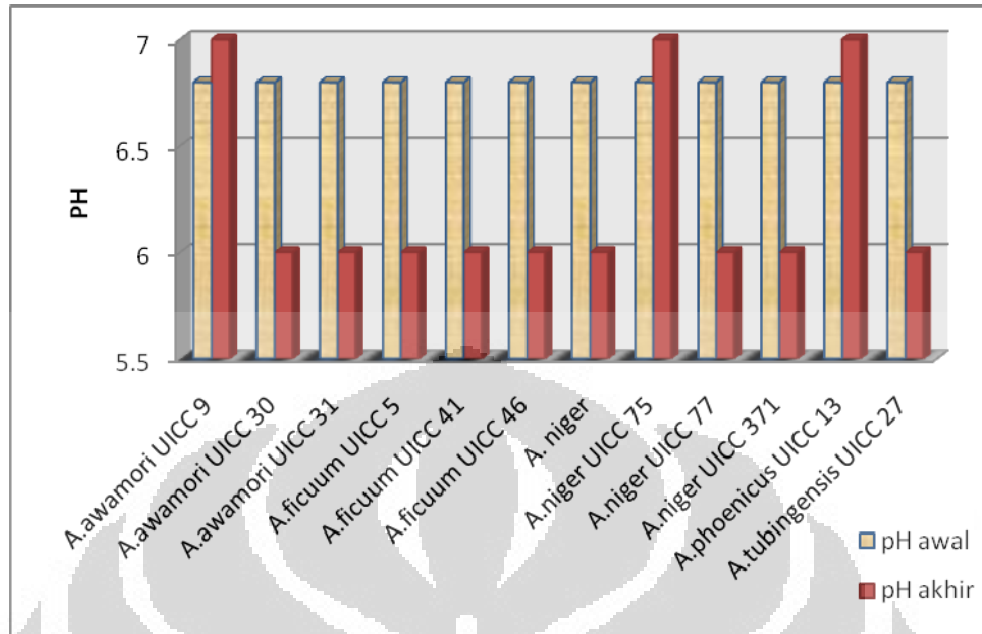


Gambar 1.4b. Diagram % BHT bahan *Aspergillus* spp. koleksi University of Indonesia Culture Collection (UICC)

Pada gambar 1.4b menunjukkan % BHT bahan tertinggi pada *Aspergillus awamori* UICC 9 sebesar 0,05 dan terendah pada *Aspergillus ficuum* UICC 41 sebesar 0,004. % BHT pada bahan lebih rendah dibanding % BHT pada ekstrak, hal ini disebabkan karena pada bahan belum mengalami proses ekstraksi sehingga belum terjadi penguraian komponen antioksidan oleh pelarut etil asetat.

2.4. Perubahan pH awal dan akhir selama fermentasi

Gambar 1.5. menunjukkan pH awal dan akhir setelah 14 hari fermentasi produksi antioksidan dalam medium MYPG. Pada awal fermentasi, medium mempunyai pH 6,8, pada akhir fermentasi terjadi penurunan pH ke arah asam berkisar pH 6 (*Aspergillus niger*, *A. tubingensis* UICC 27, *A. niger* UICC 371, *A. awamori* UICC 30, *A. awamori* UICC 31, *A. ficuum* UICC 5, *A. ficuum* UICC 46, *A. ficuum* UICC 41 dan *A. niger* UICC 77) sedangkan pada (*A. phoenicus* UICC 13, *A. niger* UICC 75 dan *A. awamori* 9) terjadi kenaikan pH ke arah netral (pH 7).



Gambar 1.5. Diagram perubahan pH medium pada awal dan akhir fermentasi *Aspergillus* spp. koleksi Uiniversity of Indonesia (UICC)

Penurunan dan kenaikan pH medium selama proses fermentasi dapat terjadi. Hal ini disebabkan karena terjadinya pertukaran antara kation dan anion selama aktivitas kapang. Adanya akumulasi senyawa asam organik yang dihasilkan selama metabolisme glukosa menyebabkan penurunan pH medium ke arah asam selama fermentasi (Griffin, 1984). Qi *et al.* (2009) mempelajari aktivitas β -glucosidase pada range pH dari pH 3,5 sampai dengan pH 10,0, yang mengindikasikan bahwa aktivitas minimum β -glucosidase pada pH 8,0 dan aktivitas maksimum berada pada pH 5,0 dan 6,0. Perubahan pH medium dalam fermentasi *Aspergillus awamori* tidak terlalu besar yaitu dari pH 6,8 menjadi 7,0 menyebabkan aktivitas antioksidan maksimal. Chin dan Lee (1997) melaporkan bahwa ekstrak etil asetat *Aspergillus candidus* pada pH netral (pH 7) atau pH 3 dan pH 5 menghasilkan aktivitas antioksidatif yang kuat.

2.5. Produksi Antioksidan dari *Aspergillus awamori* UICC 9

Hasil pengamatan terhadap warna medium, pembentukan hifa dan miselium selama proses fermentasi dapat dilihat pada Lampiran 1.3. Pengamatan selama proses fermentasi dilakukan selama 14 hari dengan kondisi tanpa

pengocokan. Pengamatan hari ke-0 warna medium hartal kuning, pada hari ke-1 terlihat adanya pertumbuhan, perubahan terlihat pada terbentuknya miselium berwarna putih, berbentuk seperti kapas dan belum menutupi seluruh permukaan medium, hanya terlihat seperti pulau-pulau kecil, warna medium terjadi perubahan kearah hartal kuning keemasan. Hari ke-2 miselium berwarna putih dan berbentuk kapas telah menutupi seluruh permukaan medium dan tampak berlekuk-lekuk, eksudat drop yang berwarna bening mulai terlihat diatas permukaan miselium.

Pada hari ke-3 hingga hari ke-5 terjadi perubahan pada permukaan miselium berwarna putih seperti kapas mulai terbentuk butiran-butiran berwarna coklat, selain terbentuk eksudat drop yang berwarna bening kemerahan, mulai terbentuk eksudat drop lain yang berwarna coklat pada lekukan miselium, terjadi perubahan warna medium kearah coklat jangat. Hari ke-6 hingga hari ke-8 seluruh permukaan miselium yang berwarna putih telah tertutupi butiran-butiran berwarna coklat, sedangkan eksudat drop yang terbentuk di lekukan-lekukan miselium terjadi perubahan warna kearah coklat kehitaman dan warna medium menjadi coklat. Hari ke-9 hingga hari ke-14, terdapat sedikit eksudat drop yang berwarna bening kemerahan, eksudat drop yang berwarna coklat kehitaman banyak terbentuk di lekukan-lekukan miselium dan beraroma, sedangkan warna medium tetap coklat.

Menurut Judoamidjoyo *et al.* (1992), pertumbuhan kapang memiliki karakteristik perpanjangan seperti rantai bercabang. Miselium dapat tumbuh memanjang dan jarang atau pendek dan banyak cabang atau dapat juga merupakan kombinasi keduanya. Hal tersebut tergantung pada fisiokimia lingkungan. Bila pertumbuhan berlangsung di permukaan, miselium teranyam membentuk massa miselium yang tebal.

Desain medium fermentasi sangat penting untuk menghasilkan metabolit sekunder yang diharapkan. Proses pembentukan senyawa metabolit sekunder dapat dilakukan dengan menggunakan metode fermentasi kultur terendam (*batch submerged fermentation*). Melalui cara tersebut penggunaan media lebih efisien, jenis dan konsentrasi komponen dalam media cair lebih mudah diatur agar mencapai kondisi optimum pertumbuhan (Nauli *et al.* 2006).

Pada proses fermentasi dalam penelitian ini digunakan medium, jumlah inokulum, suhu yang sama dan menggunakan metode fermentasi *still culture*, sehingga membentuk miselium yang tebal. Hal tersebut menghasilkan biomassa yang banyak. Biomassa mikroorganisme oleh kapang dipengaruhi oleh jenis sumber karbon dan nitrogen yang digunakan dan perbandingan C:N dalam medium. Nitrogen digunakan dalam metabolisme untuk biosintesis berbagai komponen selular, seperti asam nukleat, asam amino, protein dan vitamin (Madigan *et al.* 2000). Sumber nitrogen yang digunakan kapang dapat dibedakan sebagai sumber nitrogen organik dan anorganik, Sumber nitrogen organik merupakan nutrisi kompleks seperti yeast ekstrak, pepton, dan asam amino dan sumber anorganik berupa NaNO_3 / KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4PO_4 , NH_4Cl (Madigan *et al.* 2000).

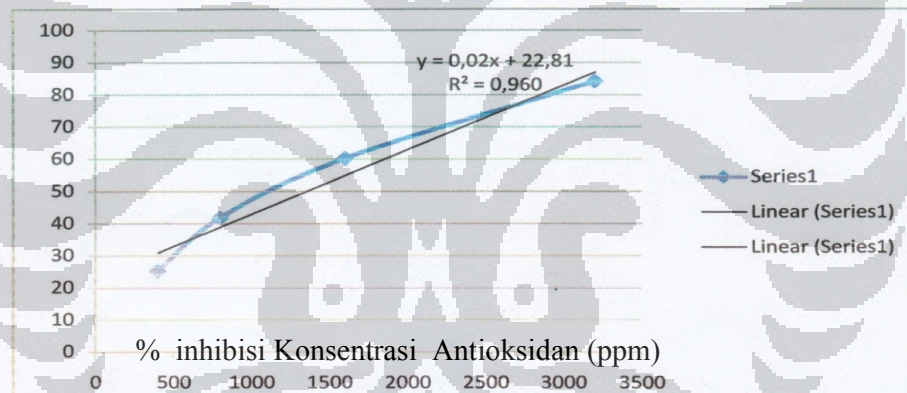
Medium MYPG yang digunakan dalam penelitian menggunakan KH_2PO_4 sebagai sumber fosfat (PO_4)³⁻, yang diperlukan oleh kapang terutama dalam proses sintesis asam nukleat dan fosfolipid (Madigan *et al.* 2000). Penggunaan pepton oleh kapang sebagai sumber karbon dapat menyebabkan deaminasi asam amino, yang akan meningkatkan akumulasi amonia dalam medium (Rahman, 1992). Dalam penelitian ini tidak dilakukan optimalisasi medium untuk meningkatkan produksi antioksidan karena tujuan penelitian adalah melakukan skrining terhadap potensi *Aspergillus spp.* koleksi UICC dalam menghasilkan antioksidan.

2.6. Analisis aktivitas antioksidan *A. awamori* UICC 9 dengan metode DPPH

DPPH merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar dan sering digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan beberapa senyawa atau ekstrak bahan alam. DPPH menerima elektron atau radikal hidrogen akan membentuk molekul diamagnetik yang stabil.

Tabel 1.2. Uji aktivitas antioksidan ekstrak *Aspergillus awamori* UICC 9 metode DPPH (sampel 100 mg/25 ml)

No	Absorbansi (A)	Konsentrasi (C) (ppm)	% Inhibisi
1	0,417	400	25,27
2	0,325	800	41,76
3	0,222	1600	60,22
4	0,088	3200	84,32



Gambar 1.6. Grafik persentase penghambatan radikal bebas dengan ekstrak etilasetat *Aspergillus awamori* UICC 9

Berdasarkan Tabel 1.2 dan Gambar 1.6 hasil analisis aktivitas antioksidan yang menggunakan metode DPPH kapang *Aspergillus awamori* UICC 9 memiliki nilai EC 50% sebesar 1359,5 ppm. Adanya aktivitas antioksidan dari sampel mengakibatkan perubahan warna pada larutan DPPH dalam metanol yang semula berwarna violet pekat menjadi kuning pucat (Hanani *et al.* 2005). Interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH, akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH (Lisdawati *et al.* 2006).

Jika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan, maka warna larutan berubah dari ungu tua menjadi kuning terang dan absorbansi pada panjang gelombang (λ) 517 nm akan hilang. Perubahan ini dapat diukur secara stokiometri sesuai dengan jumlah elektron atau atom hidrogen yang ditangkap oleh molekul DPPH akibat adanya zat antioksidan (Gurav *et al.* 2007).

Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH untuk mengetahui potensi ekstrak kapang *Aspergillus awamori* UICC 9 sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan merupakan kemampuan suatu senyawa atau ekstrak untuk menghambat reaksi oksidasi yang dapat dinyatakan dengan persen penghambatan. Parameter yang dipakai untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah nilai konsentrasi suatu zat antioksidan yang dapat menyebabkan 50% DPPH kehilangan karakter radikal atau konsentrasi suatu zat antioksidan yang memberikan prosentase penghambatan 50%. Zat yang mempunyai aktivitas antioksidan tinggi, akan mempunyai harga EC_{50} atau IC_{50} yang rendah (Suratmo, 2007).

Hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH, menunjukkan bahwa ekstrak *Aspergillus awamori* UICC 9 yang menggunakan pelarut etil asetat memiliki nilai EC_{50} sebesar 1359,5 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak tersebut mempunyai aktivitas antioksidan yang lemah karena mempunyai EC_{50} yang lebih dari 200 $\mu\text{g/ml}$ (Andayani *et al.* 2008). Aktivitas antioksidan ekstrak *Aspergillus awamori* UICC 9 masih dibawah aktivitas antioksidan sintesis BHT (14.17 ppm), hal ini karena ekstrak *Aspergillus awamori* UICC 9 bukan merupakan senyawa murni, tetapi masih mengandung senyawa-senyawa lain yang kemungkinan tidak mempunyai aktivitas antioksidan. Ekstrak *Aspergillus awamori* UICC 9 yang menggunakan pelarut etil asetat terdapat senyawa-senyawa antioksidan dengan kepolaran sedang (semi polar) dan memungkinkan juga mengekstrak sebagian kecil senyawa polar yang memiliki aktivitas antioksidan (Tensiska *et al.* 2007). Hasil perhitungan aktivitas antioksidan ekstraksi *A. awamori* UICC 9 didapat persamaan regresi : $Y = 0,02 X + 22,81$, dengan $r^2 = 0,960$, nilai koefisien determinasi (r^2) lebih dari 80% menunjukkan bahwa model yang dipakai sesuai sehingga prosentasi inhibisi sangat dipengaruhi oleh jumlah konsentrasi antioksidan.

3. KESIMPULAN DAN SARAN

1.1. KESIMPULAN

Hasil rendemen 12 ekstrak kapang *Aspergillus* spp sebesar 1,57 – 3,80 %. Kadar rendemen yang tertinggi pada *Aspergillus niger* UICC 371 (3,8%). Analisis antioksidan dengan metode fitokimia menghasilkan senyawa-senyawa kimiawi yaitu triterpenoid, glikosida, flavonoid dan alkaloid. Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menunjukkan nilai Rf adalah (0,15- 0,22) dan standart BHT (0,16). *Aspergillus awamori* UICC 9 memiliki nilai Rf yang sama dengan nilai Rf standar BHT dan analisis aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menunjukkan bersifat antioksidan dengan nilai EC₅₀ sebesar 1359,5 ppm.

1.2. SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai medium yang paling baik dalam memproduksi antioksidan secara maksimal dan purifikasi antioksidan yang dihasilkan.

DAFTAR ACUAN

- Andayani, R. Y. Lisawati & Maimunah. 2008. Penentuan aktivitas antioksidan, kadar fenolat total dan likopen pada buah tomat (*Lycopersicum L.*). *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*. 13: 9 hlm.
- Algameta, E. D. 2009. Uji aktivitas antioksidan tablet *effervescent* Dewandaru (*Eugenia uniflora L.*). Skripsi Sarjana S1. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah, Surakarta. Surakarta. 99 hlm.
- Anwar, E. 1992. Isolasi antioksidan dari biji picung (*Pangium edule Reinw.*) terfermentasi. Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Aoyama, T, Y. Nakakita, M. Nakagawa & H. Sakai. 1982. Screening for antioxidants of microbial origin. *Agric. Biol.Chem*, 46 (9): 2369-2371.
- Boer, Y., 2000. Uji aktivitas antioksidan ekstrak kulit buah Kandis (*Garcinia parvifolia* Miq). *Jurnal Matematika dan IPA*, 1(1): 26 -33.
- Boyer, R.F. 1986. Modern experimental biochemistry, Edison Wesley Publishing Company, Inc. Canada: xv + 584 hlm.
- Chin, Y.G & C.E. Lee. 1997. Antioxidative properties of extracts from *Aspergillus candidus* broth filtrate. *J. Sci Food Agric*. 75: 326-332.
- Choudary, M.I, G.S. Musharraf, T. Mukhmoor, F. Shaheen, S. Ali, & A. Rahman. 2004. Isolation of Bioactive Compounds from *Aspergillus terreus*. *Z. Naturforsch*. 59b. 324-328.
- Jensen, P.R, K.M. Jenkins, D. Porter & W. Fenical. 1998. Evidence that a new antibiotic flavon glycoside chemically defends the sea grass *Thalassia testudinum* against zoosporic fungi. *Appl. Environ Microbiol*. 64(4): 1490-1496.
- Judoamidjojo, M., A. A. Darwis & E.G. Sa'id. 1992. Teknologi Fermentasi. Rajawali Pers, Jakarta. Viii + 333 hlm.
- Gandjar, I, I.R. Koentjoro, W. Mangunwardoyo & L. Soebagya. 1992. Pedoman praktikum mikrobiologi dasar. Departemen Biologi, Fakultas Ilmu Matematika dan Ilmu Pengeatahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok: vii + 87 hlm.

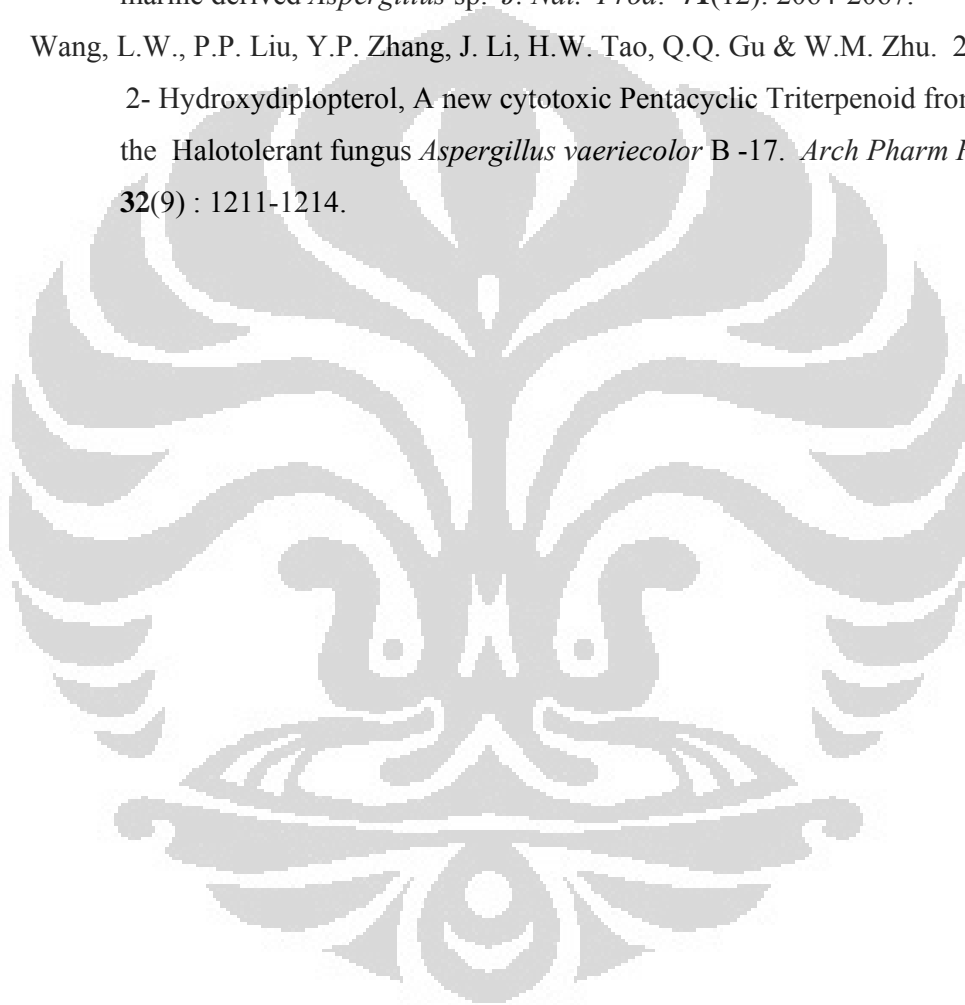
- Gandjar, I., R. A. Samson, K. van-den Tweel-Vermeulen, A. Oetari & I. Santoso. 1999. *Pengenalan kapang tropik umum*. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta: xiv + 136 hlm.
- Gandjar, I., W. Sjamsuridzal & A. Oetari. 2006. *Mikologi dasar dan terapan*. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta: xi + 238 hlm.
- Ge, H.M., Z.G. Yu, J. Zhang, J.H. Wu & R.X. Tan. 2009. Bioactive Alkaloids from endophytic *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Natural Product*. **72** (4): 753-755.
- Griffin, D.H. 1984. *Fungal physiology*. John Wiley & Sons, Toronto: xii + 383 hlm.
- Gurav, S., N. Deshkar, V. Gulkari, N. Duragkar, Dan A. Patil. 2007. Free Radical Scavenging Activity of *Polygala chinensis* Linn. *Pharmacologyonline*. **2**: 245-253.
- Hanani, E., A. Mun'in & R. Sekarini. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Spons *Callyspongia sp* dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. **2** (3): 127-133.
- Harborne, J.B. 1987. Metode Fitokimia: Penuntun cara modern menganalisis tumbuhan. Terj. dari *Phytochemical methods*, oleh Padmawinata, K dan Soediro, I. Penerbit ITB, Bandung: x + 453 hlm.
- Halliwell, B., & J.M.C. Gutteridge. 1999. Free radicals, 'reactive species' and toxicology. In: *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed., Chapter 8. *Oxford University Press*: 554 – 552.
- Herbert, R.B. 1995. Biosintesis Metabolit sekunder. Terj. dari *Biosynthesis of secondary metabolite*, oleh Bambang Srigandono. IKIP Press Semarang, Semarang: 365 hlm.
- Hernawan & M. Anwar. 2003. *In Vitro* Antioxidant effect of *Hibiscus radiatus* Cuv. calyces hydroethanolic extract. Prosiding seminar. UPT. Balai Pengembangan Proses dan Teknologi Kimia. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Yogyakarta. Yogyakarta. 9 hlm.
- Irene, E. & S. Kusnandar. 1999. Makna Pengukuran Status Antioksidan Tubuh. Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta. 19 hlm.

- Kawai, Y., Y. Oeda., M. Otaka., T. Kasakawa., N. Inoue & H. Shinano. 1993. Screening and Identification of Antioxidant-Producing Strains in Food-Borne Fungi. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* **44**(3): 141-146.
- Kawai, Y., M. Otaka., M. Kakio., Y. Oeda., N. Inoue & H. Shinano. 1994. Screening of Antioxidant-Producing Fungi in *Aspergillus niger* Group for Liquid- and Solid- State Fermentation. *Bull. Fac. Hokkaido Univ.* **45** (1): 26-31.
- Lisdawati, V., L. Broto & S. Kardono. 2006. Aktivitas antioksidan dari berbagai fraksi ekstrak daging buah dan kulit biji Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*). *Media Litbang Kesehatan.* 15(4). 7 hlm.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko & J. Parker. 2000. *Brock Biologi of microorganism.* 9th ed. Prentice Hall International Inc. New Jersey: xvii + 986.
- Maryanto, H. 2004. Isolasi dan identifikasi kapang *Aspergilli xerotoleran* pada biji-bijian dan serealia serta pengaruh beberapa medium pada aktivitas senyawa bioaktif *Aspergillus* Anti *Candida albicans*. Tesis Pasca Sarjana, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok. 63 hlm.
- Molyneux, P. 2004. The Use of The Stable Free Radical Diphenyl Picrylhydrazil (DPPH) For Estimating Antioxidant Activity. *J.Sci. Technol.* **26** (2): 211-219.
- Nainggolan, D. 2005. Aktivitas antioksidan residu ekstrak *Aspergillus terreus* pada kerusakan hati tikus putih yang diinduksi dengan CCl₄. Tesis Pasca Sarjana. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. Vii + 67 hlm.
- Nauli, T. & L.Z. Udin. 2006. Model fermentasi Lovastatin. *Akta Kimindo* **1**(2): 99-104.
- Nyoman, P., S. Widayanti & Yuanita. 2004. Eksplorasi fungsi Deuteromycetes (*Aspergillus* sp. dan *Penicillium* sp.) penghasil senyawa antikolesterol Lovastatin. Laporan Akhir Penelitian Dasar. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Teknologi Bandung. 31 hlm.





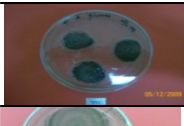
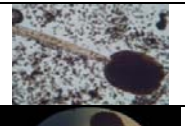
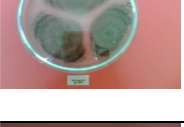
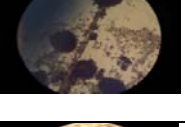


- Okawa, M., J. Kinjo & M. Ono. 2001. Modification Method “DPPH (2-2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radical scavenging activity of Flavonoid obtained from some medicinal plants. *Biol. Pharm. Bull.* **24** (10) 1202-1204.
- Patnaik, T., R.K. Dey & P. Gouda. 2007. Isolation of Triterpenoid Glycoside from Bark of *Terminalia arjuna* using Chromatographic Technique and Investigation of Pharmacological Behavior upon Muscle Tissues. *E-journal of Chemistry.* 4 (4): 474 – 479.
- Qi, B., L. Wang & X. Liu. 2009. Purification and characterization of β -glucosidase from newly isolated *Aspergillus* sp. MT-024. *African Journal of Biotechnology.* **8** (10): 2367-2374.
- Qian, J., S. Huang, Y.Z. Shiu, D. Vyas, C. Fairchid, A. Manendez, K. Krampitz, R. Dalterio, S. E. Klohr & Q. Gao. 2002. Stephacidin A and B: Two structural Novel, selective inhibitors of the testosterone-dependent prostate LNCaP cells. *J. Am. Soc.* **129(49)**: 14556 – 14557.
- Rahman. 1992. Teknologi fermentasi. Penerbit Arcan. Jakarta: viii + 188
- Raper, K.B & D. I. Fennell. 1965. The genus *Aspergillus*. The Williams & Wilkins company. Baltimore: IX + 656 hlm.
- Robinson, T. 1995. Kandungan Organik Tumbuhan. Penerjemah: Kosasih Padmawinata. Institut Technology Bandung, Bandung.
- Samson, R.A & J.I. Pitt. 1995. *Advances in Penicillium and Aspergillus systematic*. Plenum Press, New York.
- Steel, R.G.D. & J.H. Torrie. 1989. Prinsip dan prosedur statistika : Suatu pendekatan biometrik. Terj. Dari. *Principles and procedures of statistics: A biometrical approach*. Ed. Ke-2., oleh Sumantri. Penerbit Gramedia, Jakarta: xxiii + 748 hlm.
- Sunarni, T., S. Pramono & R. Asmah. 2007. Flavonoid antioksidan penangkap radikal dari daun kepel *Stelechocarpus burahol*. *Majalah Farmasi Indonesia.* **18(3)**: 111-116.
- Tensiska., Marsetio & Y.N.O. Silvia. 2007. Pengaruh jenis pelarut terhadap aktivitas antioksidan ekstrak kasar Isoflavon dari ampas tahu. Jurusan Teknologi Industri Pangan FTIP, Universitas Padjajaran, Bandung. 8





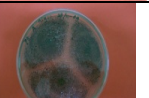








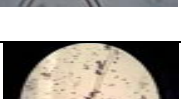
hlm

- Trilaksani, W. 2003. Antioksidan : Jenis, sumber, mekanisme kerja dan peran terhadap kesehatan. *Term paper Introductory Science Philosophy* (PPS702). IPB: 12 hlm.
- Tsukamoto, S., H. Kato, M. Samizo, Y. Nojiri, H. Onuki, H. Hirota & T. Ohta. 2008. Notoamides F-K, Prenylated Indole Alkaloids isolated from a marine derived *Aspergillus* sp. *J. Nat. Prod.* **71**(12): 2064-2067.
- Wang, L.W., P.P. Liu, Y.P. Zhang, J. Li, H.W. Tao, Q.Q. Gu & W.M. Zhu. 2009. 2-Hydroxydiplopterol, A new cytotoxic Pentacyclic Triterpenoid from the Halotolerant fungus *Aspergillus vaericolor* B -17. *Arch Pharm Res.* **32**(9) : 1211-1214.

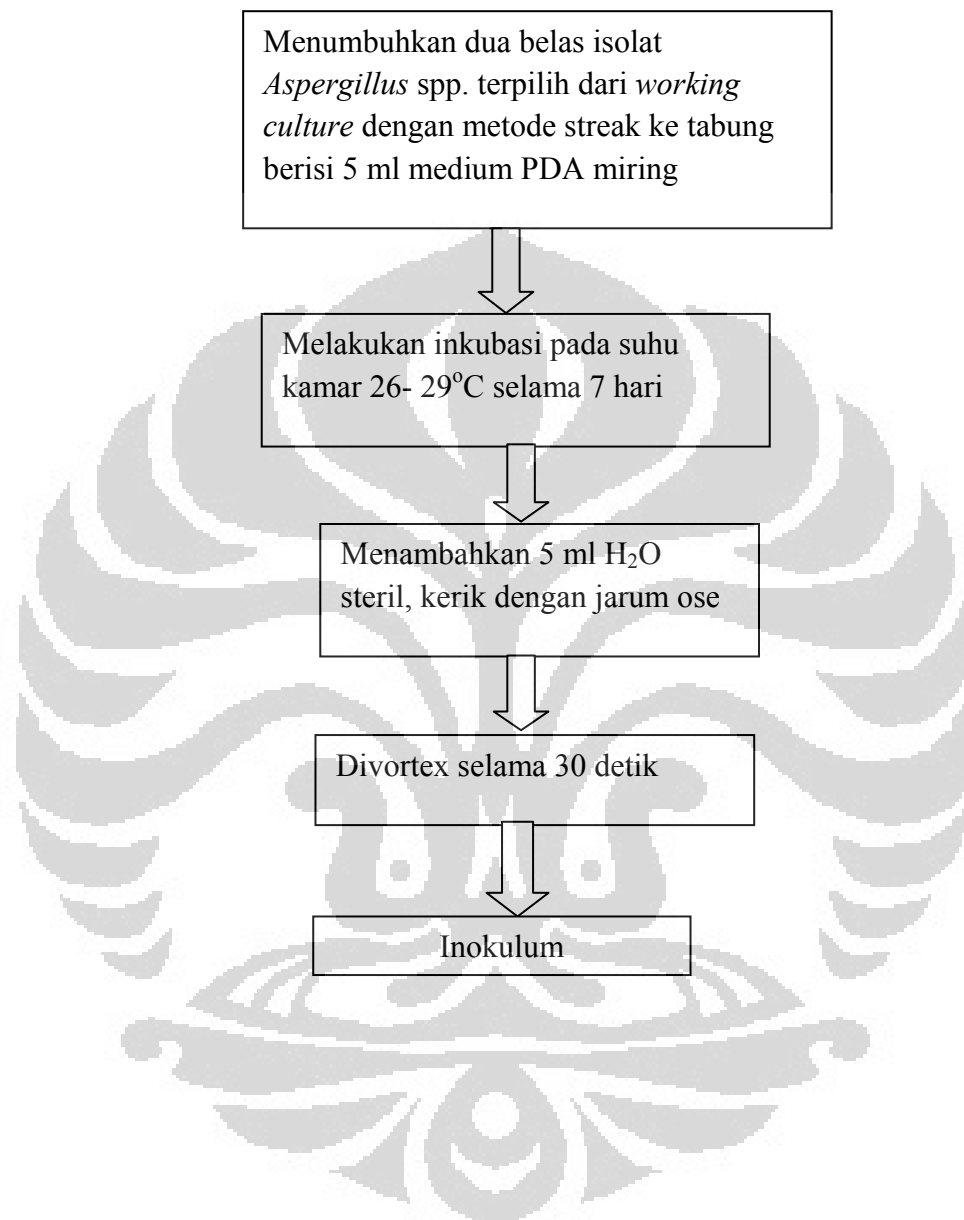


Lampiran 1.1. Pengamatan makroskopis dan mikroskopis 12 strain *Aspergillus* spp. Koleksi University of Indonesia Culture Collection (UICC)

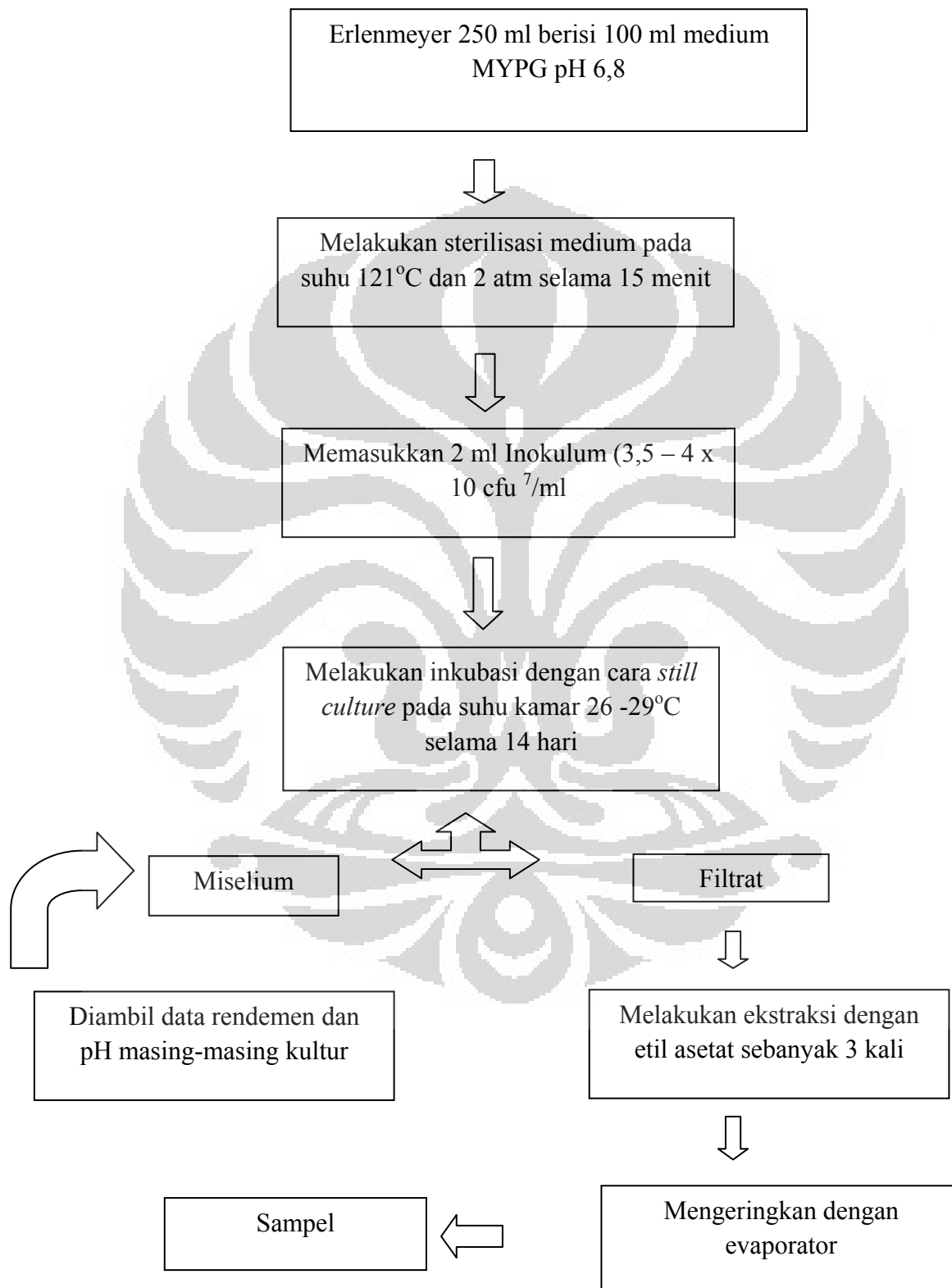
No	Isolat	Deskripsi	Makroskopis	Mikroskopis
1	<i>A. awamori</i> UICC 9	Pengamatan secara makroskopis, koloni berwarna hitam. Mikroskopis vesikel globose, biseriata, konidia spherical, berwarna coklat kehitaman.		
2	<i>A. awamori</i> UICC 30	Pengamatan secara makroskopis, koloni berwarna hitam. Mikroskopis memiliki vesikelnya bulat, konidia yang berbentuk bulat berwarna hitam, kasar.		
3	<i>A. awamori</i> UICC 31	Pengamatan secara makroskopis, koloni berwarna hitam. Mikroskopis kepala konidia radiate, vesikel bulat, biseriata, konidia spherical, berwarna hitam, halus.		
4	<i>A. ficuum</i> UICC 5	Pengamatan secara makroskopis, koloni berwarna hitam. Mikroskopis vesikelnya bulat, biseriata, konidia berwarna hitam agak kecoklatan, bulat, agak kasar.		
5	<i>A. ficuum</i> UICC 41	Pengamatan secara makroskopis, koloni hitam agak kecoklatan. Mikroskopis vesikel bulat, biseriata, konidia bulat, agak kasar.		

6	<i>A. ficuum</i> UICC 46	Pengamatan maskroskopis, koloni berwarna hitam-agak kecoklatan. Mikroskopis, vesikel biseriate, konidia hitam, bulat agak kasar.		
7	<i>A. niger</i>	Pengamatan secara makroskopis, koloni berwarna hitam. Mikroskopis Mikroskopis vesikel bulat, biseriate, konidia bulat-semi bulat, berwarna coklat, adanya ornament.		
8	<i>A. niger</i> UICC 75	Pengamatan secara makroskopis koloni berwarna hitam. Pengamatan mikroskopis: vesikel bulat, biseriate, bentuk konidia bulat- semi bulat, berwarna coklat, adanya ornamen.		
9	<i>A. niger</i> UICC 77	Pengamatan secara makroskopis, koloni berwarna hitam. Pengamatan secara mikroskopis: vesikel bulat, biseriate, bentuk konidia bulat – semi bulat, berwarna coklat, adanya ornament.		
10	<i>A. niger</i> UICC 371	Pengamatan secara makroskopis koloni berwarna hitam. Mikroskopis: vesikel bulat, biseriate, konidia bulat-semi bulat, berwarna coklat, adanya ornament.		
11	<i>A. phoenicus</i> UICC 13	Pengamatan secara makroskopis, koloni berwarna hitam. Mikroskopis: vesikel bulat, biseriate, konidia bulat-semi bulat, berwarna coklat, adanya ornamen.		
12	<i>A. tubingensis</i> UICC 27	Pengamatan secara makroskopis, koloni berwarna hitam agak kecoklatan. Mikroskopis: vesikel bulat, biseriate, konidia hitam, bulat, agak kasar		

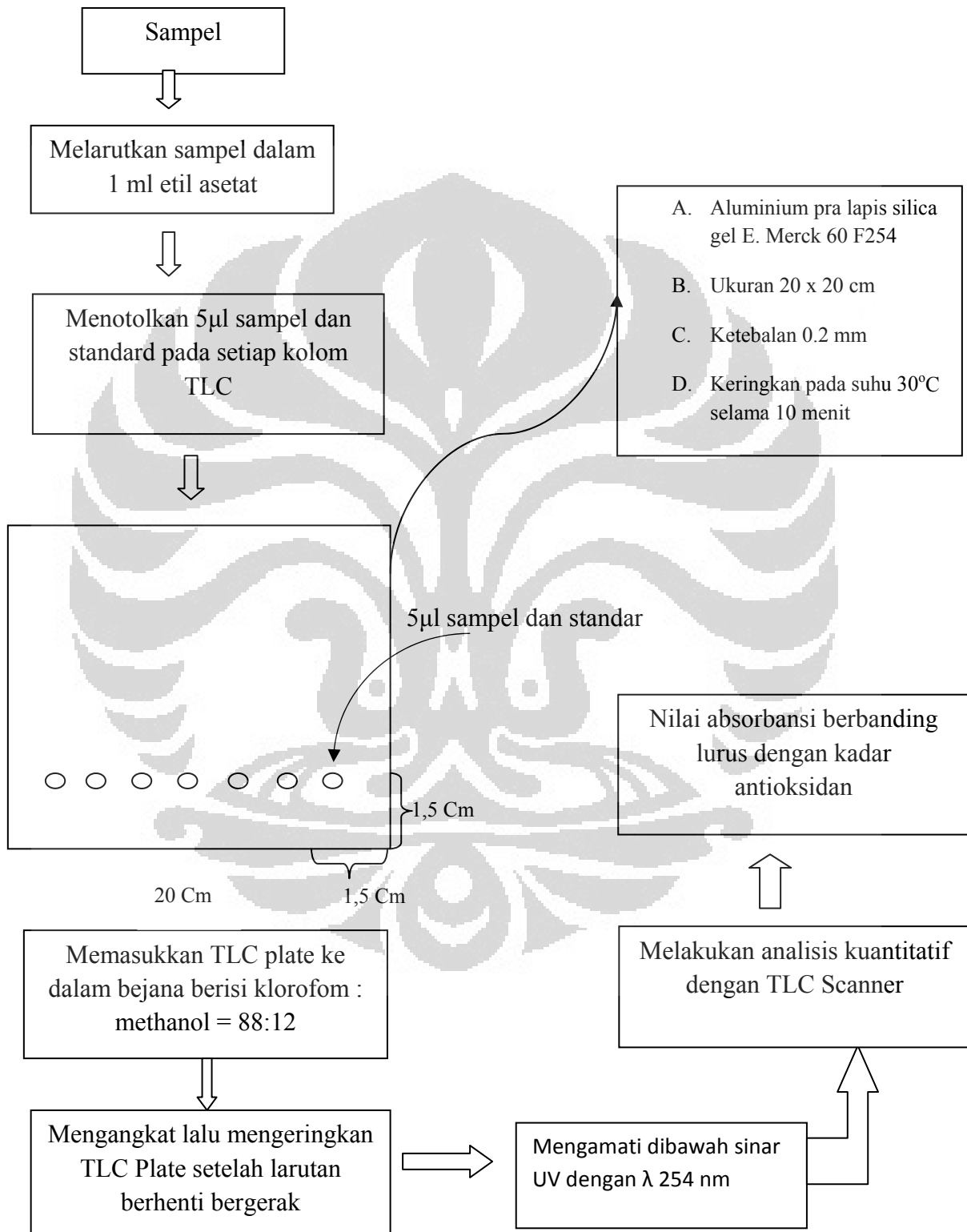
Lampiran 1.2. Alur kerja persiapan inokulum 12 *Aspergillus* spp.koleksi University of Indonesia Culture Collection (UICC)



Lampiran 1.3. Alur kerja fermentasi produksi Antioksidan (modifikasi Chin & Lee, 1997).



**Lampiran 1.4. Alur kerja analisis Kadar Antioksidan dengan KLT
(Kromatografi Lapis Tipis)**



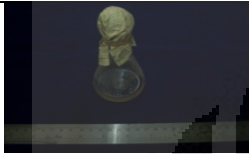

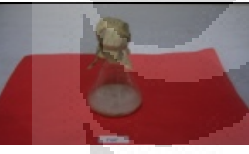


Lampiran 1.5. pH awal dan pH akhir medium MYPG pada fermentasi *Aspergillus* spp. koleksi UICC

No	Nama Kapang	pH awal	pH akhir
1	<i>A.awamori</i> UICC 9	6,8	7
2	<i>A.awamori</i> UICC 30	6,8	6
3	<i>A.awamori</i> UICC 31	6,8	6
4	<i>A.ficuum</i> UICC 5	6,8	6
5	<i>A.ficuum</i> UICC 41	6,8	6
6	<i>A.ficuum</i> UICC 46	6,8	6
7	<i>A. niger</i>	6,8	6
8	<i>A.niger</i> UICC 75	6,8	7
9	<i>A.niger</i> UICC 77	6,8	6
10	<i>A.niger</i> UICC 371	6,8	6
11	<i>A.phoenicus</i> UICC 13	6,8	7
12	<i>A.tubingensis</i> UICC 27	6,8	6



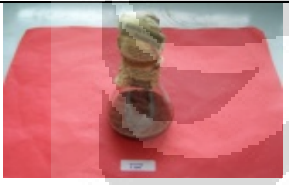

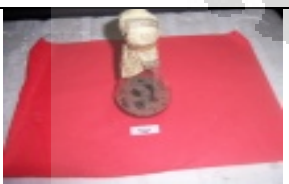
Lampiran 1.6. Rendemen ekstrak Kapang *Aspergillus* spp.

No	Nama Kapang	Rendemen Ekstrak (%)
1	<i>A.awamori</i> UICC 9	3,02
2	<i>A.awamori</i> UICC 30	1,77
3	<i>A.awamori</i> UICC 31	1,39
4	<i>A.ficuum</i> UICC 5	1,78
5	<i>A.ficuum</i> UICC 46	2,01
6	<i>A.ficuum</i> UICC 41	1,99
7	<i>A. niger</i>	2,65
8	<i>A.niger</i> UICC 75	1,77
9	<i>A.niger</i> UICC 77	1,57
10	<i>A.niger</i> UICC 371	3,80
11	<i>A.phoenicus</i> UICC 13	1,50
12	<i>A.tubingensis</i> UICC 27	2,80

Lampiran 1.7. Fermentasi kultur terendam *Aspergillus awamori* UICC 9 selama 14 hari

Hari ke-	Gambar	Keterangan
0		Medium berwarna hartal kuning
1		miselium berwarna putih seperti kapas yang membentuk seperti pulau-pulau kecil dan tidak merata diatas permukaan medium, warna medium hartal kuning emas
2		miselium berwarna putih seperti kapas menutupi seluruh permukaan medium dan berlekuk-lekuk, dan terdapat eksudat drop berwarna bening, warna medium : hartal kuning emas
3		miselium berwarna putih dan berlekuk-lekuk dan tertutupi oleh butiran berwarna coklat jangat, dan terdapat eksudat drop berwarna bening, warna medium : coklat jangat
4		miseliumnya berwarna putih dan berlekuk-lekuk dan tertutupi oleh butiran berwarna coklat jangat dan coklat, dan terdapat eksudat drop warna bening kemerahan, warna medium : coklat jangat

5		<p>miselium berlekuk-lekuk dan tertutupi oleh butiran berwarna coklat dan terdapat eksudat drop berwarna bening kemerahan dan eksudat drop lain berwarna coklat pada lekukannya, warna medium : coklat jangat</p>
6		<p>miseliumnya berlekuk-lekuk dan tertutupi oleh butiran berwarna coklat dan terdapat eksudat drop berwarna bening kemerahan dan eksudat drop berwarna coklat kehitaman pada lekukan-lekukannya, warna medium : coklat</p>
7		<p>miseliumnya berlekuk-lekuk dan tertutupi oleh butiran berwarna coklat dan terdapat eksudat drop berwarna bening kemerahan dan eksudat drop berwarna coklat kehitaman pada lekukan-lekukannya, warna medium : coklat</p>
8		<p>miseliumnya berlekuk-lekuk dan tertutupi oleh butiran berwarna coklat dan terdapat sedikit eksudat drop berwarna kuning kemerahan dan juga banyak terdapat eksudat drop berwarna coklat kehitaman pada lekukan-lekukannya, warna medium : coklat</p>
9		<p>miseliumnya berlekuk-lekuk dan tertutupi oleh butiran-butiran berwarna coklat dan terdapat sedikit eksudat drop berwarna kuning kemerahan, dan pada lekukan-lekukannya terdapat eksudat drop berwarna coklat kehitaman, beraroma, warna medium : coklat</p>

10		<p>miseliumnya berlekuk-lekuk dan tertutupi oleh butiran-butiran berwarna coklat dan terdapat sedikit eksudat drop berwarna kuning kemerahan, dan pada lekukan-lekukannya terdapat eksudat drop berwarna coklat kehitaman, beraroma, warna medium : coklat</p>
11		<p>miseliumnya berlekuk-lekuk dan tertutupi oleh butiran berwarna coklat dan terdapat eksudat drop berwarna coklat kehitaman pada lekukan-lekukannya, warna medium : coklat, eksudat drop yang berwarna kuning kemerahan mulai tidak tampak, warna medium : coklat</p>
12		<p>miseliumnya berlekuk-lekuk dan tertutupi oleh butiran berwarna coklat dan terdapat eksudat drop berwarna coklat kehitaman pada lekukan-lekukannya, warna medium : coklat, eksudat drop yang berwarna kuning kemerahan mulai tidak tampak, warna medium : coklat</p>
13		<p>miseliumnya berlekuk-lekuk dan tertutupi oleh butiran berwarna coklat dan terdapat eksudat drop berwarna coklat kehitaman pada lekukan-lekukannya, warna medium : coklat, eksudat drop yang berwarna kuning kemerahan mulai tidak tampak, warna medium : coklat</p>
14		<p>miseliumnya berlekuk-lekuk dan tertutupi oleh butiran berwarna coklat dan terdapat eksudat drop berwarna coklat kehitaman pada lekukan-lekukannya, warna medium : coklat, eksudat drop yang berwarna kuning kemerahan mulai tidak tampak, warna medium : coklat</p>

Lampiran 1.8. Nilai Rf dari *Aspergillus* spp. koleksi UICC

No	Isolat	Nilai Rf
1	<i>A.awamori</i> UICC 9	0,16
2	<i>A.awamori</i> UICC 30	0,17
3	<i>A.awamori</i> UICC 31	0,20
4	<i>A.ficuum</i> UICC 5	0,15
5	<i>A.ficuum</i> UICC 41	0,19
6	<i>A.ficuum</i> UICC 46	0,21
7	<i>A. niger</i>	0,16
8	<i>A.niger</i> UICC 75	0,19
9	<i>A.niger</i> UICC 77	0,22
10	<i>A.niger</i> UICC 371	0,22
11	<i>A.phoenicus</i> UICC 13	0,16
12	<i>A.tubingensis</i> UICC 27	0,20
13	BHT	0,16

Lampiran 1. 9 Perhitungan konsentrasi ekstrak *Aspergillus spp.* untuk uji aktivitas antioksidan metode DPPH

Diketahui :

- Massa ekstrak = 4 mg
- Massa jenis metanol = 0,7907 g/ml
- Konsentrasi ekstrak 400 ppm
- Konsentrasi ekstrak 800 ppm
- Konsentrasi ekstrak 1600 ppm
- Konsentrasi ekstrak 3200 ppm

Dicari :

- Volume methanol yang diperlukan untuk konsentrasi 400, 800, 1600 dan 3200 ppm

Perhitungan :

- Dosis 400 ppm

$$400 \text{ ppm} = \frac{4 \text{ mg}}{M_{\text{campuran}}} \times 10^6 \text{ ppm}$$

$$M_{\text{campuran}} = \frac{4 \cdot 10^6}{4 \cdot 10^2} = 10^4 \text{ mg} = 10000 \text{ mg}$$

$$\text{Massa methanol} = 10000 \text{ mg} - 4 \text{ mg} = 9996 \text{ mg} = 9,996 \text{ g}$$

$$\text{Volume methanol yang diperlukan} = \frac{9,996 \text{ g}}{0,7907 \text{ g/ml}} = 12,642 \text{ l}$$

- Dosis 800 ppm, methanol yang diperlukan = 6,321 ml
- Dosis 1600 ppm, methanol yang diperlukan = 3,161 ml
- Dosis 3200 ppm, methanol yang diperlukan = 1,580 ml

Makalah II

PENGARUH ANTIOKSIDAN EKSTRAK *Aspergillus* spp. TERHADAP PERBAIKAN JARINGAN HATI TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus* L.) GALUR SPRAGUE-DAWLEY

Cisca Lasmaria
clmelastoma@gmail.com

ABSTRACT

Aspergillus spp are molds produced secondary metabolite as antioxidant. In this study using 25 rats are divided by randoms in 5 groups. Every group consist of 5 rats : K1 (aquades); K2 (CMC5%); Three groups are given by extract antioxidant produced from fermentation of *Aspergillus awamori* UICC 9 with various of doses (0.36; 0.72; 1.08 mg/day) on the rats and examined the effect on repaired in liver tissues of rats for 9 days. CCl₄ given to every group on the 10th days except group K1. The research show that extract of antioxidant dose are given 0.36; 0.72; 1.08 mg/day are significant effect of mean diameter of centralis of vein, Concentration of Serum Glutamate Oxaloacetat Transferase (SGOT) and Serum Glutamat Piruvat Transferase (SGPT) compared with negative control (K1). The result of DMRT shows mean diameter of centralis vein between of the treatment non significant, if compared by K2 are significant effect. The mean concentration of SGOT shows treatment KP2 and KP3 are significant compared by KP1 and K2. The mean concentration of SGPT shows non significant between the treatment. The best result of repaired liver tissues on this research are extract antioxidant dose 1.08 mg/day.

Key words : *Antioxidant, Serum Glutamat Oksaloasetat Transaminase (SGOT), Serum Glutamat Piruvat Transaminase (SGPT)*

I. PENDAHULUAN

Hati merupakan organ terbesar yang sangat penting untuk pertahanan hidup dan berperan hampir dalam setiap fungsi metabolik tubuh. Hati memiliki peranan penting pada metabolisme karbohidrat, protein dan lemak, selain itu juga berperan dalam pertahanan tubuh, baik berupa detoksifikasi maupun fungsi perlindungan. Detoksifikasi dilakukan dengan berbagai proses yang dilakukan enzim-enzim di hati terhadap zat-zat beracun (Price dan Wilson, 1995).

Enzim yang mengkatalisis pemindahan gugus amino secara reversibel antara asam amino dan alfa -keto ialah enzim aminotransferase. Apabila terjadi gangguan fungsi hati, enzim aminotransferase di dalam sel akan masuk ke dalam peredaran darah, karena terjadi perubahan permeabilitas membran sel sehingga kadar enzim aminotransferase dalam darah akan meningkat (Widman, 1989).

Dua macam enzim aminotransferase yang paling sering dihubungkan dengan kerusakan sel hati adalah aspartat aminotransferase (AST) yang juga disebut SGOT (serum glutamat oksaloasetat transaminase) dan alanin aminotransferase (ALT) yang juga disebut SGPT (serum glutamat piruvat transaminase). Bila terjadi kerusakan hati, enzim transaminase dilepaskan ke dalam darah dari sitosol dan organel subselel seperti mitokondria, lisosom dan nukleus (Lu, 1995). Pengukuran konsentrasi enzim di dalam darah dengan uji SGOT dan SGPT dapat memberikan informasi penting mengenai tingkat gangguan fungsi hati. Aktivitas transaminase di dalam hati dapat dideteksi meskipun dalam jumlah sangat kecil (Lehninger, 1991).

Sel-sel hati sering mengalami kerusakan. Kerusakan hati akibat infeksi, obat ataupun virus dapat menyebabkan kerusakan menetap pada sel-sel hati yang berakibat pada peradangan (hepatitis) ataupun kematian sel-sel hati (nekrosis). Salah satu penyebab hepatitis adalah senyawa radikal bebas. Radikal bebas sangat diperlukan bagi kelangsungan beberapa proses fisiologis dalam tubuh, terutama untuk transportasi elektron. Namun, radikal bebas yang berlebihan dapat membahayakan tubuh karena dapat merusak makromolekul dalam sel seperti karbohidrat, protein, lemak, DNA dan menginisiasi timbulnya penyakit degeneratif yang salah satunya adalah kerusakan sel hati. Karbon tetraklorida merupakan salah satu jenis hepatotoksin yang dapat menghasilkan senyawa

radikal bebas. Karbon tetraklorida tertimbun secara besar-besaran dalam lemak tubuh, hati dan sumsum tulang belakang. Karbon tetraklorida diaktifkan oleh enzim sitokrom P-450 menjadi radikal triklorometil peroksi (CCl_3O_2^*) yang reaktivitasnya tinggi. Radikal yang dihasilkan dapat menyebabkan autooksidasi pada asam lemak yang terdapat dalam membran sel. Oleh sebab itu, CCl_4 dapat menyebabkan nekrosis yang hebat di dalam sentrolobuler hati yang mengandung isoenzim sitokrom P-450 dengan konsentrasi tertinggi (Dienstag dan Isselbacher, 1995). Dengan adanya senyawa antioksidan maka elektron bebas pada radikal bebas akan diikat sehingga terbentuk molekul yang stabil dan menghentikan berbagai kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas berlebih yang ada di dalam tubuh (Wresdiyati *et al.* 2003).

Salah satu mikroorganisme yang mengandung senyawa antioksidan sebagai hasil metabolit sekunder adalah kapang *Aspergillus* spp. Hasil penelitian Chin dan Lee (1997) mengatakan bahwa kapang-kapang penghasil antioksidan adalah *Aspergillus*, *Penicillium* dan *Rhizopus* yang diisolasi dari berbagai makanan. Hasil penelitian sebelumnya Chin dan Lee (1996) meneliti ekstrak dari 10 strain kapang yang digunakan dalam fermentasi makanan, menunjukkan hasil bahwa ekstrak etil asetat dari *Aspergillus candidus* memperlihatkan aktivitas antioksidan yang kuat.

Hasil penelitian yang disajikan dalam makalah pertama dalam penelitian menunjukkan bahwa *Aspergillus awamori* UICC 9 mampu menghasilkan antioksidan ditumbuhkan pada medium *Malt Yeast Pepton Glucose* (MYPG), juga telah dilakukan uji fitokimia, analisis KLT dan analisis aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH untuk mengkonfirmasi bahwa hasil fermentasi dari kapang tersebut berupa antioksidan. Pengujian lebih lanjut akan dilakukan untuk mengetahui apakah antioksidan dari kapang tersebut dapat memperbaiki jaringan hati tikus putih *Rattus norvegicus* yang diinduksi dengan CCl_4 penyebab kerusakan pada sel-sel hati.

Penelitian tentang perbaikan jaringan hati oleh antioksidan yang dihasilkan kapang telah dilaporkan oleh Nainggolan (2005), residu ekstrak *Aspergillus terreus* mampu mengurangi kerusakan jaringan hati yang diakibatkan oleh pemberian CCl_4 . Fujita dan Yamagami (2001) melaporkan bahwa *Touchi*

Extract (TE) yang diperoleh dari hasil fermentasi kedelai dengan kapang *Aspergillus terreus* (koji) yang diberikan pada tikus putih menunjukkan penurunan kadar SGOT secara bermakna pada ekstrak 133 mg/KgBB dibanding dengan kelompok tikus kontrol.

Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh antioksidan yang dihasilkan oleh *Aspergillus awamori* UICC 9 dalam memperbaiki kerusakan jaringan hati tikus putih *Rattus norvegicus* L galur Sprague –Dawley.

1.1. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Lokasi penelitian dilaksanakan di laboratorium reproduksi dan perkembangan, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, Depok Jawa Barat, dan di Laboratorium Klinik Bahar Medika, Depok. Waktu penelitian: Agustus 2010-September 2010.

1.2. ALAT, BAHAN DAN CARA KERJA

1.2.1. ALAT

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah sonde, timbangan elektrik, alat timbang analitik, Spektrofotometer UV-visibel, Termos Es, Centrifuge automatic high speed refrigerated (Hitachi 18 PR-5), gelas beker, labu takar, Dissecting set, magnetic stirrer, pipet ukur, labu ukur, botol alkohol, botol minuman You cee, cawan uap, bak plastik, kit enzimatik Diasys (International Holzhelm, Germany).

1.2.1.1 Hewan Percobaan

Hewan yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) galur Sprague –Dawley, jantan, berumur 2 bulan dengan berat \pm 200g sebanyak 25 ekor. Tikus diperoleh dari Institut Pertanian Bogor (IPB), Bogor. *Rattus norvegicus* L. (tikus putih) galur Sprague-Dawley merupakan hewan uji yang sering digunakan dalam berbagai penelitian. Hewan tersebut mempunyai ciri

warna tubuh putih, mata warna merah (albino), ukuran kepalanya kecil dan ekornya lebih panjang dari tubuhnya (Malole & Pramono, 1989).

Rattus norvegicus galur Sprague-Dawley banyak digunakan sebagai hewan uji dalam penelitian karena mudah dipelihara dalam populasi besar, cepat berkembang biak serta memiliki masa hidup sekitar 24 – 30 bulan, sehingga cocok untuk penelitian jangka panjang (Malole & Pramono, 1989).

1.2.2. BAHAN

Bahan uji adalah ekstrak antioksidan dari hasil fermentasi *Aspergillus awamori* UICC 9 yang merupakan hasil dari makalah I; Pelet atau pakan tikus (CV Kasman, Sunter). Komposisi nutrient dalam pakan tercantum pada Lampiran 2.1. Karbon tetraklorida (CCl₄) (Merck); Akuades, Carboxil Methyl Cellulose (CMC) 0,5%; Larutan desinfektan (Bayclin), Eter (Merck), Alkohol teknis 70%, Alkohol 96% (Merck), Alkohol 100% (Merck), Reagen kit enzimatik Diasys (International Holzhelm, Germany). Larutan Natrium Klorida (NaCl) 0,9% (Merck), Larutan Bouin, Benzil Benzoat (Merck), Benzol (Merck), Albumin Meyer, Parafin, Spiritus, xilol (teknis), Hemaktosilin, Eosin.

1.2.3. CARA KERJA

1.2.3.1. Penetapan Dosis

Dosis yang diberikan sesuai dengan dosis pada manusia yang telah dikonversi dari manusia ke tikus ($\times 0,018$) (Sumarni *et al.* 2006) yaitu:

- i. $100 \text{ mg/kgbb} = 20 \text{ mg}/200 \text{ g bb} \times 0,018 = 0,36 \text{ mg}/200 \text{ g bb}$ tikus (dosis I)
- ii. $200 \text{ mg/kg bb} = 40 \text{ mg}/200 \text{ g bb} \times 0,018 = 0,72 \text{ mg}/200 \text{ g bb}$ tikus (dosis II)
- iii. $300 \text{ mg/kg bb} = 60 \text{ mg}/200 \text{ g bb} \times 0,018 = 1,08 \text{ mg}/200 \text{ g bb}$ tikus (dosis III).

Suspensi ekstrak *Aspergillus* diberikan satu kali per hari. Volume ekstrak yang diberikan pada kelompok perlakuan setiap kali pencekokan disesuaikan dengan berat badan *Rattus norvegicus* yaitu 1 ml untuk setiap 100 g berat badan (Ngatidjan, 1991; Sumarni *et al.* 2006).

1.2.3.2. Perlakuan Hewan Uji

Tikus putih *Rattus norvegicus* diadaptasikan selama 2 minggu. Setiap kandang berisi 5 ekor tikus putih yang mewakili 5 perlakuan yaitu K1, K2, KP1, KP2 dan KP3. K1 (kelompok kontrol negatif) diberi akuades, K2 (kelompok kontrol positif) diberi CMC 0,5%, KP1 (kelompok perlakuan 1) dipapar dengan sediaan ekstrak *Aspergillus awamori* dengan dosis 0,36 mg/ 200 g bb, KP2 (kelompok perlakuan 2) dipapar dengan sediaan ekstrak *Aspergillus awamori* dengan dosis 0,72 mg/ 200 g bb, KP3 (kelompok perlakuan 3) dipapar dengan sediaan ekstrak *Aspergillus awamori* dengan dosis 1,08 mg/ 200 g bb tikus. Pemberian perlakuan dilakukan setiap hari sampai 9 hari. Karbon tetraklorida diberikan pada tikus putih *Rattus norvegicus* yang diberi perlakuan pada K2, KP, KP2 dan KP3 dengan cara penyuntikan intra peritoneal pada hari ke-10 (Nainggolan, 2005).

Setiap hari makanan dan minuman diberikan secara *ad libitum* (tidak terbatas). Kandang terbuat dari kawat dengan alas kandang dari bak plastik berbentuk kotak. Alas kandang dibersihkan 3 kali seminggu, setelah dibersihkan, pada alas kandang diletakkan serutan kayu. Kandang diletakkan pada rak di dalam ruang pemeliharaan hewan, Laboratorium Reproduksi dan Perkembangan, Departemen Biologi FMIPA UI.

1.2.3.3. Pembedahan dan Fiksasi Organ Hati (Suntoro, 1983)

Pengambilan organ hati dilakukan dengan cara pembedahan menggunakan dissecting set, *Rattus norvegicus* dibius terlebih dahulu menggunakan eter. *Rattus norvegicus* yang sudah dibius, ditempatkan pada papan bedah. Pembedahan untuk mengambil organ hati dilakukan pada bagian abdomen. Setelah organ hati dikeluarkan dan diambil, organ tersebut dibersihkan dan dicuci dalam larutan NaCl 0,9% kemudian ditimbang dan dilakukan pengamatan morfologi. Organ yang telah ditimbang, kemudian dipilih satu lobus dan dipotong menjadi kotak-kotak kecil (1,5 x 1 x 0,5) cm³ untuk mempermudah penyayatan, kemudian difiksasi dengan larutan Bouin selama 24 jam selanjutnya pembuatan preparat awetan menggunakan metode parafin serta pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE).

1.2.3.4. Pengamatan Sediaan Histologi Organ Hati

Pengamatan untuk mengetahui adanya kerusakan dan perbaikan organ hati dilihat dari lobulus hati, vena sentralis dan hepatositnya. Pengamatan sediaan organ hati dilakukan secara semikuantitatif dan kuantitatif. Uji semikuantitatif dilakukan pada 20 lobulus hati dari 3 sediaan pada setiap unit perlakuan dengan memberi derajat kerusakan vena sentralis dan daerah parenkim (Afifah, 2006). Kerusakan vena sentralis pada sediaan meliputi lisisnya sel-sel endotel pada dinding pembuluh vena sentralis, sedangkan kerusakan daerah parenkim berupa pelebaran sinusoid dan rusaknya sel-sel hepatosit yang mengalami lisis (Afifah, 2006).

Derajat kerusakan diberikan dalam 4 tingkatan yaitu derajat kerusakan 0 (tidak ada kerusakan), derajat kerusakan 1 (kerusakan ringan), derajat kerusakan 2 (kerusakan sedang), derajat kerusakan 3 (kerusakan berat). Derajat kerusakan 0 diberikan pada sediaan organ hati yang vena sentralisnya dan sel-sel parenkimnya tidak mengalami kerusakan. Derajat kerusakan 1 diberikan pada sediaan organ hati yang mengalami kerusakan pada vena sentralisnya dan sel-sel parenkim disekitar vena sentralis (kerusakan < 20% luas lobulus). Derajat kerusakan 2 diberikan pada sediaan organ hati yang mengalami kerusakan pada vena sentralisnya dan sel-sel parenkim disekitar vena sentralis (kerusakan 20-40% luas lobulus). Derajat kerusakan 3 diberikan pada sediaan organ hati yang mengalami kerusakan pada vena sentralis dan kerusakan pada sel-sel parenkim yang lebih luas pada jaringan hati (kerusakan > 40% luas lobulus) (Nainggolan, 2005; Afifah, 2006).

Pengamatan kuantitatif dilakukan dengan mengukur diameter vena sentralis. Tehnik pengukuran dilakukan dengan menggunakan mikroprojektor yang sebelumnya telah dikalibrasi. Setiap unit perlakuan dibuat 3 sediaan dan pengukuran dilakukan pada 20 diameter vena sentralis. Jumlah sediaan yang diamati dari setiap ekor tikus putih adalah 3 sediaan. Jumlah seluruh sediaan dari 5 kelompok dengan 5 ulangan adalah 75 sediaan. Kerusakan sel hati akibat pemberian CCl₄ dosis tunggal pada tikus menyebabkan nekrosis sentralobuler dan degenerasi lemak (Shenoy *et al.* 2001).

1.2.3.5. Prosedur Uji Glutamat Piruvat Transaminase (GPT) dan Glutamat Oksaloasetat Transaminase (GOT)(Metode IFCC, 1986).

Terminasi dilakukan setelah 24 jam pemberian CCl_4 yaitu pada hari ke-10. Tikus dipuasakan 17 jam sebelum dilakukan terminasi. Sebelum laparotomi, dilakukan pembiusan dengan eter, selanjutnya dilakukan dekapitasi, darah ditampung sebanyak 2 ml untuk memperoleh plasma untuk pemeriksaan kadar GPT (Glutamat Piruvat Transaminase) dan GOT (Glutamat Oksaloasetat Transaminase).

Pengukuran kadar GPT plasma dengan menggunakan kit enzimatik Diasys (International Holzhelm, Germany) dengan menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 340 nm. Pengukuran dilakukan berdasarkan prosedur yang sudah ditetapkan oleh produsen kit yang bersangkutan sebagai berikut : 100 μL sampel ditambahkan 1000 μL pereaksi, dicampur dengan menggunakan vortex hingga homogen. Kemudian campuran dimasukkan kedalam kuvet 1 ml, dibaca serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV pada $\lambda 430$ nm dan suhu 37°C. Pembacaan dilakukan pada menit ke-1, 2, 3 dan 4 sejak pereaksi ditambahkan. Selanjutnya dihitung selisih serapan atau delta absorbansi/menit.

$$\text{Kadar GPT/GOT} = \text{rerata}(\Delta) \text{ absorbansi/menit} \times 2200 \text{ U/L}$$

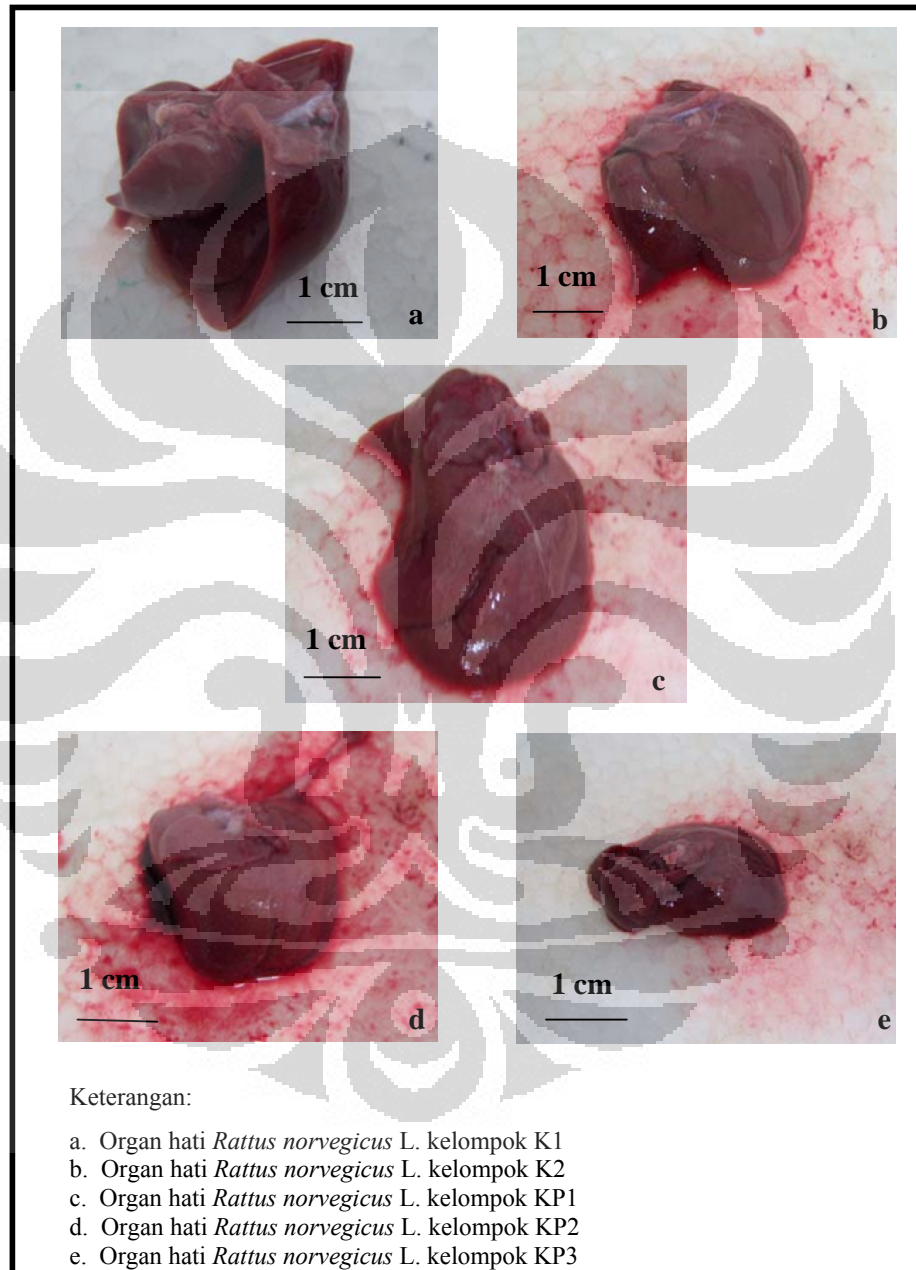
1.2.3.6. Analisis Statistik

Hasil pengukuran kadar GPT dan GOT dinyatakan sebagai nilai rerata (SB) dianalisis dengan komputer menggunakan program Statistical for Social Science (SPSS) versi 17. Hasil pengukuran kadar GOT dan GPT dalam plasma merupakan skala interval. Bila distribusi frekuensi data yang diperoleh normal, maka selanjutnya dilakukan uji Anava satu arah, dengan batas kemaknaan ($p < 0,05$), jika bermakna kemudian dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan/ Duncan Multiple Range Test (DMRT).

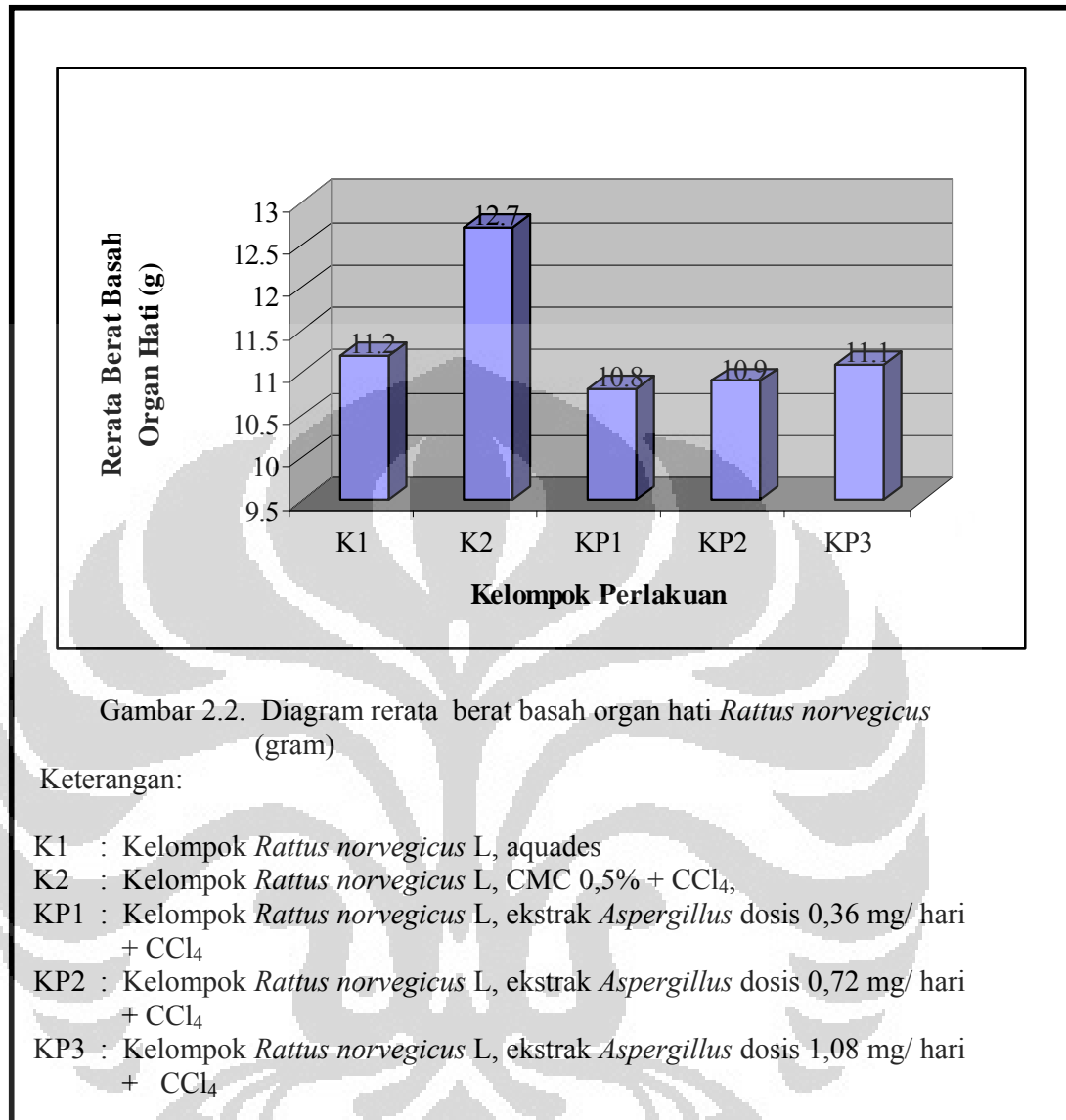
Data diameter vena sentralis hati tikus putih diuji normalitasnya menggunakan uji Shapiro-Wilk, dan diuji homogenitasnya menggunakan uji Bartlett. Data diameter vena sentralis yang diperoleh bersifat normal dan homogen, maka data selanjutnya diuji dengan uji analisis varians (Anava) satu arah dengan batas kemaknaan ($p < 0,05$), kemudian diuji dengan uji DMRT (Steel & Torrie, 1989).

2. HASIL DAN PEMBAHASAN

2.1. Pengamatan makroskopis Hati



Gambar 2.1. Organ hati *Rattus norvegicus* L. tiap kelompok perlakuan



Berdasarkan hasil pengamatan pada Gambar 2.1 tekstur organ hati tikus putih *Rattus norvegicus* Sprague Dawley terlihat licin dan berwarna merah hati segar pada kelompok perlakuan K1 (normal). Pada perlakuan dosis 0,36 mg/ hari (KP1) tekstur organ hati tetap licin dan terlihat perubahan warna merah hati yang agak memucat sedangkan pada perlakuan dosis 1,08 mg/ hari KP3 tetap berwarna merah hati segar dan tekstur organ hati juga licin.

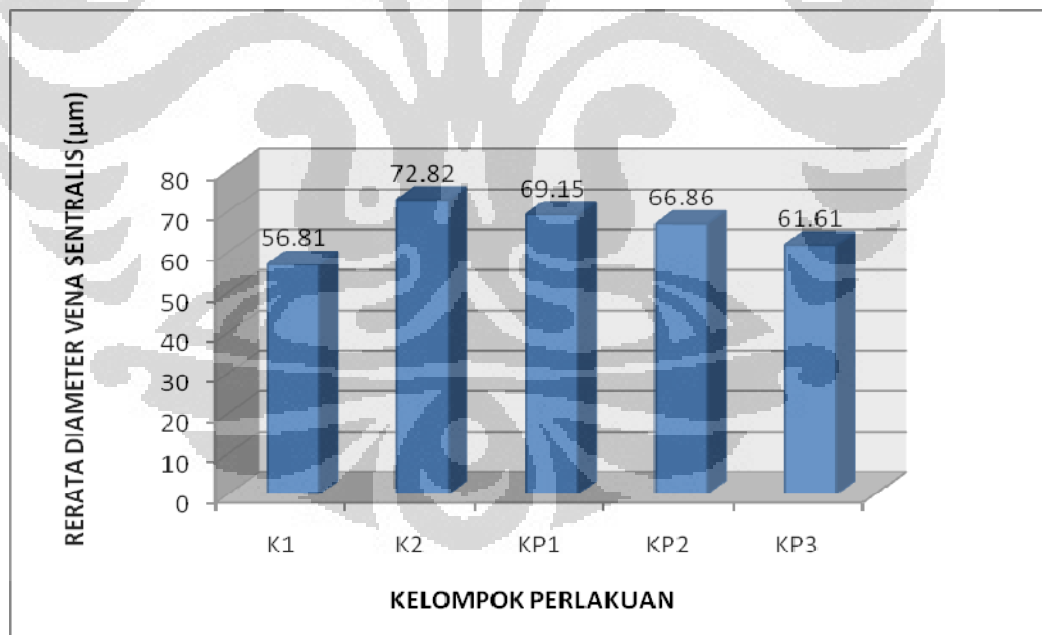
Perubahan warna dan morfologi organ umumnya dipengaruhi oleh adanya perubahan fisiologik dan struktur mikroskopik. Radikal triklorometil peroksi

yang terbentuk dari bioaktivasi CCl_4 akan merusak jaringan hati termasuk sistem aliran darah hati.

Pada Gambar 2.2. berat rerata organ hati perlakuan K2 (12,7 g) terlihat memiliki berat rerata tertinggi dibanding perlakuan K1; KP1; KP2 dan KP3 yaitu 11,2 g; 10,8 g; 10,9 g; dan 11,1g. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada kelompok K2 telah terjadi perubahan morfologi jaringan hati. Keadaan ini sesuai dengan pernyataan Lu (1995) bahwa penambahan berat mungkin terjadi karena adanya kandungan lemak dalam hati. Perlemakan (steatosis) disebabkan oleh terpaparnya CCl_4 ke dalam jaringan hati yang mengakibatkan munculnya butiran-butiran lemak, yang pada sediaan histologik tidak terwarnai oleh pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE) (Gambar 2. 4).

2.2. Pengamatan mikroskopis organ hati

2.2.1. Pengamatan kuantitatif diameter vena sentralis



Gambar 2.3 Diagram batang rerata diameter vena sentralis hati *Rattus norvegicus*

Keterangan:

- K1 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, aquades
 K2 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, CMC 0,5% + CCl₄
 KP1 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, ekstrak *Aspergillus* dosis 0,36 mg/ hari
 + CCl₄
 KP2 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, ekstrak *Aspergillus* dosis 0,72 mg/ hari
 + CCl₄
 KP3 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, ekstrak *Aspergillus* dosis 1,08 mg/ hari
 + CCl₄

Data hasil pengamatan pada Gambar 2.3. menunjukkan rata-rata diameter vena sentralis. Diameter vena sentralis rata-rata pada K1; K2; KP1; KP2 dan KP3 secara berturut-turut 56,81; 72,82; 69,15; 66,86 dan 61,61 (μm). Dari hasil analisis varian (Anova) rata-rata diameter vena sentralis antar kelompok perlakuan berbeda nyata ($P < 0,05$). Hasil uji jarak berganda Duncan (DMRT) antara kelompok perlakuan dosis 0,36 mg/hari (KP1); dosis 0,72 mg/hari (KP2) dan dosis 1,08 mg/hari (KP3) tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$). Sedangkan antara kelompok kontrol negatif (K1); KP3 dan KP2 tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$) demikian juga antara kelompok kontrol positif dengan KP1 dan KP2 tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$), akan tetapi pada kelompok kontrol negatif (K1) dan kelompok perlakuan dosis 1,08 mg/hari (KP3) lebih rendah secara bermakna ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K2).

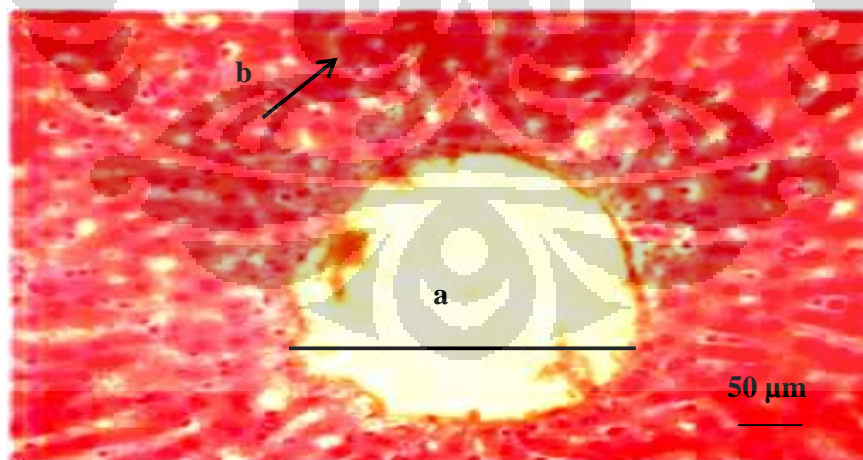
Diameter rata-rata pada kelompok K2 terjadi perbesaran diameter rata-rata vena sentralis melebihi normal/ kontrol negatif (K1). Struktur histologis kelompok kontrol negatif (K1) umumnya menunjukkan gambaran sel-sel hati dengan inti dan batas-batas sel yang jelas. Kerusakan pada vena sentralis menunjukkan bahwa sel hati mengalami regenerasi pada vena sentralis, dimulai dari bagian endotel yang merupakan bagian yang sangat peka terhadap racun. Kerusakan pada vena sentralis biasanya disertai dengan reaksi pembendungan (Leeson *et al.* 1996).

Pembendungan pada hati selalu dimulai dari vena sentralis. Vena sentralis merupakan tempat penampungan darah yang berasal dari arteri hepatica dan vena porta (Ressang, 1984). Sesuai dengan pernyataan Lesson *et al.* (1996), bahwa apabila lapisan otot polos yang terdapat pada tunika media dinding vena sentralis

telah rusak maka akan mengganggu kontraksi pada vena sentralis. Sebagai akibatnya, sirkulasi darah terganggu dan sel-sel hati akan mengalami nekrosis.

Hasil pengamatan kelompok perlakuan dosis 0,36 mg/ hari (KP1), dosis 0,72 mg/hari (KP2) dan dosis 1,08 mg/hari (KP3) memiliki diameter rata-rata vena sentralis yang lebih kecil dibanding kelompok K2 dimana semakin tinggi dosis pemberian ekstrak *Aspergillus awamori* UICC 9 memberikan hasil pengukuran diameter rata-rata vena sentralis yang semakin rendah, sehingga menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Aspergillus awamori* UICC 9 pada tikus putih sebelum diinduksi CCl₄ dapat meminimalisir tingkat kerusakan hati. Efek perbaikan jaringan hati yang dimiliki oleh ekstrak *Aspergillus awamori* UICC 9 diduga disebabkan oleh senyawa flavonoid yang memperlihatkan efek antioksidan (Wang *et al.* 2007). Antioksidan merupakan salah satu senyawa yang dapat menginaktivkan radikal bebas, molekul tidak stabil yang dihasilkan oleh berbagai jenis proses kimia normal tubuh, radiasi matahari, asap rokok dan pengaruh lingkungan lainnya (Hamdayani dan Sulistiyo, 2008). Proses toksikasi CCl₄ dapat dihambat oleh adanya antioksidan (Weber *et al.* 2003).

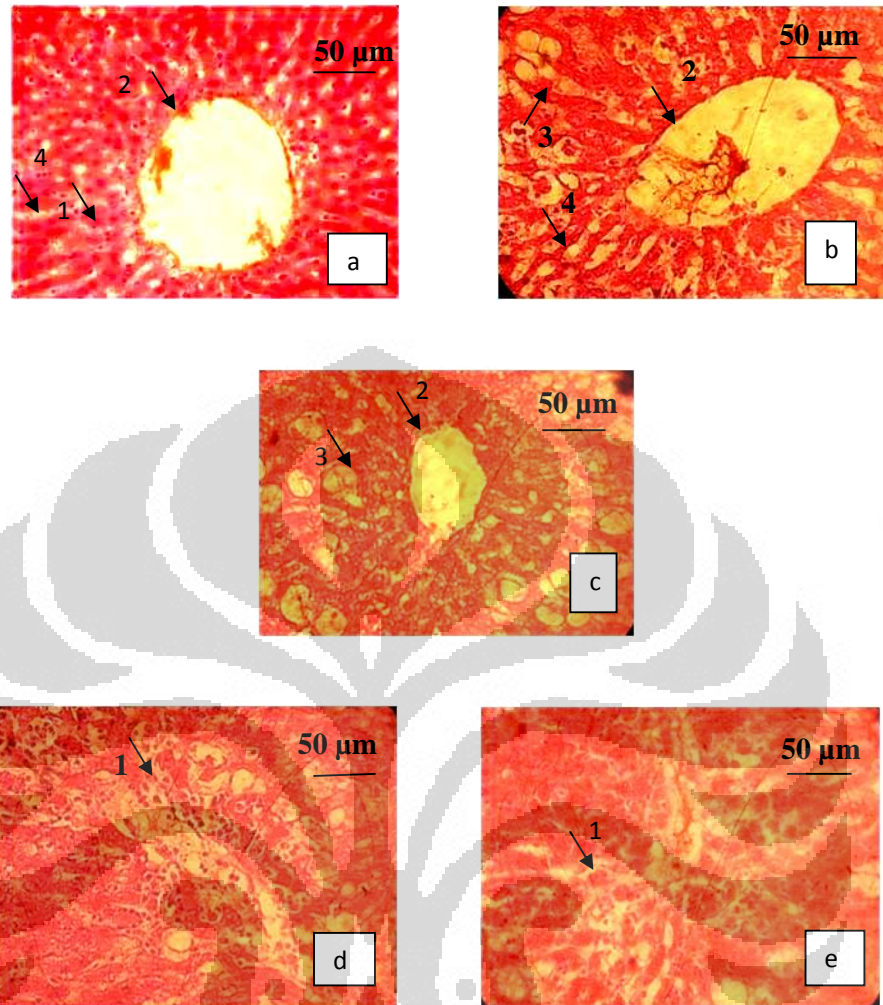
2.2.2 Pengamatan histologis hati dan persentase derajat kerusakan hati



Gambar 2.4. Gambaran histologis organ hati normal *Rattus norvegicus* L.

Keterangan:

- a. Diameter vena sentralis hati
- b. Sel hepatosit



Keterangan:

- a. Organ hati *Rattus norvegicus* L. kelompok K1 (aquades)
- b. Organ hati *Rattus norvegicus* L. kelompok K2(CMC 0,5%) + CCl₄
- c. Organ hati *Rattus norvegicus* L. kelompok KP1(dosis 0,36 mg/ hari) + CCl₄
- d. Organ hati *Rattus norvegicus* L. kelompok KP2 (dosis 0,72 mg/hari) + CCl₄
- e. Organ hati *Rattus norvegicus* L. kelompok KP3 (dosis 1,08 mg/hari) + CCl₄

1. Sel hepatosit
2. Vena sentralisl
3. Sel hati yang mengalami perlemakan
4. Sinusoid

Gambar 2.5. Gambaran histologis organ hati *Rattus norvegicus* L. tiap kelompok perlakuan (perbesaran 10 x 40)

Gambaran histologis K2 pada Gambar 2.5b juga menunjukkan terjadinya steatosis (perlemakan) pada jaringan hati. Penumpukan lemak terjadi akibat terganggunya proses metabolisme lemak dalam organ hati (Hinton dan Grasso, 1993).

Akibat penumpukan maka akan terganggunya jalur pelepasan trigliserida dari organ hati ke plasma. Trigliserida yang ada dalam jaringan hati, hanya dapat disekresi bila berikatan dengan lipoprotein. Senyawa toksik seperti CCl_4 dapat menghambat konjugasi trigliserida dengan lipoprotein, sehingga trigliserida akan tertimbun dalam jaringan hati (Lu, 1995).

Hasil pengamatan persentase lobulus hati normal dan derajat kerusakan hati pada gambar 2.6 dan lampiran 2.8 menunjukkan bahwa persentase rata-rata lobulus hati normal dan kerusakan ringan (derajat 1) berturut-turut pada kelompok pada kontrol negatif (K1) sebesar 94% dan 6%. Kerusakan sedang (derajat 2) dan kerusakan berat (derajat 3) tidak ditemukan pada kelompok K1. Persentase tersebut menunjukkan keadaan lobulus hati yang hampir normal sesuai dengan pernyataan Leeson *et al.* (1996) yaitu sel hati yang berbentuk polihedral, memiliki satu atau dua inti berbentuk bulat atau lonjong dan memiliki batas-batas sel yang jelas (Gambar 2.4 dan 2.5a).

Kelompok K2 merupakan kelompok kontrol positif yang diberikan CCl_4 sehingga dapat menunjukkan gambaran kerusakan hati. Kelompok kontrol tersebut dapat dijadikan pembandingan terhadap penilaian ada atau tidaknya proses perbaikan sel-sel hati pada kelompok-kelompok perlakuan dengan pencekakan ekstrak antioksidan hasil fermentasi kapang *Aspergillus awamori* UICC 9. Struktur histologis K2 dapat di lihat pada gambar 2.5b. Nilai persentase rata-rata lobulus hati normal dan kerusakan hepatosit untuk derajat 1; derajat 2 dan derajat 3 berturut-turut pada kelompok kontrol 2 (K2) berdasarkan pengamatan semikuantitatif yaitu 4%; 42%; 54% dan 0% (Gambar 2.6). Persentase tersebut menunjukkan kerusakan pada lobulus-lobulus hati dengan kategori kerusakan derajat 2 (kerusakan 20-40% luas lobulus) dan lobulus hati normal hanya ditemukan 4%. Secara histologis, kerusakan-kerusakan lobulus hati K2 meliputi diameter vena sentralis melebar, sel-sel endotel melisis, terjadi perlemakan dan adanya pembendungan darah (Gambar 2.4b).

Kerusakan pada vena sentralis menunjukkan bahwa hati mengalami degenerasi pada vena sentralis, dimulai pada bagian sel endotel yang sangat peka terhadap racun. Sel endotel yang melisis menyebabkan pelebaran diameter vena sentralis (Leeson *et al.* 1996). Perlemakan (steatosis) pada kelompok K2 terjadi karena paparan CCl₄ ke dalam jaringan hati yang mengakibatkan munculnya butiran-butiran lemak, yang pada sediaan histologis tidak terwarnai oleh pewarnaan Hematoksin- Eosin (HE) (Gambar 2.4b). Penumpukan lemak terjadi akibat terganggunya proses metabolisme dalam hati (Hinton dan Grasso, 1995).

Mekanisme penyebab terjadinya penumpukan lemak dalam hati yaitu terganggunya jalur pelepasan trigliserida dari organ hati ke plasma. Trigliserida yang ada dalam jaringan hati, hanya dapat disekresi bila berikatan dengan lipoprotein. Senyawa toksik seperti CCl₄ dapat menghambat konjugasi trigliserida dengan lipoprotein, sehingga trigliserida akan tertimbun dalam jaringan hati (Lu, 1995).

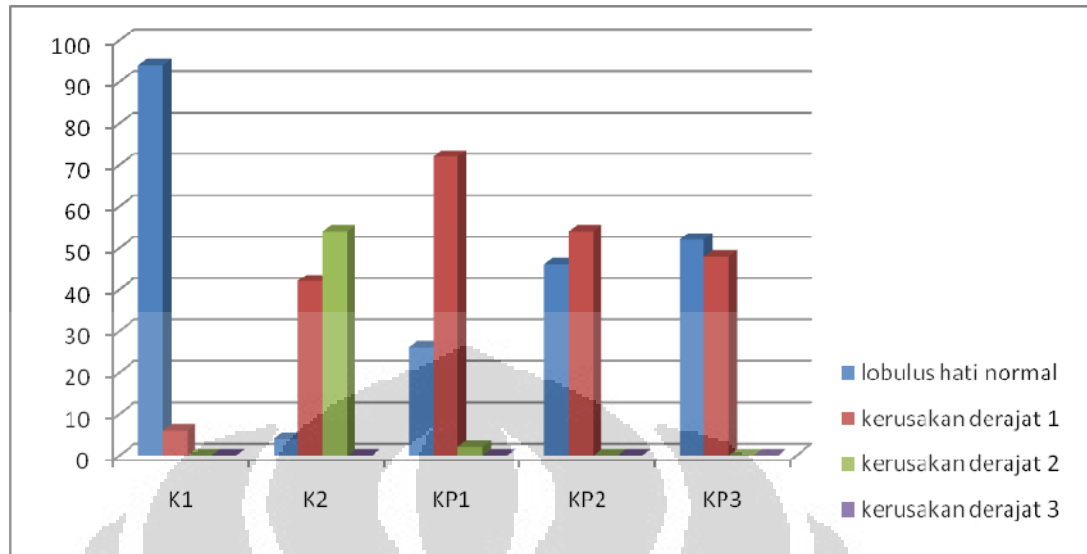
Persentase rata-rata lobulus hati normal dan kerusakan derajat 1; derajat 2 dan derajat 3 pada kelompok perlakuan dosis 0,36 mg/ hari (KP1) secara berturut-turut adalah 26 %; 72%; 2% dan 0% (Gambar 2.6 dan Lampiran 2.8). Nilai persentase tersebut menunjukkan bahwa hasil KP1 jika dibandingkan dengan K1 (positif negatif) masih jauh dari normal. Namun demikian, jika dibandingkan dengan K2 (kontrol positif), maka pemberian ekstrak dengan dosis 0,36 mg/hari sudah terjadi perbaikan, dimana lobulus-lobulus hati normal mencapai 26% pada KP1. Pemberian dosis 0,36 mg/hari mampu menurunkan nilai persentase derajat kerusakan 2 pada K2 dari 54% menjadi 2%. Jenis kerusakan yang terjadi pada lobulus hati KP1 masih tidak jauh berbeda dengan K2. Sel-sel endotel masih mengalami lisis, diameter vena sentralis masih melebar dan steatosis (Gambar 2.5c).

Persentase rata-rata untuk rata-rata lobulus hati normal dan kriteria kerusakan derajat 1; derajat 2 dan derajat 3 secara berturut-turut pada kelompok perlakuan dosis 0,72 mg/hari (KP2) sebesar 46%; 54% dan 0% (Gambar 2.6). Jika dibandingkan dengan K2, maka KP2 sudah nampak adanya perbaikan yang ditunjukkan dengan meningkatnya nilai lobulus hati normal dari 4% pada K2 menjadi 46% pada KP2. Jika dibandingkan dengan KP1, maka KP2 sedikit lebih

baik dibandingkan KP1, nilai lobulus hati normal pada KP2 meningkat (46%) jika dibandingkan dengan KP1 (26%). Hal tersebut menunjukkan bahwa jenis kerusakan semakin berkurang berdasarkan persentase derajat kerusakan. Jenis kerusakan yang masih ditemui pada KP2 diantaranya masih terdapat perlemakan (steatosis) lebih sedikit dibanding K2. Hal tersebut menunjukkan bahwa telah terjadi proses perbaikan hati pada KP2 (Gambar 2.5d).

Hasil pengamatan histologis terhadap pencekakan ekstrak *Aspergillus awamori* UICC 9 dosis 1,08 mg/hari (KP3) menunjukkan perbaikan sel-sel hati dibandingkan kedua dosis perlakuan lainnya (KP1 dan KP2). Jika mengamati perbaikan sel-sel hati pada ketiga kelompok perlakuan maka terlihat pola tertentu dari lobulus hati normal. Lobulus hati normal pada KP1; KP2 dan KP3 memperlihatkan terjadinya peningkatan presentase (Gambar 2.6).

Mekanisme perbaikan dari jaringan hati kelompok perlakuan diduga disebabkan oleh senyawa-senyawa antioksidan yang terkandung dalam ekstrak *Aspergillus awamori* UICC 9. Senyawa-senyawa flavonoid, alkaloid, glikosida dan senyawa-senyawa triterpenoid merupakan senyawa antioksidan yang terdapat dalam ekstrak *Aspergillus awamori* UICC 9 diduga merupakan senyawa yang berperan dalam perbaikan jaringan hati *Rattus norvegicus* (Fujita dan Yamagami, 2001; Nainggolan, 2005). Flavonoid yang terkandung dalam ekstrak *Aspergillus awamori* UICC 9 diduga berpengaruh dalam memperbaiki hati dari kerusakan oksidatif berupa inflamasi dan menghambat enzim-enzim oksidatif dan menangkap radikal bebas (Algameta, 2009).



Gambar 2.6 Diagram batang persentase rata-rata lobulus hati normal dan kerusakan lobulus hati (derajat kerusakan 1, 2 dan 3) tiap kelompok perlakuan

Keterangan :

K1 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, aquades

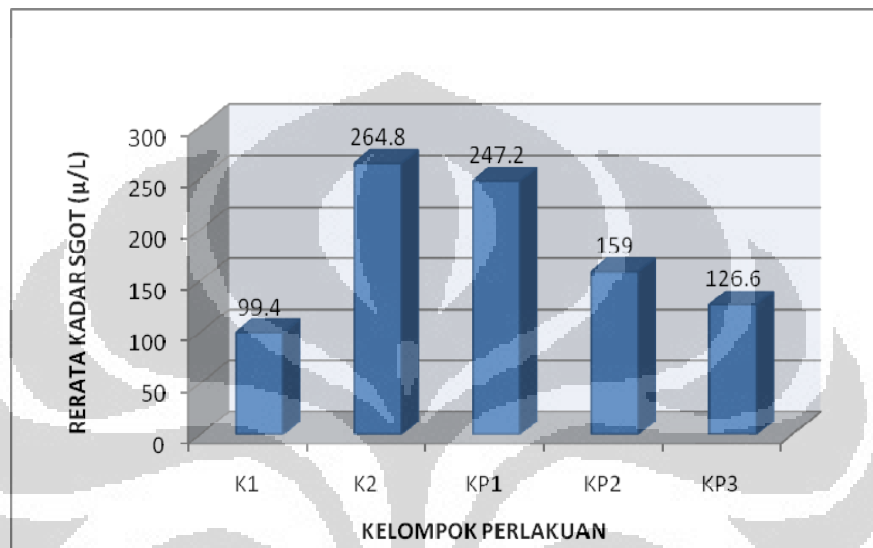
K2 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, CMC 0,5% + CCl₄

KP1 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, ekstrak *Aspergillus* dosis 0,36 mg/ hari + CCl₄

KP2 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, ekstrak *Aspergillus* dosis 0,72 mg/ hari + CCl₄

KP3 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, ekstrak *Aspergillus* dosis 1,08 mg/ hari + CCl₄

2.3. Analisis Kadar Serum Glutamat Oksaloasetat Transferase (SGOT) dan Serum Glutamat Piruvat Transferase (SGPT) dalam Darah Tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) Galur Sparague Dawley



Gambar 2.7. Diagram batang rerata kadar SGOT *Rattus norvegicus* L (µ/L)

Keterangan:

K1 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, aquades

K2 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, CMC 0,5%, + CCl₄

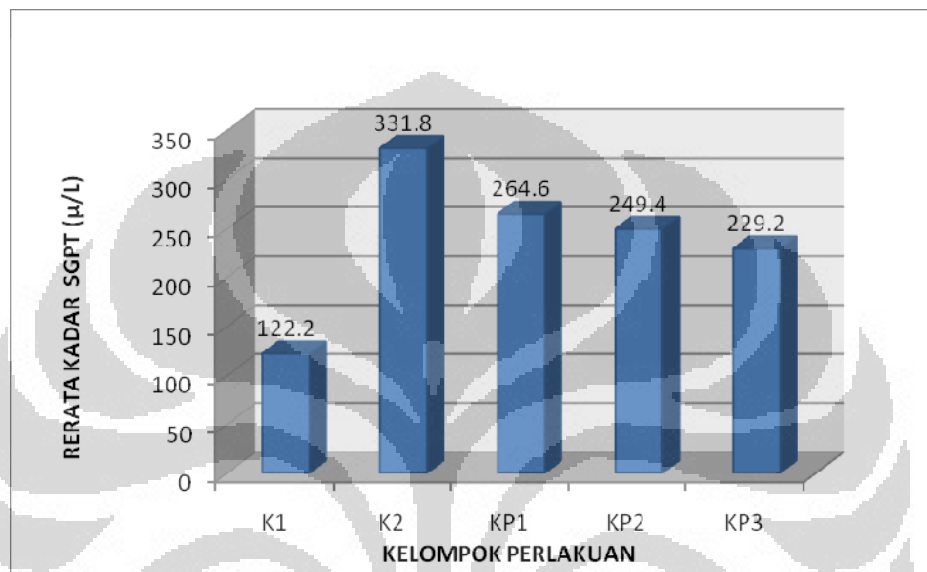
KP1 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, ekstrak *Aspergillus* dosis 0,36 mg/ hari + CCl₄

KP2 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, ekstrak *Aspergillus* dosis 0,72 mg/ hari + CCl₄

KP3 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, ekstrak *Aspergillus* dosis 1,08 mg/ hari + CCl₄

Berdasarkan Gambar 2.7 rerata kadar serum glutamate oksaloasetat transferase (SGOT) pada K1, K2, KP1, KP2 dan KP3 berturut-turut yaitu 99,4; 264,8; 247,2; 159; 126,6 (µ/L). Kelompok kontrol positif (K2) menghasilkan kadar SGOT yang lebih tinggi dibanding kelompok K1, KP1, KP2 dan KP3. Berdasarkan hasil analisis varians (Anova), kadar SGOT antar perlakuan berpengaruh nyata ($P < 0,05$). Pada uji lanjut Duncan multiple range test (DMRT) menunjukkan bahwa antar kelompok K1, KP2 dan KP3 tidak ada perbedaan yang bermakna ($P > 0,05$); kelompok perlakuan dosis 0,36 mg/hari (KP1) dan kelompok

kontrol positif (K2) menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna ($P>0,05$); kelompok kontrol negatif (K1), kelompok perlakuan dosis 0,72 mg/hari (KP2) dan dosis 1,08 mg/hari (KP3) berbeda secara bermakna dengan kelompok perlakuan dosis 0,36 mg/hari (KP1) dan K2 ($P<0,05$) (Lampiran 2.12).



Gambar 2.8. Diagram batang rerata kadar SGPT *Rattus norvegicus* L

Keterangan:

K1 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, aquades

K2 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, CMC 0,5%, + CCl₄

KP1 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, ekstrak *Aspergillus* dosis 0,36 mg/ hari + CCl₄

KP2 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, ekstrak *Aspergillus* dosis 0,72 mg/ hari + CCl₄

KP3 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, ekstrak *Aspergillus* dosis 1,08 mg/ hari + CCl₄

Berdasarkan Gambar 2.8 rerata kadar serum glutamate piruvat transferase pada kelompok K1; K2; KP1; KP2 dan KP3 secara berturut-turut yaitu 122,2; 331,8; 264,6; 249,4 dan 229,2 (µ/L). Kelompok K2 memiliki kadar SGPT yang tinggi dibanding kelompok perlakuan lainnya seperti K1; KP1; KP2; KP3. Hasil analisis varians (Anova) menunjukkan bahwa antar perlakuan terdapat perbedaan yang nyata ($P<0,05$). Pada uji lanjut Duncan Multiple Range Test (DMRT) menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif (K1) berbeda secara

bermakna dengan kelompok kontrol positif (K2); kelompok perlakuan dosis 0,36 mg/hari (KP1); dosis 0,72 mg/hari (KP2) dan dosis 1,08 mg/hari (KP3). Kelompok perlakuan dosis 0,36 mg/hari (KP1) dan dosis 0,72 mg/hari (KP2) tidak ada perbedaan yang bermakna dibanding dengan kelompok kontrol positif (K2) ($P>0,05$). Kadar SGPT antar kelompok perlakuan KP1; KP2 dan KP3 tidak ada perbedaan yang bermakna ($P>0,05$). Kelompok perlakuan dosis 1,08 mg/hari (KP3) berbeda secara bermakna dibanding kelompok kontrol positif (K2) ($P<0,05$) (Lampiran 2.13).

Kerusakan pada membran hepatosit dan membran organel hepatosit serta kematian sel, dapat menyebabkan terlepasnya enzim yang terikat ke membran hepatosit dan membran organel hepatosit serta enzim dalam sitoplasma ke dalam sirkulasi sistemik, seperti SGOT dan SGPT). Pengujian kadar enzim SGOT dan SGPT sebagai indikasi kerusakan hati sampai saat ini dianggap masih paling praktis. Enzim SGOT terdapat di sitoplasma (20%) dan mitokondria (80%), sedangkan SGPT hanya terdapat di sitoplasma. Enzim SGPT paling tinggi konsentrasinya dalam sel-sel hati (hepatosit) (Gianini *et al.* 2005).

Pada penelitian ini, dapat dibuktikan bahwa pemberian CCl_4 1 ml/kg bb per oral menyebabkan kerusakan jaringan pada hati hewan coba. Secara biokimia kerusakan ini ditandai dengan peningkatan kadar enzim SGOT. Karbon tetraklorida (CCl_4) menyebabkan kerusakan pada sel melalui reaksi antara metabolitnya yang bersifat radikal bebas dengan struktur-struktur seluler jaringan hati. Dalam hepatosit, oleh enzim sitokrom P450 (CYP 450), CCl_4 akan dimetabolisme dan menghasilkan 2 metabolit yang bersifat lebih toksik dan lebih reaktif dibandingkan senyawa asalnya, yaitu radikal bebas triklorometil (CCl_3^*) dan triklorometil peroksil $\text{CCl}_3)_2^*\text{CCl}_3^*$. Radikal bebas tersebut dapat berikatan kovalen dengan protein, lemak, DNA yang pada akhirnya dapat memicu kerusakan hepatosit. CCl_3O_2^* dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi lemak yang menimbulkan disfungsi membrane sel dan membran organel sel serta membentuk senyawa reaktif aldehid yang juga dapat menyebabkan kerusakan hepatosit (Dienstag dan Isselbacher, 1995; Bruckner *et al.* 2002).

Kerusakan hepatosit yang diinduksi oleh radikal bebas seperti metabolit CCl_4 dapat dicegah atau dikurangi oleh senyawa yang bersifat antioksidan. Pada

penelitian ini diperoleh hasil, pada kelompok perlakuan dosis 1,08 mg/hari (KP3) memperlihatkan efek hepatoprotektor paling tinggi yakni memperbaiki sel hati yang rusak. Hal ini dapat di lihat dari kadar SGOT dan SGPT pada kelompok perlakuan dosis 1,08 mg/hari (KP3) yang lebih rendah dibanding kelompok kontrol positif (K2) dan lebih tinggi dibanding kelompok kontrol negatif (K1). Tingginya kadar SGOT dan SGPT yang diperoleh pada penelitian ini, kemungkinan besar disebabkan oleh toksisitas CCl_4 yang meningkat akibat puasa yang lebih panjang (17 jam). Bruckner *et al.* 2002, mengemukakan bahwa puasa 16 -48 jam dapat meningkatkan metabolisme dan hepatotoksitas CCl_4 , puasa juga menyebabkan penurunan kadar glutathione yang berperan penting untuk menangkal radikal bebas (*CCl_3) yang dihasilkan oleh CCl_4 .

Pemberian ekstrak kapang *Aspergillus awamori* UICC 9 mampu mencegah peningkatan kadar enzim SGOT dan SGPT plasma darah tikus putih *Rattus norvegicus* L. Berdasarkan hasil analisis fitokimia ekstrak etil asetat *Aspergillus awamori* UICC 9 mengandung senyawa yang bersifat antioksidan yaitu flavonoid, glikosida, alkaloid dan triterpenoid polifenol. Flavonoid telah diketahui memiliki aktifitas antioksidan, antiinflamasi, hepatoprotektif, antitrombosis, antiviral dan antikarsinogen (Choudary *et al.* 2004; Algameta, 2009).

3. KESIMPULAN DAN SARAN

3.1. KESIMPULAN

1. Pemberian ekstrak *Aspergillus* spp. pada dosis yang berbeda berpengaruh pada perubahan morfologis (makroskopis), hal ini terlihat pada dosis K2 (pemberian CMC 0,5%) memiliki diameter vena sentralis yang paling besar dibanding dosis K1 (aquades), KP1 (ekstrak dosis 0,36 mg/hari), KP2 (dosis 0,72 mg/ hari) dan KP3 (dosis 1,08 mg/ hari).
2. Pengamatan secara mikroskopis pada kelompok KP3 (dosis 1,08 mg/ hari) jaringan hati mengalami perbaikan, hal ini dapat dilihat pada sel-sel hati (hepatosit) yang beregenerasi dibanding KP1 (0,36 mg/hari) dan KP2 (0,72 mg/hari) sedangkan pada kelompok K2 (CMC 0,05%) mengalami kerusakan hepatosit.
3. Secara analisis kadar SGOT dan SGPT pada kelompok KP3 (dosis 1,08 mg/hari) memiliki kadar yang lebih rendah dibanding KP1 (dosis 0,36 mg/hari) dan KP2 (dosis 0,72 mg/hari) walaupun belum mendekati kadar SGOT dan SGPT K1 (kontrol negatif).
4. Kerusakan hepatosit yang diinduksi oleh radikal bebas CCl₄ dapat dicegah dengan pemberian senyawa yang bersifat antioksidan dari ekstrak *Aspergillus awamori* UICC 9. Hal ini terlihat pada kelompok KP1; KP2 dan KP3 yang memiliki nilai kerusakan hepatosit yang lebih kecil dibanding K2 (CMC 0,05%)..

4.2. SARAN :

1. Perlu dilakukan uji toksisitas dari ekstrak *Aspergillus* spp.
2. Perlu dilakukan peningkatan dosis ekstrak *Aspergillus* spp. untuk melihat dosis yang optimum dalam perbaikan jaringan hati tikus putih (*Rattus norvegicus* L.).

DAFTAR ACUAN

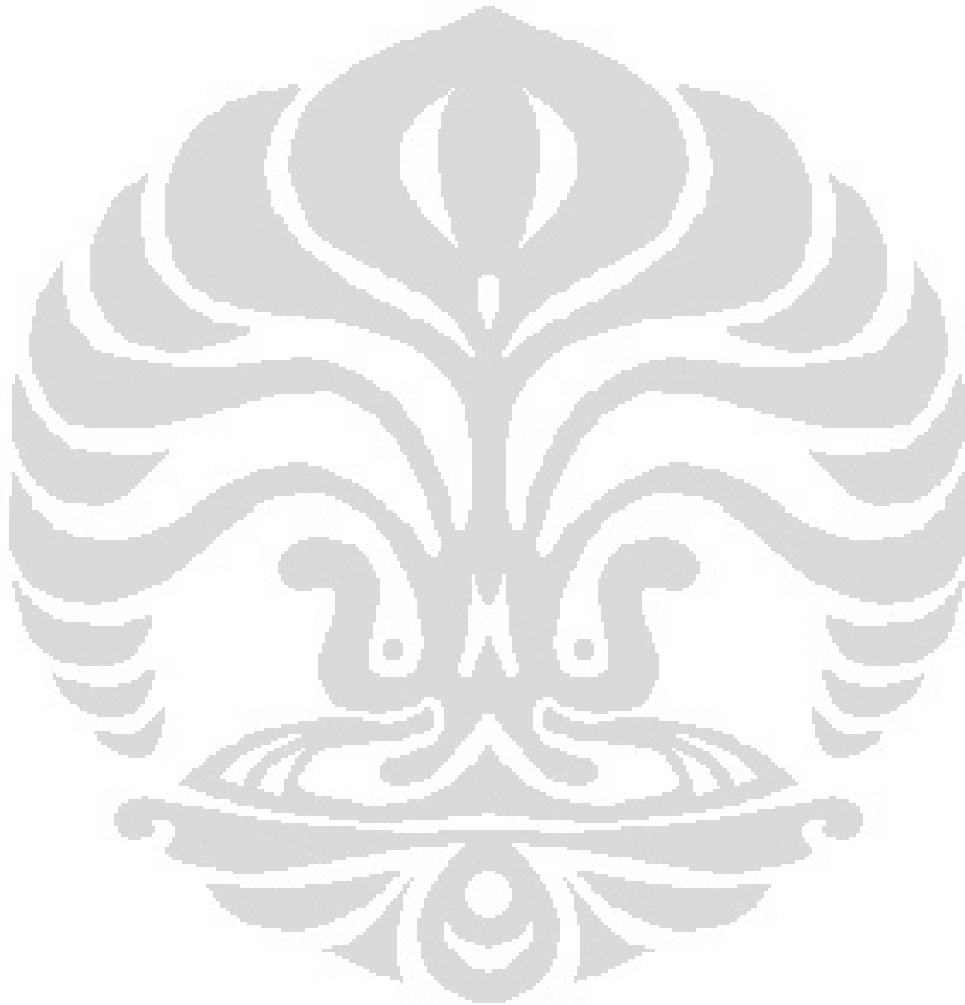
- Afifah. 2006. Uji potensi antihepatotoksik ekstrak rimpang *Curcuma zedoaria* (Berg.) Rosc. (Temu putih) terhadap organ hati *Rattus norvegicus* L. (Tikus putih) galur Sprague-Dawley. Skripsi Sarjana S1 Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok. 99 hlm.
- Anonim. 1986. IFCC Methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. *J. Clin. Biochem.* 24: 481.
- Bruckner, J.V., Ramanathan, K. M. Lee & S. Muralidhara . 2002. Mechanism of circadian rhythmicity of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Issue.* 300(): 273 – 281.
- Choudary, M.I, G.S. Musharraf, T. Mukhmoor, F. Shaheen, S. Ali, & A. Rahman. 2004. Isolation of Bioactive Compounds from *Aspergillus terreus*. *Z. Naturforsch.* 59b. 324-328.
- Dienstagg, J.L & K.J. Isselbacher. 1995. Hepatitis akut. Terj. dari Isselbacher, K.J, B. Eugene, J.D. Wilson, J.B. Martin, K.S. Fauci, D.L. Kasper. Terj. dari Harrison dalam *Prinsip-prinsip ilmu penyakit dalam*. Ed 13(4), EGC, Jakarta : 1638 -1658.
- Fujita, H., & T. Yamagami. 2001. Fermented soybean-derived watersoluble Touchi-extract inhibits α - glucosidase inhibitors action in a longterm administration studi with KKA' mice. *Life Sci.* 70 : 219 – 227.
- Gianini, E.D., R. Testa., V. Savarino. 2005. Liver Enzim alteratsion: a guide for clinicians. *CMAJ.* Vol **172**(3):367-379.
- Graves, P. & J.M. Faccini. 1984. Digestive system. In : *Rat histopathology Aglossary for use in toxicity and carsinogenicity studies*. Elsevier, Amsterdam. 86-92.
- Gupta, M., U.K. Mazumder., T.S. Kumar., P. Gomathi., & R.S. Kumar 2004. Antioxidant and hepatoprotective effect of *Bauchinia racemosa* against paracetamol and carbon tetrachloride induced liver damage in rats. *Iran. J. Pharmacol & Ther.* 3: 12-20.
- Halliwell, B., & J.M.C. Guttenridge. 1999. Free radicals, 'reactive species' and

- toxicology. In: *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed., Chapter 8: 554 – 552. *Oxford University Press*.
- Hamdayani, R & J. Sulisty. 2008. Sintesis senyawa Flavonoid- α -Glikosida secara reaksi transglukosida enzimatis dan aktivitasnya sebagai antioksidan. *Biodiversitas*. **9**(1):1-4.
- Hanafiah, A.K. 1997. Rancangan percobaan: teori dan aplikasi. Ed. Ke-2. PT Raja Grafindo Persada, Jakarta: xii + 238 hlm.
- Hinton, R.H & P. Grasso. 1993. Hepatotoxicity. Dalam: Balantyne, B., T. Marrs & P. Turner (eds.). 1993. *General & applied toxicology*. The Macmillan Press Ltd., London: 555-598.
- Ilyas, E. 1991. Uji potensi antihepatotoksik ekstrak temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) terhadap kadar GOT dan GPT tikus jantan (*Rattus norvegicus* Linn.) yang diinduksi dengan karbon tetraklorida. Skripsi Sarjana S1 Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok: vii + 74 hlm.
- Leeson, C.R., T.S. Leeson & A.A. Paparo. 1996. Buku ajar histology. Ed. Ke-5. Terj. dari *Textbook of histology*, oleh Siswojo, S. K., J. Tambong, S. Wonodirekso., I.A. Suryono., R. Tanzil., R. Soeharto., S. Roewijoko., I. Goeritno & M. Martoprawiro. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta: xi + 622 hlm.
- Lehninger, A. L. 1982. Dasar-dasar Biokimia. Terj. dari *Principles of* . Oleh Thenawijaya, M. Penerbit Erlangga, Jakarta: xv + 369 hlm.
- Lu, F.C. 1995. Toksikologi dasar. Azas, organ sasaran, dan penilaian resiko. Terj. dari *Basic toxicology: Fundamentals, target organs, and risk assessment*, oleh Nugroho, E., Z.S. Bustami & I. Darmawansyah. UI-Press, Jakarta: xv + 429 hlm.
- Nainggolan, D. 2005. Aktivitas antioksidan residu ekstrak *Aspergillus terreus* pada kerusakan hati tikus putih yang diinduksi dengan CCl₄. Tesis Pasca Sarjana. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. Vii + 67 hlm.
- Ngatidjan. 1991. Petunjuk laboratorium: Metode laboratorium dalam toksikologi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi UGM, Yogyakarta: x + 283 hlm.

- Pelczar, M. J. & E.C.S. Chan. 1981. Elements of microbiology. McGraw Hill International Book, Co., London: vi + 698 hlm.
- Price, S.A & L.M. Wilson. 1995. Patofisiologi konsep klinis. Edisi 4. Alih bahasa Peter Anugerah, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Rajesh, M.G., & M.S. Latha. 2004. Protective activity of *Glycyrrhiza linn*. On carbon tetrachloride-induced peroxidative damage. *Ind. J. Pharmacol.* 36: 284 – 287.
- Ressang, A.A. 1984. *Patologi khusus veteriner*. Ed. Ke-2. Fakultas Kedokteran Hewan IPB, Bogor: xix + 666 hlm.
- Rusmiati. 2004. Struktur histologist organ hepar dan ren mencit (*Mus musculus* L) jantan setelah perlakuan dengan ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L). *Bioscientiae*. 1(1): 23-30.
- Shahjahan, M., K.E., Sabitha., M.Jainu., & C.S.S. Devi. 2004. Effect of *Solanum trilobatum* against carbon tetrachloride induced hepatic damage in albino rats. *Ind. J. Pharmacol.* 36: 194 – 198.
- Shenoy, A.K., N.S. Somayaji & L.K. Bairy. 2001. Hepatoprotective effects of *Ginkgo biloba* against carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. *Ind. J. Pharmacol.* 33: 260 -266.
- Sherwood, L. 1996. Fisiologi manusia: Dari sel ke sistem. Ed. Ke-2. Terj. dari *Human physiology: From cells to systems*, oleh Pendit, B.U. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta: xvi + 739 hlm.
- Steel, R.G.D. & J.H. Torrie. 1989. Prinsip dan prosedur statistika : Suatu pendekatan biometrik. Terj. Dari. *Principles and procedures of statistics: A biometrical approach*. Ed. Ke-2., oleh Sumantri. Penerbit Gramedia, Jakarta: xxiii + 748 hlm.
- Suntoro, S.H. 1983. Metode pewarnaan. Bharatara Karya Aksara, Jakarta: vii + 395 hlm.
- Ulfa, M. 2008. Efek hepatoprotektif ekstrak etil asetat daun Sambung Nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) DC.) terhadap mencit jantan galur Swiss terinduksi Parasetamol. Skripsi Sarjana S1 Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Wang, Yu, K. Xu., L. Lin., Y. Pan., X. Zheng. 2007. Geranyl flavonoids from

the leaves of *Artocarpus altilis*. *Phytochemistry*. **68**(9): 1300-1306.

Weber, L.W.D., B.M. Boll & A. Stampfl. 2003. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical Reviews in Toxicology*. **33**(2):107.



Lampiran 2.1. Komposisi nutrisi dalam pakan hewan uji *Rattus norvegicus* L.

No	Bahan dasar Pakan Tikus Putih
1	Bungkil kedelai
2	Bungkil kelapa
3	Dedak
4	Jagung
5	Menir
6	Minyak nabati
7	Tapioka
8	Tepung Ikan
9	Tepung rumput

No	Komposisi Pakan Tikus	% (100 g)
1	Protein	20-22
2	Lemak	2— 4
3	Serat	4
4	Abu	7— 9

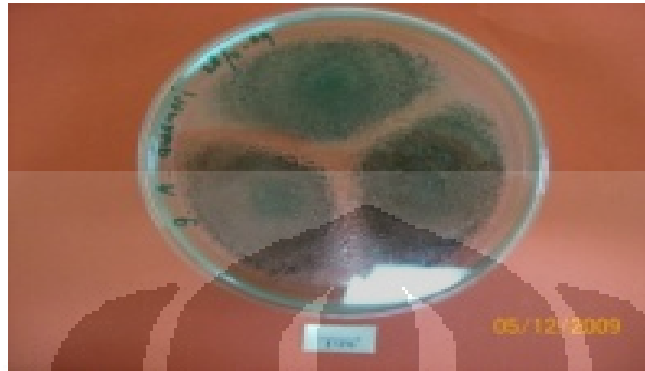
(Sumber: C.V. Kasman, 2007)

Lampiran 2.2. Gambar pemberian ekstrak antioksidan secara oral menggunakan sonde



Sumber: (Dokumen pribadi)

Lampiran 2.3. Hasil pengamatan makroskopis dan mikroskopis *Aspergillus awamori* UICC9



Sumber: (Dokumen pribadi)

Lampiran 2.4. Pengambilan darah pada tikus melalui sinus orbitalis



Sumber: (Dokumen pribadi)

Lampiran 2.5. Komposisi larutan yang digunakan dalam pembuatan sediaan histologik

No	Nama Larutan	Komposisi zat	jumlah zat
1	Larutan NaCl 0,9%	NaCl	9 g
		Akuades	1000 ml
2	Larutan Bouin*	Asam pikrat jenuh75 ml	
		Formalin 40%	20 ml
		Asam asetat glacial	5 ml
3	Albumin Mayer	Putih telur	10 ml
		Gliserin	10 ml
4	Larutan Hematoksilin	Kristal Hematoksilin**	5 g
		Amonium/Potassium alum***	100 g
		Alkohol 70%	60 ml
		Akuades	1000 ml
5	Larutan Eosin Y	Eosin Y	1 g
		Akuades	100 ml

Keterangan

- * Larutan Bouin dicampur pada saat akan digunakan
 ** Kristal Hematoksilin dilarutkan dalam alcohol
 *** Potasium alum di larutkan dalam akuades

Lampiran 2.6. Berat hati *Rattus norvegicus* L. (gram)

No.	Perlakuan	Berat hati (g)						Rerata
		1	2	3	4	5	6	
1.	K1	11,9	10,9	10,3	11,8	9,3	13,1	11,2
2.	K2	12,6	11,9	11,5	13,0	14,7	12,6	12,7
3.	KP1	5,3	13,4	11,6	10,7	10,8	12,9	10,8
4.	KP2	9,5	9,7	10,3	12,8	10	13,2	10,9
5.	KP3	9	9,3	13,1	11,8	12,8	10,7	11,1

Lampiran 2.7. Rerata diameter vena sentralis hati *Rattus norvegicus* L. (μm)

Ulangan	K1	K2	KP1	KP2	KP3
1	55,38	71,30	76,46	64,35	62,11
2	49,10	67,49	63,23	69,28	59,86
3	74,89	65,02	78,03	65,92	62,78
4	53,81	79,60	57,17	68,83	52,91
5	50,90	80,72	70,85	65,92	70,40
X	56,81	72,82	69,15	66,86	61,61
SD	10,40	7,07	8,85	2,11	6,28

Keterangan:

- K1 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, aquades
 K2 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, CMC 0,5%,
 KP1 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, ekstrak *Aspergillus* dosis 0,36 mg/ 200 g bb / hari
 KP2 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, ekstrak *Aspergillus* dosis 0,72 mg/ 200 g bb / hari
 KP3 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, ekstrak *Aspergillus* dosis 1,08 mg/ 200 g bb / hari
 Σ : Jumlah
 X : Rerata

Lampiran 2.8 Data persentase rata-rata lobulus hati normal dan derajat kerusakan lobulus hati tiap kelompok perlakuan (%)

Persentase lobulus hati normal dan derajat kerusakan lobulus hati (%)																				
U	K1				K2				KP1				KP2				KP3			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
1	90	10	0	0	0	40	60	0	40	60	0	0	40	60	0	0	50	50	0	0
2	100	0	0	0	10	50	40	0	30	70	0	0	50	50	0	0	50	50	0	0
3	90	10	0	0	0	40	60	0	20	80	0	0	50	50	0	0	50	50	0	0
4	90	10	0	0	0	40	60	0	20	80	0	0	50	50	0	0	60	40	0	0
5	100	0	0	0	10	40	50	0	20	70	10	0	40	60	0	0	50	50	0	0
Σ	470	30	0	0	20	210	270	0	130	360	10	0	230	270	0	0	260	240	0	0
x	94	6	0	0	4	42	54	0	26	72	2	0	46	54	0	0	52	48	0	0

Keterangan:

K1 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, aquades

K2 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, CMC 0,5%,

KP1 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, ekstrak *Aspergillus* dosis 0,36 mg/ 200 g bb/ hari

KP2 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, ekstrak *Aspergillus* dosis 0,72 mg/ 200 g bb/ hari

KP3 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, ekstrak *Aspergillus* dosis 1,08 mg/ 200 g bb/ hari

0 : Derajat kerusakan 0 (tidak ada kerusakan)

1 : Derajat kerusakan 1 (kerusakan ringan, < 20% luas lobulus)

2 : Derajat kerusakan 2 (kerusakan sedang, 20--40% luas lobulus)

3 : Derajat kerusakan 3 (kerusakan berat, > 40% luas lobulus)

Lampiran 2.9. Kadar SGOT darah *Rattus norvegicus* L.(μ /L)

Ulangan	K1	K2	KP1	KP2	KP3
1	113	130	192	137	100
2	120	328	131	96	109
3	87	184	289	204	106
4	86	355	311	172	148
5	91	327	313	186	170
Σ	497	1324	1236	795	633
X	99,4	264,8	247,2	159	126,6
SD	15,92	100,87	81,70	42,94	30,75

Keterangan:

- K1 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, aquades
 K2 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, CMC 0,5%,
 KP1 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, ekstrak *Aspergillus* dosis 0,36 mg/ 200 g bb/ hari
 KP2 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, ekstrak *Aspergillus* dosis 0,72 mg/ 200 g bb/ hari
 KP3 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, ekstrak *Aspergillus* dosis 1,08 mg/ 200 g bb/ hari

Lampiran 2.10. Kadar SGPT darah *Rattus norvegicus* L.(μ /L)

Ulangan	K1	K2	KP1	KP2	KP3
1	99	311	117	269	274
2	175	309	265	259	211
3	31	395	336	142	231
4	245	309	288	270	229
5	61	335	317	307	201
Σ	611	1659	1323	1247	1146
X	122,2	331,8	264,6	249,4	229,2
SD	87,27657	37,0027	86,85793	62,75588	28,00357

Keterangan:

- K1 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, aquades
 K2 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, CMC 0,5%,
 KP1 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, ekstrak *Aspergillus* dosis 0,36 mg/ 200 g bb/ hari
 KP2 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, ekstrak *Aspergillus* dosis 0,72 mg/ 200 g bb/ hari
 KP3 : Kelompok *Rattus norvegicus* L, ekstrak *Aspergillus* dosis 1,08 mg/ 200 g bb/ hari

Lampiran 2.11. Anova diameter vena sentralis hati *Rattus norvegicus* dengan SPSS 17.0

Tests of Normality

	KELO MPO K_PE RLAK UAN	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
DIAMETER_VE	K1	.355	5	.038	.768	5	.043
NA	K2	.231	5	.200*	.892	5	.369
	KP1	.195	5	.200*	.927	5	.579
	KP2	.272	5	.200*	.889	5	.353
	KP3	.226	5	.200*	.964	5	.838

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
DIAMETER_VE	Based on Mean	1.618	4	20	.209
NA	Based on Median	.807	4	20	.535
	Based on Median and with adjusted df	.807	4	10.820	.546
	Based on trimmed mean	1.389	4	20	.274

ANOVA

DIAMETER_VENA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	796.724	4	199.181	3.552	.024
Within Groups	1121.428	20	56.071		
Total	1918.152	24			

$P < 0,05$, maka faktor perlakuan yang diberikan berpengaruh secara nyata

Uji Duncan Diameter vena sentralis

KELOMPOK_PERLAKUAN	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
K1	5	56.8160		
KP3	5	61.6120	61.6120	
KP2	5	66.8600	66.8600	66.8600
KP1	5		69.1480	69.1480
K2	5			72.8260
Sig.		.057	.147	.247
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.				

Lampiran 2.12. Anova kadar SGOT darah *Rattus norvegicus* dengan SPSS 17.0

Tests of Normality

perlak uan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
kadarsgot K1	.301	5	.157	.823	5	.123
K2	.331	5	.077	.835	5	.150
KP1	.296	5	.177	.839	5	.163
KP2	.219	5	.200*	.948	5	.721
KP3	.316	5	.114	.849	5	.190

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
kadarsgot	Based on Mean	10.562	4	20	.000
	Based on Median	1.195	4	20	.344
	Based on Median and with adjusted df	1.195	4	9.275	.375
	Based on trimmed mean	9.346	4	20	.000

ANOVA

SGOT

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	107470.000	4	26867.500	6.753	.001
Within Groups	79568.000	20	3978.400		
Total	187038.000	24			

$P < 0,05$, maka faktor perlakuan yang diberikan berpengaruh secara nyata

Uji Duncan^a

Kadarsgot

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
K1	5	99.4000	
KP3	5	126.6000	
KP2	5	159.0000	
KP1	5		247.2000
K2	5		264.8000
Sig.		.172	.664

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Lampiran 2.13. Anova kadar SGPT darah *Rattus norvegicus* L. dengan SPSS 17.0

Tests of Normality

Kelompok perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	Df	Sig.	
Kadar sgpt	K1	.205	5	.200*	.946	5	.706
	K2	.313	5	.123	.735	5	.021
	KP1	.302	5	.154	.828	5	.135
	KP2	.361	5	.032	.801	5	.082
	KP3	.274	5	.200*	.907	5	.451

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Test of Homogeneity of Variance

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.	
Kadarsgpt	Based on Mean	1.638	4	20	.204
	Based on Median	.859	4	20	.505
	Based on Median and with adjusted df	.859	4	14.610	.511
	Based on trimmed mean	1.510	4	20	.237

ANOVA

Kadarsgpt

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	115563.360	4	28890.840	6.797	.001
Within Groups	85012.800	20	4250.640		
Total	200576.160	24			

$P < 0,05$, maka faktor perlakuan yang diberikan berpengaruh secara nyata

Kadarsgpt

Uji Duncan^a

Kelompok perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
K1	5	122.2000		
KP3	5		229.2000	
KP2	5		249.4000	249.4000
KP1	5		264.6000	264.6000
K2	5			331.8000
Sig.		1.000	.427	.072

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

DISKUSI PARIPURNA

Sekarang ini pengembangan senyawa antioksidan alamiah telah digiatkan untuk menggantikan senyawa antioksidan yang sintetik yang telah meluas penggunaannya. Beberapa antioksidan alamiah yang berasal dari mikroorganisme telah banyak diisolasi. Indonesia sebagai Negara mega biodiversitas dengan kekayaan alam yang melimpah dan beraneka ragam hanya sebagian kecil yang di eksplorasi dan dimanfaatkan. *University of Indonesia Culture Collection* (UICC) memiliki banyak koleksi biakan mikroorganisme, yang belum banyak dimanfaatkan untuk kepentingan manusia dalam bidang pangan, industri, pertanian dan kesehatan. Salah satu koleksi biakan UICC yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelompok kapang *Aspergillus* spp.

Penelitian senyawa metabolit sekunder antioksidan yang dihasilkan oleh *Aspergillus* spp. telah banyak dilakukan. Antioksidan berfungsi dalam menangkap radikal bebas sehingga mampu menghambat autooksidasi yang memicu timbulnya penyakit degeneratif (Andayani *et al.* 2008; Algameta, 2009). Pengujian antioksidan secara fitokimia dalam ekstrak etil asetat pada 12 biakan *Aspergillus* spp. menghasilkan senyawa alkaloid, triterpenoid, flavonoid dan glikosida, yang merupakan senyawa-senyawa antioksidan. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan pereaksi kimia dan perubahan warna yang timbul menunjukkan adanya senyawa alkaloid, triterpenoid, flavonoid dan glikosida (Harborne, 1987).

Kandungan senyawa alkaloid yang menunjukkan positif kuat sekali (+++) terdapat pada biakan *A. niger*; *A. phoenicus* UICC 13; *A. niger* UICC 75; *A. awamori* UICC 9; *A. awamori* UICC 30; *A. ficuum* UICC 5; *A. ficuum* UICC 46 dan *A. niger* UICC 77. Kandungan senyawa alkaloid yang menunjukkan positif kuat (++) terdapat pada biakan *A. tubingensis* UICC 27; *A. niger* UICC 371; *A. awamori* UICC 31; *A. ficuum* UICC 41. Kandungan senyawa triterpenoid yang menunjukkan positif kuat sekali (+++) terdapat pada *A. niger* UICC 371. Kandungan senyawa triterpenoid yang menunjukkan positif kuat hanya terdapat pada *A. awamori* UICC 9. Kandungan triterpenoid yang menunjukkan positif lemah (+) terdapat pada *A. niger*; *A. tubingensis* UICC 27;

A. phoenicus UICC 13; *A. niger* UICC 75; *A. awamori* UICC 30; *A. awamori* UICC 31; *A. ficuum* UICC 5; *A. ficuum* UICC 46; *A. ficuum* UICC 41; dan *A. niger* UICC 77. Kandungan senyawa flavonoid pada biakan ke 12 *Aspergillus* spp. menunjukkan positif lemah (+). Kandungan glikosida yang menunjukkan positif kuat sekali (+++) terdapat pada *A. phoenicus* UICC 13. Kandungan glikosida yang positif kuat (++) terdapat pada *A. niger*; *A. tubingensis* UICC 27; *A. niger* UICC 75; *A. niger* UICC 371; *A. awamori* UICC 9; *A. awamori* UICC 31; *A. ficuum* UICC 5; *A. ficuum* UICC 46; *A. ficuum* UICC 41 dan *A. niger* UICC 77.

Hasil pengamatan senyawa-senyawa antioksidan yang dihasilkan dari fermentasi *Aspergillus* spp. dalam penelitian ini didukung oleh penelitian Qian *et al.* (2007), *Aspergillus ochraceus* menghasilkan senyawa alkaloid Stephacidin A dan Stephacidin B yang berpotensi sebagai penghambat sel-sel tumor. Tsukamoto *et al.* (2008) mendeteksi senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan *Aspergillus* spp. merupakan notoamide E yang merupakan prekursor indole alkaloid. Ge *et al.* (2009) mengisolasi senyawa bioaktif alkaloid 9-deacetylfumigaclavine dari hasil fermentasi *Aspergillus fumigates*. Patnaik *et al.* (2007) mengisolasi senyawa triterpenoid dari tanaman *Terminalia arjuna*, senyawa tersebut berpotensi sebagai antimikroba, proteksi jantung dan antioksidan. Jensen *et al.* (1998) juga mengisolasi senyawa flavon glikosida sebagai luteolin yang dihasilkan tanaman *Thallasia testudinum*, dan berperan sebagai antimikroba

Fermentasi *Aspergillus* spp penghasil antioksidan menggunakan medium Malt Yeast Pepton Glucose (MYPG). Hasil fermentasi produksi antioksidan diekstraksi menggunakan etil-asetat, menghasilkan ekstrak antioksidan. Kadar rendemen dari 12 sampel *Aspergillus* spp. berbeda-beda. Kadar rendemen yang tertinggi hingga yang terendah adalah dihasilkan oleh *A. niger* UICC 371 (3,8%); *A. awamori* UICC 9 (3,08%); *A. tubingensis* UICC 27 (2,80%); *A. niger* (2,65%); *A. ficuum* UICC 46 (2,01%); *A. ficuum* UICC 41 (1,99%); *A. ficuum* UICC 5 (1,78%); *A. awamori* UICC 30 (1,77%); *A. niger* UICC 75 (1,77%); *A. niger* UICC 77 (1,57%); *A. phoenicus* UICC 13 (1,50%) dan *A. awamori* UICC 31 (1,39%). Besarnya rendemen ekstraksi dengan pelarut etil asetat mungkin disebabkan oleh sifat etil asetat yang semipolar sehingga dapat

mengekstrak glikon (polar/terikat gula) dan komponen aglikon yang non polar (non polar/bebas gula) yang memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan komponen glikon (Tensiska *et al.* 2007).

Konsentrasi BHT (%) tertinggi hingga terendah secara berurutan adalah *A. niger* sebesar 1,92; *A. awamori* UICC 9 (1,77); *A. phoenicus* UICC 13 (1,69); *A. niger* UICC 77 (1,49); *A. niger* UICC 371 (1,11); *A. niger* UICC 75 (1,0); *A. awamori* UICC 30 (0,77); *A. ficuum* UICC 46 (0,69); *A. awamori* UICC 31 (0,57); *A. tubingensis* UICC 27 (0,54); *A. ficuum* UICC 5 (0,4) dan yang terendah *A. niger* UICC 77 sebesar 0,19.

Persentase BHT yang dimaksudkan dalam penelitian ini merupakan kadar antioksidan (%) yang dihasilkan dari fermentasi *Aspergillus* spp. Pelarut etil asetat yang digunakan dalam mengekstraksi antioksidan bersifat semi polar sehingga hasil ekstraksi mungkin mengandung lebih banyak komponen antioksidan baik non polar (aglikon) maupun polar (glikon) pada biakan kapang *Aspergillus* spp. hal ini terlihat pada % BHT ekstrak tertinggi adalah *Aspergillus niger* sebesar 1,92%, sedangkan pada % BHT bahan tertinggi pada *Aspergillus awamori* UICC 9 sebesar 0,05%.

Analisis kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan menggunakan lempeng silica gel F₂₅₄. Analisis KLT merupakan suatu analisis secara kualitatif yang digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya senyawa antioksidan pada dua belas sampel *Aspergillus* spp. koleksi UICC, dengan melihat kesamaan nilai R_f yaitu jarak relatif yang ditempuh oleh komponen dengan eluen standart dan sampel (Boyer, 1986). Nilai R_f sampel berkisar 0,15 – 0,22 sedangkan R_f standar antioksidan adalah 0,16. Sampel yang memiliki nilai R_f tertinggi (0,22) adalah *Aspergillus niger* UICC 77 dan *Aspergillus niger* UICC 371. Sampel yang memiliki nilai R_f terendah (0,15) adalah *Aspergillus ficuum* UICC 5. Sampel yang memiliki nilai R_f sama dengan standart antioksidan (0,16) adalah sampel *Aspergillus awamori* UICC 9; *Aspergillus niger* dan *Aspergillus phoenicus* UICC 13. Hal ini menunjukkan ketiga sampel positif mengandung antioksidan melalui analisis kualitatif dengan KLT.

Penelitian penggunaan KLT untuk melakukan analisis terhadap produksi antioksidan juga dilakukan pada *Callyspongia* sp. Hanani *et al.* (2005)

melaporkan bahwa untuk mendeterminasi adanya senyawa antioksidan dari ekstrak *Callyspongia* sp, dengan menggunakan metode KLT menunjukkan nilai R_f yang sama dengan standart yaitu 0,33.

Gambar 3-dimensi dari senyawa antioksidan yang dihasilkan oleh duabelas biakan *Aspergillus* spp., dianalisis menggunakan KLT scanner CAMAG 3 menunjukkan tinggi puncak kurva standart antioksidan BHT (139,72); sampel kapang terendah pada *A. ficuum* UICC 41 tinggi puncak (49, 53) dan puncak tertinggi pada *A. awamori* UICC 9 (179, 08). Luas area pada KLT scanner menunjukkan besarnya bercak-bercak yang terdapat pada lempeng silika.

Analisis aktivitas antioksidan yang menggunakan metode DPPH menunjukkan kapang *Aspergillus awamori* UICC 9 memiliki nilai EC 50% sebesar 1359,5 ppm. Adanya aktivitas antioksidan dari sampel mengakibatkan perubahan warna pada larutan DPPH dalam metanol yang semula berwarna violet pekat menjadi kuning pucat (Hanani *et al.* 2005). Interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH, akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH (Lisdawati *et al.* 2006).

Organ hati kelompok K1 yang tampak berwarna merah hati segar merupakan gambaran organ hati normal. Pada perlakuan dosis 0,36 mg/ hari (KP1) tekstur organ hati tetap licin dan terlihat perubahan warna merah yang agak memucat sedangkan pada perlakuan dosis 1,08 mg/ hari (KP3) tetap berwarna merah hati segar dan tekstur organ hati juga licin. Warna merah hati segar pada hati normal disebabkan oleh adanya aliran darah yang cukup banyak di dalam hati (Leeson *et al.* 1996).

Berat rerata organ hati perlakuan K2 (12,7 g) terlihat memiliki berat rerata tertinggi dibanding perlakuan K1, KP1, KP2 dan KP3 yaitu 11,2 g; 10,8 g; 10,9 g dan 11,1 g. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada kelompok K2 telah terjadi perubahan morfologi jaringan hati. Keadaan ini sesuai dengan pernyataan Lu (1995) bahwa penambahan berat mungkin terjadi karena adanya kandungan lemak dalam hati. Perlemakan (steatosis) disebabkan oleh terpaparnya CCl_4 ke dalam jaringan hati yang mengakibatkan munculnya butiran-butiran lemak, yang pada sediaan histologik tidak terwarnai oleh pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE).

Hasil pengamatan rata-rata diameter vena sentralis rata-rata pada K1, K2, KP1, KP2 dan KP3 secara berturut-turut 56,81; 72,82; 69,15; 66,86 dan 61,61 (μm). Dari hasil analisis varian (Anova) rata-rata diameter vena sentralis antar kelompok perlakuan berbeda nyata ($P < 0,05$). Hasil uji jarak berganda Duncan (DMRT) antara kelompok perlakuan dosis 0,36 mg/hari (KP1), dosis 0,72 mg/hari (KP2) dan dosis 1,08 mg/hari (KP3) tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$). Sedangkan antara kelompok kontrol negatif (K1), KP3 dan KP2 tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$), demikian juga antara kelompok kontrol positif dengan KP1 dan KP2 tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$), akan tetapi pada kelompok kontrol negatif (K1) dan kelompok perlakuan dosis 1,08 mg/hari (KP3) lebih rendah secara bermakna ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K2).

Kerusakan pada vena sentralis menunjukkan bahwa hati mengalami degenerasi pada vena sentralis, dimulai dari bagian endotel yang merupakan bagian yang sangat peka terhadap racun. Kerusakan vena sentralis biasanya disertai dengan reaksi pembendungan (Leeson *et al.* 1996). Hal ini terlihat rerata vena sentralis pada K2 memiliki diameter yang paling besar sedangkan pada KP3 (dosis 1,08 mg/hari) memiliki diameter yang mendekati diameter vena sentralis K1 (normal). Hasil pengamatan kelompok perlakuan dosis 0,36 mg/ hari (KP1), dosis 0,72 mg/hari (KP2) dan dosis 1,08 mg/hari (KP3) memiliki diameter rata-rata vena sentralis yang lebih kecil dibanding kelompok K2 dimana semakin tinggi dosis pemberian ekstrak *Aspergillus awamori* UICC 9 memberikan hasil pengukuran diameter rata-rata vena sentralis yang semakin rendah, sehingga menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Aspergillus awamori* UICC 9 pada tikus putih sebelum diinduksi CCl_4 dapat meminimalisir tingkat kerusakan hati. Efek perbaikan jaringan hati yang dimiliki oleh ekstrak *Aspergillus awamori* UICC 9 diduga disebabkan oleh senyawa flavonoid yang memperlihatkan efek antioksidan (Wang *et al.* 2007). Antioksidan merupakan salah satu senyawa yang dapat menginaktifkan radikal bebas, molekul tidak stabil yang dihasilkan oleh berbagai jenis proses kimia normal tubuh, radiasi matahari, asap rokok dan pengaruh lingkungan lainnya (Hamdayani dan Sulistiyo, 2008). Proses toksikasi CCl_4 dapat dihambat oleh adanya antioksidan (Weber *et al.* 2003).

Hasil pengamatan persentase lobulus hati normal dan derajat kerusakan hati pada gambar 2.6 dan lampiran 2.8 menunjukkan bahwa persentase rata-rata lobulus hati normal dan kerusakan ringan (derajat 1) berturut-turut pada kelompok pada kontrol negatif (K1) sebesar 94% dan 6%. Kerusakan sedang (derajat 2) dan kerusakan berat (derajat 3) tidak ditemukan pada kelompok K1. Persentase tersebut menunjukkan keadaan lobulus hati yang hampir normal sesuai dengan pernyataan Leeson *et al.* (1996) yaitu sel hati yang berbentuk polihedral, memiliki satu atau dua inti berbentuk bulat atau lonjong dan memiliki batas-batas sel yang jelas (Gambar 2.4 dan 2.5a).

Kelompok K2 merupakan kelompok kontrol positif yang diberikan CCl_4 sehingga dapat menunjukkan gambaran kerusakan hati. Kelompok control tersebut dapat dijadikan pembandingan terhadap penilaian ada atau tidaknya proses perbaikan sel-sel hati pada kelompok-kelompok perlakuan dengan pencekakan ekstrak antioksidan hasil fermentasi kapang *Aspergillus awamori* UICC 9. Struktur histologis K2 dapat di lihat pada gambar 2.5b. Nilai persentase rata-rata lobulus hati normal dan kerusakan hepatosit untuk derajat 1, derajat 2 dan derajat 3 berturut-turut pada kelompok kontrol 2 (K2) berdasarkan pengamatan semikuantitatif yaitu 4%; 42%; 54% dan 0% (Gambar 2.6). Persentase tersebut menunjukkan kerusakan pada lobulus-lobulus hati dengan kategori kerusakan derajat (kerusakan 20-40% luas lobulus) dan lobulus hati normal hanya ditemukan 4%. Secara histologis, kerusakan-kerusakan lobulus hati K2 meliputi diameter vena sentralis melebar, sel-sel endotel melisis, terjadi perlemakan dan adanya pembendungan darah (Gambar 2.4b).

Hasil pengamatan histopatologis setelah pemberian ekstrak antioksidan pada kelompok KP3 (dosis 1,08 mg/hari) terjadi perbaikan sel-sel hepatosit. Mekanisme perbaikan dari hepatosit diduga disebabkan adanya pengikatan radikal CCl_3 oleh senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak etil asetat kapang *Aspergillus awamori* UICC 9. Senyawa-senyawa antioksidan yang terkandung dalam ekstrak etil asetat *Aspergillus awamori* UICC 9 diduga berperan dalam perbaikan jaringan hati *Rattus norvegicus*.

Rerata kadar serum glutamate oksaloasetat transferase (SGOT) pada K1, K2, KP1, KP2 dan KP3 berturut-turut yaitu 99,4; 264,8; 247,2; 159; 126,6 (μ /L). Kelompok kontrol positif (K2) menghasilkan kadar SGOT yang lebih tinggi dibanding kelompok K1, KP1, KP2 dan KP3. Kelompok KP1 (dosis 0,36 mg/hari) terjadi penurunan rata-rata 6,63%; KP2 (dosis 0,72 mg/hari) terjadi penurunan rata-rata sebesar 39,7% dan KP3 (dosis 1,08 mg/hari) terjadi penurunan sebesar 52,3%, dari tiga dosis tersebut yang paling banyak menurunkan kadar SGOT adalah kelompok perlakuan KP3 (dosis 1,08 mg/hari) lebih rendah dari rata-rata penurunan kadar SGOT oleh kelompok perlakuan K2 (kontrol positif). Berdasarkan hasil analisis varians (Anova), kadar SGOT antar perlakuan berpengaruh nyata ($P < 0,05$). Pada uji lanjut Duncan multiple range test (DMRT) menunjukkan bahwa antar kelompok K1, KP2 dan KP3 tidak ada perbedaan yang bermakna ($P > 0,05$); kelompok perlakuan dosis 0,36 mg/hari (KP1) dan kelompok kontrol positif (K2) menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna ($P > 0,05$); kelompok kontrol negatif (K1), kelompok perlakuan dosis 0,72 mg/hari (KP2) dan dosis 1,08 mg/hari (KP3) berbeda secara bermakna dengan kelompok perlakuan dosis 0,36 mg/hari (KP1) dan K2 ($P < 0,05$).

Berdasarkan Gambar 2.8 rerata kadar serum glutamate piruvat transferase pada kelompok K1; K2; KP1; KP2 dan KP3 secara berturut-turut yaitu 122,2; 331,8; 264,6; 249,4 dan 229,2 (μ /L). Kelompok K2 memiliki kadar SGPT yang tinggi dibanding kelompok perlakuan lainnya seperti K1; KP1; KP2; KP3. Hasil analisis varians (Anova) menunjukkan bahwa antar perlakuan terdapat perbedaan yang nyata ($P < 0,05$). Pada uji lanjut Duncan Multiple Range Test (DMRT) menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif (K1) berbeda secara bermakna dengan kelompok kontrol positif (K2); kelompok perlakuan dosis 0,36 mg/hari (KP1); dosis 0,72 mg/hari (KP2) dan dosis 1,08 mg/hari (KP3). Kelompok perlakuan dosis 0,36 mg/hari (KP1) dan dosis 0,72 mg/hari (KP2) tidak ada perbedaan yang bermakna dibanding dengan kelompok kontrol positif (K2) ($P > 0,05$). Kadar SGPT antar kelompok perlakuan KP1; KP2 dan KP3 tidak ada perbedaan yang bermakna ($P > 0,05$). Kelompok perlakuan dosis 1,08 mg/hari (KP3) berbeda secara bermakna dibanding kelompok kontrol positif (K2) ($P < 0,05$) (Lampiran 2.13).

Kerusakan pada membran hepatosit dan membrane organel hepatosit serta kematian sel, dapat menyebabkan terlepasnya enzim yang terikat ke membrane hepatosit dan membran organel hepatosit serta enzim dalam sitoplasma ke dalam sirkulasi sistemik, seperti SGOT dan SGPT). Pengujian kadar enzim SGOT dan SGPT sebagai indikasi kerusakan hati sampai saat ini dianggap masih paling praktis. Enzim SGOT terdapat di sitoplasma (20%) dan mitokondria (80%), sedangkan SGPT hanya terdapat di sitoplasma. Enzim SGPT paling tinggi konsentrasinya dalam sel-sel hati (hepatosit) (Gianini *et al.*2005).

Kerusakan hepatosit yang diinduksi oleh radikal bebas seperti metabolit CCl_4 dapat dicegah atau dikurangi oleh senyawa yang bersifat antioksidan. Pada penelitian ini diperoleh hasil, pada kelompok perlakuan dosis 1,08 mg/hari (KP3) memperlihatkan efek hepatoprotektor paling tinggi yakni memperbaiki sel hati yang rusak. Hal ini dapat di lihat dari kadar SGOT dan SGPT pada kelompok perlakuan dosis 1,08 mg/hari (KP3) yang lebih rendah dibanding kelompok kontrol positif (K2) dan lebih tinggi dibanding kelompok kontrol negatif (K1). Tingginya kadar SGOT dan SGPT yang diperoleh pada penelitian ini, kemungkinan besar disebabkan oleh toksisitas CCl_4 yang meningkat akibat puasa yang lebih panjang (17 jam). Bruckner *et al.* 2002, mengemukakan bahwa puasa 16 -48 jam dapat meningkatkan metabolisme dan hepatoksisitas CCl_4 , puasa juga menyebabkan penurunan kadar glutathion yang berperan penting untuk menangkal radikal bebas ($*CCl_3$) yang dihasilkan oleh CCl_4 .

Pemberian ekstrak kapang *Aspergillus awamori* UICC 9 mampu mencegah peningkatan kadar enzim SGOT dan SGPT plasma darah tikus putih *Rattus norvegicus* L. Berdasarkan hasil analisis fitokimia ekstrak etil asetat *Aspergillus awamori* UICC 9 mengandung senyawa yang bersifat antioksidan yaitu flavonoid, glikosida, alkaloid dan triterpenoid polifenol. Flavonoid telah diketahui memiliki aktifitas antioksidan, antiinflamasi, hepatoprotektif, antitrombosis, antiviral dan antikarsinogen (Choudary *et al.* 2004; Algameta, 2009).

RANGKUMAN KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

Hasil rendemen 12 ekstrak kapang *Aspergillus spp* sebesar 1,57 – 3,80 %. Kadar rendemen yang tertinggi pada *Aspergillus niger* UICC 371 (3,8%). Rendemen ekstrak kapang *Aspergillus awamori* UICC 9 sebesar 3,02 % . Analisis antioksidan dengan metode fitokimia menghasilkan senyawa-senyawa kimiawi yaitu triterpenoid, glikosida, flavonoid dan alkaloid. Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menunjukkan nilai R_f adalah (0,15- 0,22) dan standart BHT (0,16). *Aspergillus awamori* UICC 9 memiliki nilai R_f yang sama dengan nilai R_f standar dan analisis aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menunjukkan bersifat antioksidan dengan nilai EC_{50} sebesar 1359,5 ppm.

Hasil penelitian menunjukkan ekstrak antioksidan *Aspergillus awamori* UICC 9 yang dicekokkan pada tikus putih (*Rattus norvegicus* L. Galur Sparague-Dawley, pada dosis 0,36 mg/hari (KP1); 0,72 mg/hari (KP2) dan 1,08 mg/hari (KP3). Pemberian ekstrak *Aspergillus awamori* UICC 9 pada dosis yang berbeda berpengaruh pada perubahan morfologis (makroskopis), hal ini terlihat pada dosis K2 (pemberian CMC 0,5%) memiliki diameter vena sentralis yang paling besar dibanding dosis K1 (aquades), KP1 (ekstrak dosis 0,36 mg/hari), KP2 (dosis 0,72 mg/ hari) dan KP3 (dosis 1,08 mg/ hari).

Pengamatan secara mikroskopis pada kelompok KP3 (dosis 1,08 mg/ hari) jaringan hati mengalami perbaikan, hal ini dapat di lihat pada sel-sel hati (hepatosit) yang beregenerasi dibanding KP1 (0,36 mg/hari) dan KP2 (0,72 mg/hari) sedangkan pada kelompok K2 (CMC 0,05%) mengalami kerusakan hepatosit.

Kadar SGOT dan SGPT pada kelompok KP3 (dosis 1,08 mg/hari) memiliki kadar yang lebih rendah dibanding KP1 (dosis 0,36 mg/hari) dan KP2 (dosis 0,72 mg/hari) walaupun belum mendekati kadar SGOT dan SGPT K1 (normal).

Kerusakan hepatosit yang diinduksi oleh radikal bebas CCl_4 dapat dicegah dengan pemberian senyawa yang bersifat antioksidan seperti Ekstraks

Aspergillus awamori UICC 9. Hal ini terlihat pada kelompok KP1, KP2 dan KP3 yang memiliki nilai kerusakan hepatosit yang lebih kecil dibanding K2 (CMC 0,05%)..

SARAN :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai medium yang paling baik dalam memproduksi antioksidan secara maksimal dan purifikasi antioksidan yang dihasilkan.
2. Perlu dilakukan uji toksisitas dari ekstrak *Aspergillus* spp.
3. Perlu dilakukan peningkatan dosis ekstrak *Aspergillus* spp. untuk melihat dosis yang optimum dalam perbaikan jaringan hati tikus putih (*Rattus norvegicus* L.).

DAFTAR ACUAN

- Andayani, R, Y. Lisawati & Maimunah. 2008. Penentuan aktivitas antioksidan, kadar fenolat total dan likopen pada buah tomat (*Lycopersicum L.*). *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*. 13: 9 hlm.
- Hanani, E., A. Mun'in & R. Sekarini. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Spons *Callyspongia sp* dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 2(3): 127-133.
- Harborne, J.B. 1987. Metode Fitokimia: Penuntun cara modern menganalisis tumbuhan. Terj. dari *Phytochemical methods*, oleh Padmawinata, K dan Soediro, I. Penerbit ITB, Bandung: x + 453 hlm.
- Lisdawati, V., L. Broto & S. Kardono. 2006. Aktivitas antioksidan dari berbagai fraksi ekstrak daging buah dan kulit biji Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*). *Media Litbang Kesehatan*. 15(4). 7 hlm.
- Leeson, C.R., T.S. Leeson & A.A. Paparo. 1996. Buku ajar histology. Ed. Ke-5. Terj. dari *Textbook of histology*, oleh Siswojo, S. K., J. Tambong., S. Wonodirekso., I.A. Suryono., R. Tanzil., R. Soeharto., S. Roewijoko., I. Goeritno & M. Martoprawiro. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta: xi + 622 hlm.
- Lu, F.C. 1995. Toksikologi dasar. Azas, organ sasaran, dan penilaian resiko. Terj. dari *Basic toxicology: Fundamentals, target organs, and risk assessment*, oleh Nugroho, E., Z.S. Bustami & I. Darmawansyah. UI-Press, Jakarta: xv + 429 hlm.
- Tensiska, Marsetio & Y.N.O. Silvia. 2007. Pengaruh jenis pelarut terhadap aktivitas antioksidan ekstrak kasar Isoflavon dari ampas tahu. Jurusan Teknologi Industri Pangan FTIP, Universitas Padjajaran, Bandung. 8 hlm.