

**POTENSI TEPUNG TEMPE TERHADAP PERSENTASE  
SEL DARAH PUTIH DIFERENSIAL LIMFOSIT DAN MONOSIT  
(*STUDY* PADA TIKUS *SPRAGUE DAWLEY* BETINA YANG DIINDUKSI  
DMBA SEBAGAI KARSINOGENIK KANKER PAYUDARA)**

**Skripsi**

**Diajukan Untuk Memenuhi Sebagian Persyaratan  
Mencapai Gelar Sarjana Gizi**



**Diajukan Oleh :**

**AMELLIA SETYAWATI**

**G2B.012.022**

**PROGRAM STUDI S1 GIZI  
FAKULTAS ILMU KEPERAWATAN DAN KESEHATAN  
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SEMARANG**

**2016**

## HALAMAN PERSETUJUAN

SEMINAR SKRIPSI  
POTENSI TEPUNG TEMPE TERHADAP PERSENTASE  
DIFERENSIAL SEL DARAH PUTIH LIMFOSIT DAN MONOSIT  
(STUDY PADA TIKUS *SPRAGUE DAWLEY* BETINA YANG DIINDUKSI  
DMBA SEBAGAI KARSINOGENIK KANKER PAYUDARA)

Disusun oleh:

AMELLIA SETYAWATI

G2B012022

Telah disetujui oleh:

Pembimbing I / Utama

Sufiati Bintanah, SKM., M.Si

Tanggal : 29 Agustus 2016

NIK : 28.6.1026.022

Pembimbing II / Pendamping

Kartika Nugraheni, SGz., M.Gz

Tanggal : 29 Agustus 2016

NIK : CP.1026.031

Mengetahui,  
Ketua Program Studi S1 Ilmu Gizi  
Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan  
Universitas Muhammadiyah Semarang

(Ir. Agustip S. Bintanah, M. Kes)

NIK : 28.6.1026.015

ii

### HALAMAN PENGESAHAN

Potensi Tepung Tempe terhadap Persentase  
Diferensial Sel Darah Putih Limfosit dan Monosit  
(*Study* pada Tikus *Sprague Dawley* Betina yang Diinduksi  
DMBA sebagai Karsinogenik Kanker Payudara)

Disusun oleh:  
AMELLIA SETYAWATI  
G2B012022

Telah dipertahankan di hadapan Tim Penguji  
Program Studi S1 Gizi Universitas Muhammadiyah Semarang  
Pada hari Senin, tanggal 29 Agustus 2016

Dewan Penguji :

<u>Jabatan</u>	<u>Nama</u>	<u>Tanda Tangan</u>
Penguji I	<u>Sufiati Bintanah, SKM., M.Si</u> NIK : 28.6.1026.022	
Penguji II	<u>Kartika Nugraheni, SGz., M.Gz</u> NIK : CP.1026.031	
Penguji III	<u>Dr. Nurhidajah, STP., M.Si</u> NIK : 28.6.1026.408	

Mengetahui,

Ketua Program Studi S1 Gizi  
Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan  
Universitas Muhammadiyah Semarang



(Dr. Agustin Samsianah, M. Kes)  
NIK : 28.6.1026.015

**PERNYATAAN**

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Amelia Setyawati

NIM : G2B012022

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa Skripsi saya yang berjudul :

**POTENSI TEPUNG TEMPE TERHADAP PERSENTASE SEL DARAH  
PUTIH DIFERENSIAL LIMFOSIT DAN MONOSIT (STUDY PADA TIKUS  
SPRAGUE DAWLEY BETINA YANG DIINDUKSI DMBA SEBAGAI  
KARSINOGENIK KANKER PAYUDARA)**

Adalah betul-betul karya sendiri. Hal-hal yang bukan karya saya, tertulis dalam skripsi tersebut, diberi tanda *clausa* dan ditunjukkan dalam Daftar Pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti pernyataan saya tidak benar, maka bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan skripsi dan gelar yang saya peroleh.

Semarang, September 2016

Yang membuat pernyataan

  
(Amelia Setyawati)

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT karena berkat rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“POTENSI TEPUNG TEMPE TERHADAP PERSENTASE SEL DARAH PUTIH DIFERENSIAL LIMFOSIT DAN MONOSIT (STUDY PADA TIKUS *SPRAGUE DAWLEY* BETINA YANG DIINDUKSI DMBA SEBAGAI KARSINOGENIK KANKER PAYUDARA)”**

Skripsi ini sebagai salah satu persyaratan akademik untuk menyelesaikan Program Sarjana pada bidang keahlian Ilmu Gizi Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang. Untuk itu pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada :

1. Ketua Program Studi SI Ilmu Gizi Universitas Muhammadiyah Semarang  
Ibu Ir. Agustin Syamsianah, M.Kes.
2. Ibu Sufiati Bintanah, SKM, M.Si selaku pembimbing I.
3. Ibu Kartika Nugraheni, S.Gz, M.Gz, selaku pembimbing II.
4. Ibu Dr. Nurhidajah, S.Tp, selaku penguji skripsi.
5. Ibu Dr. Siti Harnina Bintari yang telah memperkenankan saya untuk menjadi bagian dari penelitian beliau
6. Kedua orang tua dan keluarga yang senantiasa memberi doa dan dukungan.
7. Seluruh pengajar dan staf Program Studi SI Ilmu Gizi yang telah memberikan ilmu, bantuan dan masukan kepada penulis.
8. Semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini, yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan sehingga penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun. Akhir kata penulis skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua. Amin.

Penulis

**POTENSI TEPUNG TEMPE TERHADAP PERSENTASE  
DIFERENSIAL SEL DARAH PUTIH LIMFOSIT DAN MONOSIT  
(STUDY PADA TIKUS *SPRAGUE DAWLEY* BETINA YANG  
DIINDUKSI DMBA SEBAGAI KARSINOGENIK KANKER PAYUDARA)**

Amellia Setyawati<sup>1</sup>, Sufiati Bintanah<sup>2</sup>, Kartika Nugraheni<sup>3</sup>  
<sup>1,2,3</sup> Program Studi S1 Ilmu Gizi Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan  
Universitas Muhammadiyah Semarang

Kanker payudara sering ditemui dan disertai mortalitas dan morbiditas yang tinggi dengan pertumbuhan pertahun 3,1% dan 1.643.000 penderita di tahun 2010 (Forouzanfar, 2011). Peningkatan sel darah putih menunjukkan adanya perlawanan dan proteksi tubuh terhadap kanker. Tempe mengandung isoflavin sebagai antioksidan dan berpotensi membantu fungsi sel darah putih dalam usaha melawan kanker. Pemberian tepung tempe diharapkan berdampak pada sel darah putih yang diproduksi tidak berlebihan. Penelitian ini bertujuan untuk menemukan dosis tepung tempe yang tepat untuk menurunkan persentase sel darah putih diferensial jenis limfosit dan monosit dalam salah satu usaha pencegahan kanker payudara pada tikus *sprague dawley* betina yang diinduksi DMBA.

Desain penelitian berupa *true-experimental* menggunakan *post test only-randomized, control group trial*. Tiga puluh ekor tikus dibagi dalam 5 kelompok perlakuan (dosis pemberian tepung tempe 0%, 1%, 10%, 50%, dan 75% pada pakan) diinduksi 20mg/kg BB DMBA setiap 2x/minggu selama 137 hari. Pasca induksi DMBA seluruh kelompok perlakuan diambil darah untuk dilihat persentase limfosit dan monosit. Analisis statistik menggunakan uji *anova* untuk mengetahui perbedaan penurunan jumlah sel darah putih diferensial kelima kelompok perlakuan.

Terdapat hubungan antara dosis tepung tempe yang diberikan dengan peningkatan berat badan tikus, terdapat perbedaan yang signifikan persentase peningkatan berat badan tikus antar kelompok perlakuan. Terdapat perbedaan rata-rata persentase limfosit dan monosit setelah perlakuan antara kelompok kontrol dengan semua kelompok perlakuan, namun secara statistik tidak terdapat perbedaan penurunan persentase limfosit dan monosit yang signifikan. ( $p > 0,05$ ). Perbedaan dosis tepung tempe tidak berpengaruh terhadap persentase sel limfosit dan monosit pada tikus *sprague dawley* yang diinduksi DMBA.

**Kata kunci:** tepung tempe, limfosit, monosit, DMBA, kanker payudara.

**POTENSI TEPUNG TEMPE TERHADAP PERSENTASE  
DIFERENSIAL SEL DARAH PUTIH LIMFOSIT DAN MONOSIT  
(STUDY PADA TIKUS SPRAGUE DAWLEY BETINA YANG  
DIINDUKSI DMBA SEBAGAI KARSINOGENIK KANKER PAYUDARA)**

Amellia Setyawati<sup>1</sup>, Sufiati Bintanah<sup>2</sup>, Kartika Nugraheni<sup>3</sup>  
<sup>1,2,3</sup> Program Studi S1 Ilmu Gizi Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan  
Universitas Muhammadiyah Semarang

**ABSTRACT**

*Breast cancer is often encountered and accompanied by high mortality and morbidity with growth of 3,1% per year and 1.643.000 people in 2010 (Forouzanfar, 2011). The increase of white blood cells showed its used as antibody protection to fight against cancer. Tempe contains isoflavones which act as an antioxidant and has the potential to help the function of white blood cells to fight against cancer. The consumption of tempe flour can depress excessive white blood cell production. This study aims to find the right dose of tempe flour to decrease the percentage of white blood types of lymphocytes and monocytes as prevention breast cancer in sprague dawley female rats induced with DMBA.*

*This is a true-experimental reseach use post-test only randomized, control group trial design. Thirty rats were divided into 5 groups, induced with 20mg/kg DMBA each twice per week for 137 days with AIN-93 M modification. After DMBA induced control group and all of treatment groups blood drawn to see the percentage of lymphocytes and monocytes. The difference between control and treatment groups were analyzed using anova.*

*There is a relationship between the dose given tempe flour with increased body weight of rats, there are significant differences percentage increase in body weight of rats between treatment groups There are diferences in the average percentage of lymphocytes and monocytes after treatment between the control group and all the treatment groups, but statistically there is no significant diferences in the percentage decrease of lymphocytes and monocytes ( $p>0,05$ ). Differences tempe flour dose had not effect on the percentage of lymphocytes and monocytes in sprague dawley rats were induced by DMBA.*

**Keywords: tempe flour, lymphocytes, monocytes, DMBA, breast cancer.**

## DAFTAR ISI

Halaman Judul.....	i
Halaman Persetujuan.....	ii
Halaman Pengesahan .....	iii
Pernyataan .....	iv
Kata Pengantar .....	v
Ringkasan.....	vi
Abstract .....	vii
Daftar Isi.....	viii
Daftar Tabel .....	x
Daftar Gambar.....	xi
Daftar Lampiran .....	xii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
A. Rumusan Masalah Umum .....	2
B. Rumusan Masalah Khusus.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
A. Tujuan Umum.....	2
B. Tujuan Khusus .....	2
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
1.5 Keaslian Penelitian.....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Kanker .....	6
A. Kanker Payudara.....	6
B. Mekanisme Kanker Payudara .....	6
C. Faktor Resiko .....	7
2.2 Radikal Bebas dan Sistem Pertahanan Tubuh .....	7
A. Mekanisme Radikal Bebas Membentuk Sel Kanker .....	7
B. Sistem Imun Tubuh.....	9
C. Peran Sistem Imun dalam Pengendalian Sel Kanker .....	10
2.3 Antioksidan.....	13
2.4 Tempe .....	14
A. Kandungan Tempe.....	16
B. Tempe Meningkatkan Sistem Imun .....	17
2.5 Isoflavon .....	18
A. Mekanisme Isoflavon sebagai Penangkap Radikal Bebas.....	21
2.6 Leukosit (Sel Darah Putih) .....	23
A. Leukosit Tikus.....	24
2.7 DMBA (7.12-Dimethylbenz ( $\alpha$ ) Antrasen).....	25
2.8 Kerangka Teori .....	25

2.9	Kerangka Konsep .....	26
2.10	Hipotesis .....	26
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b>		
3.1	Desain dan Rancangan Penelitian.....	27
3.2	Tempat dan Waktu Penelitian.....	28
3.3	Populasi dan Besar Sampel.....	28
	A. Populasi .....	28
	B. Sampel .....	28
3.4	Variabel Penelitian .....	29
3.5	Definisi Operasional Variabel .....	29
3.6	Bahan dan Alat .....	29
	A. Bahan Utama .....	30
	B. Pakan .....	30
	C. Peralatan Penelitian .....	31
	D. Prosedur Penelitian.....	31
3.7	DMBA .....	31
3.8	Prosedur Pengumpulan Data .....	32
3.9	Analisis Data.....	32
3.10	Alur Penelitian.....	33
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>		
4.1	Berat Badan Tikus Perlakuan .....	34
4.2	Jumlah Sel Darah Putih Diferensial Post Perlakuan.....	35
4.3	Perbedaan Jumlah Sel Darah Putih Diferensial.....	39
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN</b>		
5.1	Kesimpulan.....	42
5.2	Saran .....	42
Daftar Pustaka		
Lampiran		

**DAFTAR TABEL**

Tabel 1.1 Keaslian Penelitian .....	4
Tabel 2.1 Komposisi Gizi Tempe .....	16
Tabel 2.2 Data Sel Darah Putih Tikus Betina Umur 17 Minggu dan >17 Minggu .....	24



**DAFTAR GAMBAR**

Gambar 2.1 Mekanisme Respon Imun Tubuh terhadap Sel Kanker.....	13
Gambar 2.3 Kerangka Teori .....	25
Gambar 2.4 Kerangka Konsep .....	26
Gambar 3.1 Rancangan Penelitian .....	27
Gambar 3.2 Alur Penelitian .....	33
Gambar 4.1 Peningkatan Berat Badan Tikus dan BB Pre Post Perlakuan .....	34
Gambar 4.2 Perbedaan Rata-rata Persentase Sel Darah Putih Diferensial Tikus .....	36



**DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran 1 Komposisi Pakan AIN-93 M.....	49
Lampiran 2 Formulir Pengambilan Data.....	50
Lampiran 3 Gambar Sel Darah Putih Diferensial Hasil Penelitian.....	52
Lampiran 4 Hasil Uji Statistik Menggunakan SPSS.....	53
Lampiran 5 <i>Etical Clirence</i> .....	58



## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **1.1.Latar Belakang**

Kanker merupakan penyebab kematian sebanyak 7,4 juta kasus di dunia berdasarkan data Organisasi Kesehatan Sedunia (WHO) tahun 2004. Di Indonesia, secara umum kanker merupakan penyebab kematian kedua dari kelompok penyakit non infeksi dan tumor ganas menduduki peringkat ke-4 penyebab kematian secara nasional (Riskesdas, 2007). Prevalensi kanker berdasarkan wawancara sebanyak 1,4 per mil dan yang tertinggi terdapat di DI Yogyakarta (4,1‰), diikuti JawaTengah (2,1‰) (Riskesdas, 2013). Di Jawa Tengah jumlah penderita kanker payudara menduduki peringkat pertama mencapai 12.281 kasus (50,74%), dengan populasi penderita tertinggi di Surakarta (Dinas Kesehatan Jawa Tengah, 2009). Peningkatan angka masyarakat yang didiagnosa dengan kanker salah satunya kanker payudara. Lebih dari 70% pasien kanker payudara datang dalam keadaan lanjut (Oemati, 2011).

Kanker payudara merupakan suatu kondisi dimana telah hilangnya kendali sel atas mekanisme normal pada sel yang terdapat di jaringan payudara sehingga terjadi pertumbuhan yang abnormal, cepat dan tidak terkendali pada sel tersebut. Kanker payudara merupakan masalah kesehatan masyarakat yang penting, karena mortalitas dan morbiditasnya yang tinggi. Kanker payudara merupakan jenis kanker yang sering ditemui dikalangan wanita sedunia. Setiap tahun, lebih dari 1,15 juta kasus kanker payudara baru terdiagnosa dikalangan wanita. Insidens ASR kanker payudara di Indonesia adalah sebesar 26 per 100000 penduduk wanita manakala mortaliti ASR mencapai 11,3 per 100000 penduduk wanita (Data GLOBOCAN, 2008)

Sel darah putih (leukosit) merupakan salah satu antibodi untuk membantu sistem imun dalam tubuh dari berbagai benda asing seperti virus, bakteri dan salah satunya sel kanker. Kanker menyebabkan jumlah leukosit akan meningkat sebagai salah satu proteksi tubuh dalam memerangi kanker. Dengan mengetahui jumlah sel darah putih maka akan mendapatkan gambaran sejauh mana infeksi sel kanker,

dengan kata lain apabila sel darah putih terdapat dalam jumlah normal maka sel kanker tersebut dapat tertangani oleh sistem imun tubuh.

Tempe kedelai merupakan contoh sumber protein nabati yang dikenal masyarakat Indonesia pada berbagai kalangan. Selain kandungan protein yang tinggi, tempe memiliki potensi lain yaitu isoflavon. Isoflavon pada tempe berpotensi untuk digunakan melawan radikal bebas, sehingga dapat mencegah terjadinya penyakit degeneratif salah satunya kanker. Keistimewaan isoflavon yang telah diketahui sampai saat ini ialah kemampuan sebagai antioksidan dan antikanker. Salah satu keistimewaan kandungan isoflavon tempe yaitu sebagai *scafanger* radikal bebas, maka diharapkan dapat membantu fungsi sel darah putih dalam usaha melawan sel kanker agar tidak terbentuk atau tidak memasuki stadium lanjut. Sehingga apabila diberikan tepung tempe sel darah putih tidak diproduksi secara berlebihan.

Melihat angka penderita kanker payudara semakin meningkat secara global, dan potensi isoflavon pada tempe sebagai antioksidan sehingga dapat bekerja secara sinergis bersama sel darah putih dalam mencegah tingkat keparahan kanker maka peneliti ingin mengetahui bagaimana variasi dosis tepung tempe yang efektif berpengaruh terhadap menurunnya jumlah persentase sel darah putih dimana pada umumnya terjadi peningkatan, dalam usaha pencegahan kanker payudara pada tikus *sprague dawley* betina yang diinduksi DMBA.

## **1.2. Rumusan Masalah**

### **A. Rumusan Masalah Umum**

Apakah ada pengaruh variasi dosis tepung tempe terhadap persentase sel darah putih diferensial tikus *sprague dawley* betina yang diinduksi DMBA?

### **B. Rumusan Masalah Khusus**

Apakah tepung tempe dengan variasi dosis 0%, 1%, 10%, 50%, dan 75% yang dicampurkan pada pakan tikus *sprague dawley* betina yang diinduksi DMBA dapat mempengaruhi penurunan persentase sel darah putih diferensial tikus tersebut?

### 1.3. Tujuan Penelitian

#### A. Tujuan Umum:

Mengetahui pengaruh tepung tempe dengan variasi dosis yang dicampurkan pada pakan terhadap persentase sel darah putih limfosit dan monosit tikus *sprague dawley* betina yang diinduksi DMBA.

#### B. Tujuan Khusus :

1. Menganalisis peningkatan berat badan tikus post perlakuan pada kelompok kontrol dan keempat kelompok perlakuan.
2. Menganalisis hubungan dosis tepung tempe dengan jumlah sel darah putih pada tikus post perlakuan.

#### 1.4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk :

1. Pemerintah dan Praktisi Kesehatan

Apabila terbukti bahwa ada hubungan pemberian tepung tempe terhadap jumlah sel darah putih maka diharapkan penelitian ini dapat digunakan sebagai sumber informasi alternatif bahwa isoflavon pada tempe dapat membantu usaha penurunan kejadian kesakitan yang meningkat pada penderita kanker payudara.

2. Bidang Keilmuan

Apabila hasil penelitian memberi dampak yang positif diharapkan dapat diterapkan pada manusia sehingga dapat dijadikan terapi diit kanker bahwa tempe dapat membantu sel darah putih dalam pencegahan peningkatan stadium kanker.

Dapat memperkuat konsep *primary prevention* penyakit kanker payudara sehingga menguatkan konsep konsumsi pangan fungsional berupa tempe segar dengan kandungan isoflavon aglikon guna mendukung dan mewujudkan sumber daya dan peningkatan kualitas hidup manusia.

### 1.5. Keaslian Penelitian

Tabel 1.1 Keaslian Penelitian

No	Nama Peneliti	Judul Penelitian	Tahun Penelitian	Variabel Penelitian	Hasil Penelitian
1	Nurrahman, Nurhidajah	Pengaruh Konsumsi Tempe Kedelai Hitam Terhadap Aktivitas Makrofag Dan Kadar Interleukin 1 (IL-1) Pada Tikus Secara <i>In Vivo</i>	2015	Variabel Bebas : Tempe Kedelai Hitam Variabel Terikat : Aktivitas Makrofag Dan Kadar Interleukin 1 (IL-1) Pada Tikus	Semakin tinggi jumlah tempe kedelai hitam dalam pakan, semakin tinggi indeks fagositosis dan kadar IL-1. Konsumsi tempe kedelai hitam berpengaruh terhadap aktivitas makrofag dan kadar IL-1 ( $p < 0,05$ ). Peningkatan aktivitas makrofag berkorelasi positif terhadap jumlah IL-1, dengan koefisien korelasi 0,9.
2	Martina Restuati	Uji Efek Ekstrak Daun Sirsak ( <i>Annona Muricata</i> ) Terhadap Leukosit Tikus Putih ( <i>Rattus Norvegicus</i> )	2013	Variabel Bebas : Pemberian Ekstrak Daun Sirsak Variabel Terikat : Leukosit tikus putih	Ekstrak daun sirsak memiliki pengaruh terhadap leukosit yang terdiri dari netrofil, limfosit dan monosit pada tikus putih. Jumlah total leukosit meningkat, persen neutrofil meningkat sementara persen limfosit mengalami penurunan dan persen monosit berpengaruh tidak nyata setelah diberi ekstrak daun sirsak.
3	Dian Natalia Eka Saputri, Awik Puji Dyah N, S.si, M.si, Dra. Nurlita Abdulgani,	Jumlah Total Dan Diferensial Leukosit Mencit ( <i>Mus Musculus</i> ) Pada Evaluasi <i>In Vivo</i> Antikanker Ekstrak Spons Laut		Variabel Bebas : Pemberian Ekstrak Spons Laut Variabel Terikat : jumlah total dan diferensial leukosit mencit ( <i>mus musculus</i> )	Pada pengamatan diferensial sel limfosit, mencit yang terkena kanker (K2) dan diterapi ekstrak spons laut A. suberitoides pada dosis 500 mg/Kg BB (K4) dan 1000 mg/Kg BB (K5) mengalami peningkatan jumlah sel limfosit sedangkan mencit yang diterapi dengan obat anti kanker

	M.si	<i>Aptos Suberitoides</i>			siklofasamid (K3) dan ekstrak spons laut <i>A.suberitoides</i> pada dosis paling tinggi (1500 mg/Kg BB) mengalami penurunan jumlah sel limfosit.
4	Bastomy Ali Burhan	Peningkatan Nilai Mutu Tempe Sebagai Induktor Apoptosis Dan Penghambat Proliferasi Sel Kanker Payudara	2011	Variabel Bebas : Nilai Mutu Tempe Variabel Terikat : Apoptosis Dan Hambatan Proliferasi Sel Kanker Payudara	Pemberian ekstrak tempe mempunyai pengaruh terhadap Apoptosis dan Proliferasi sel kanker payudara pada Tikus.
5	Dr. Agus Sundaryono	Uji Aktivitas Senyawa Flavonoid Total Dari <i>Gynura Segetum</i> (Lour) Terhadap Peningkatan Eritrosit Dan Penurunan Leukosit Pada Mencit (Mus Musculus)	2011	Variabel Bebas : Senyawa Flavonoid Total Dari <i>Gynura Segetum</i> (Lour) Variabel Terikat : Peningkatan Eritrosit Dan Penurunan Leukosit Pada Mencit (Mus Musculus)	Pemberian ekstrak etanol daun <i>G. segetum</i> yang di dalamnya terkandung senyawa flavonoid total pada M. musculus dengan dosis setara 185,2 mg/kgbb dan dosis 277,8 mg/kgbb mampu menaikkan jumlah eritrosit dan menurunkan jumlah leukosit.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Kanker

Dalam istilah kedokteran, semua benjolan disebut tumor. Benjolan atau tumor ada yang jinak dan ada yang ganas, tumor yang ganas itulah yang disebut kanker. Kanker merupakan kumpulan sel abnormal yang terbentuk oleh sel-sel yang tumbuh secara terus-menerus, tidak terbatas, tidak terkoordinasi dengan jaringan sekitarnya dan tidak berfungsi fisiologis (Darwito, 2009). Data laporan nasional riskesdas tahun 2007 prevalensi nasional Penyakit Tumor/Kanker adalah 0,4% (berdasarkan diagnosis tenaga kesehatan).

##### A. Kanker Payudara

Karakteristik kanker ada yang tumbuh secara cepat, ada yang tumbuh tidak terlalu cepat seperti kanker payudara. Kanker payudara merupakan penyakit yang dapat menyebabkan kematian pada wanita. Kanker payudara adalah tumor ganas yang berasal dari kelenjar payudara. Termasuk saluran kelenjar air susu dan jaringan penunjangnya (Darwito, 2009).

Secara global, terdapat peningkatan jumlah penderita kanker payudara dari 641.000 penderita di tahun 1980 menjadi 1.643.000 penderita di tahun 2010, dengan pertumbuhan pertahun 3,1%, serta kematian akibatnya sebanyak 452.000 penderita (Forouzanfar, 2011)

##### B. Mekanisme Kanker Payudara

###### *Teori Promotion dan Initiation*

Permulaan terjadinya kanker dimulai dengan sel normal yang bertransformasi, terdiri dari tahap inisiasi dan promosi. Langkah pertama karsinogenesis adalah mutasi menetap dari DNA sel selama transkripsi DNA. Lalu perlu adanya zat bersifat *initiation*, yang merangsang permulaan perubahan sel. *Initiaty agent* biasanya berupa unsur kimia, fisik atau biologis yang berkemampuan beraksi langsung dan mengubah struktur dasar dari komponen genetic/DNA sel. Untuk terjadinya kanker *initiation* perlu disusul dengan zat promotor yang mempunyai efek *reversible* terhadap perubahan sel yaitu

merangsang reproduksi dan pembelahan sel sehingga diperlukan perangsangan yang lama dan berkesinambungan. Tahap promosi ditandai dengan berkembangnya neoplasma dengan terbentuknya formasi tumor (Junaidi, 2007).

### **C. Faktor Resiko**

Tidak diketahui penyebab pasti kanker payudara, namun riset mengidentifikasi sejumlah faktor yang dapat meningkatkan resiko pada individu tertentu, yang meliputi faktor yang dapat diubah dan yang tidak dapat diubah. Faktor yang dapat diubah yaitu gaya hidup dalam perkembangan kanker payudara yang meliputi pestisida, merokok, konsumsi alkohol, terpapar radikal bebas, kegemukan, asupan makanan terutama lemak serta kurangnya olahraga fisik. Sedangkan faktor yang tidak dapat diubah diantaranya keluarga yang memiliki riwayat penyakit serupa, usia yang makin bertambah, tidak memiliki anak, kehamilan pertama pada usia di atas 30 tahun, periode menstruasi yang lebih lama (menstruasi pertama lebih awal atau menopause lebih lambat), faktor hormonal (baik estrogen maupun androgen). Riwayat keluarga yang pernah mengalami kanker payudara meningkatkan resiko berkembangnya penyakit ini. Para peneliti juga menemukan bahwa kerusakan dua gen yaitu BRCA1 dan BRCA2 dapat meningkatkan resiko wanita terkena kanker sampai 85%. Faktor genetik hanya berdampak 5-10% dari terjadinya kanker payudara dan ini menunjukkan bahwa faktor resiko lainnya memainkan peranan penting. Pentingnya faktor usia sebagai faktor resiko diperkuat oleh data bahwa 78% kanker payudara terjadi pada pasien yang berusia lebih dari 50 tahun dan hanya 6% pada pasien yang kurang dari 40 tahun. Rata-rata usia pada saat ditemukannya kanker adalah 64 tahun. (Darwito, 2009).

## **2.2 Radikal Bebas dan Sistem Pertahanan Tubuh**

### **A. Mekanisme Radikal Bebas Membentuk Sel Kanker**

Radikal bebas (*free radical*) atau sering juga disebut senyawa oksigen reaktif (*reactive oxygen species/ROS*) adalah sebuah molekul atau atom yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Radikal bebas bersifat tidak stabil, sangat reaktif dan dapat merebut elektron dari molekul lain dalam upaya mendapatkan pasangan elektronnya. Molekul yang kehilangan elektron ini dapat bersifat reaktif, terutama asam lemak tidak jenuh yang kemudian ditransformasikan menjadi radikal bebas yang sangat reaktif (Nabet,

1996). Dalam upaya memenuhi keganjilan elektronnya, radikal bebas yang elektronnya tidak berpasangan secara cepat akan menarik elektron makromolekul biologis yang berada di sekitarnya seperti protein, asam nukleat, dan asam deoksiribonukleat (DNA). Jika makromolekul yang teroksidasi dan terdegradasi tersebut merupakan bagian dari sel atau organel, maka dapat mengakibatkan kerusakan pada sel tersebut (Halliwell dan Gutteridge, 1990).

Pembentukan radikal bebas akan dinetralisir oleh antioksidan yang diproduksi oleh tubuh dalam jumlah yang berimbang. Pengaruh negatif radikal bebas terjadi jika jumlahnya melebihi kemampuan detoksifikasi oleh sistem pertahanan antioksidan tubuh sehingga menimbulkan kondisi stres oksidatif. Radikal bebas dapat terbentuk melalui dua cara, yaitu : (1) secara endogen, sebagai respon normal dari rantai peristiwa biokimia dalam tubuh, dalam sel (intrasel) maupun ekstrasel, dan (2) secara eksogen, radikal bebas didapat dari polutan lingkungan, asap rokok, obat-obatan, dan radiasi ionisasi atau sinar ultra violet (Supari, 1996; Langseth, 2000).

Stres oksidatif adalah suatu kondisi yang berhubungan dengan peningkatan kecepatan kerusakan sel akibat induksi oksigen dan turunannya (senyawa spesies oksigen reaktif/ROS). ROS yaitu molekul yang bukan hanya merupakan radikal oksigen, tetapi juga beberapa turunan oksigen yang non radikal (Halliwell dan Gutteridge, 1999). Kerusakan sel terjadi akibat ketidakseimbangan antara pembentukan ROS dan aktivitas pertahanan enzim antioksidan ( Fujii *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004).

Ketidakeimbangan terjadi ketika pembentukan radikal bebas melebihi sistem pertahanan, sistem pertahanan tidak mampu mendetoksifikasi radikal bebas, atau ketika terjadi penurunan proses detoksifikasi (Saleh dan Agarwal, 2002). Kondisi yang berhubungan dengan stres meliputi status penyakit kronis, penuaan, terekspos toksin (Sikka *et al.*, 1995), infeksi, inflamasi, serta kasus infertilitas yang dapat meningkatkan proses oksidasi dan menyebabkan kerusakan sel (Saleh dan Agarwal, 2002).

Situasi di mana terjadi perubahan keseimbangan karena berlebihnya ROS atau berkurangnya antioksidan yang berfungsi menetralkan ROS, merupakan

status positif stress oksidatif (Sikka *et al.*, 1995). Radikal bebas dan senyawa ROS dalam tubuh dapat menyebabkan oksidasi lipid, oksidasi protein, *DNA strand break*, modifikasi basa DNA, dan modulasi ekspresi genetik (Lee *et.al.*, 2004). Akibat dari hal tersebut merupakan faktor penyebab kerusakan sel yang merupakan salah satu pencetus terjadinya kanker.

## **B. Sistem Imun Tubuh**

Berbagai penelitian telah membuktikan bahwa sistem imun selain mencegah penyakit infeksi, dapat juga melindungi tubuh dari adanya sel yang tidak diperlukan, sel abnormal dan sel-sel kanker (Radji, 2009).

Sistem imun dibagi dua yaitu sistem imun alamiah / nonspesifik dan sistem imun spesifik/ adaptif yang terbagi atas humoral (Sitokin dan Sel Limfosit B) dan selular (Sel Limfosit T). Sistem imun nonspesifik yaitu fisik (kulit, selaput lendir, silia, batuk dan bersin), larut (biokimia dan humoral), dan selular. Komponen selular pada sistem imun non spesifik yaitu sel mast, basofil, eosinofil, SD, sel NK (*Natural Killer Cell*), dan fagosit yang terdiri dari mononuklear (monosit) dan polimorfnuklear (neutrofil)(Baratawidjaja, 2009).

Sel neutrofil, eusinofil, basofil dan monosit termasuk dalam sistem imun nonspesifik, sedangkan sel limfosit termasuk dalam sistem imun spesifik (Baratawidjaja, 2004).

Imunitas nonspesifik fisiologik berupa komponen normal tubuh, selalu ditemukan pada individu sehat dan siap mencegah mikroba masuk ke dalam tubuh dan dengan cepat menyingkirkannya. Dengan adanya infeksi dapat meningkatkan imunitas nonspesifik, sebagai contoh jumlah sel darah putih meningkat selama fase akut pada banyak penyakit salah satunya kanker. Sistem imun ini disebut nonspesifik karena tidak ditujukan terhadap suatu mikroba tertentu, imunitas ini telah ada dan siap berfungsi sejak manusia lahir. Sistem pertahanan tubuh ini merupakan pertahanan terdepan dalam menghadapi serangan berbagai mikroba serta dapat memberikan respon langsung. Sel sel sistem imun berasal dari sel prekursor (induk) yang pleuripoten dalam sum sum tulang yang kemudian berdiferensiasi menjadi sel pre-monosit (Baratawidjaja, 2009).

Sumsum tulang pada manusia merupakan perintis proses pembentukan monoblast, promonosit, dan monosit. Kemudian monosit migrasi ke pembuluh darah atau jaringan dan menjadi makrofag. Makrofag merupakan professional fagosit yang dapat menangkap antigen di dalam tubuh untuk diproses dan dipresentasikan ke permukaan sel. Sel tersebut merupakan APC (*Antigen Presenting Cell*) (Sudiana, 2008).

### C. Peran Sistem Imun Dalam Pengendalian Sel Kanker

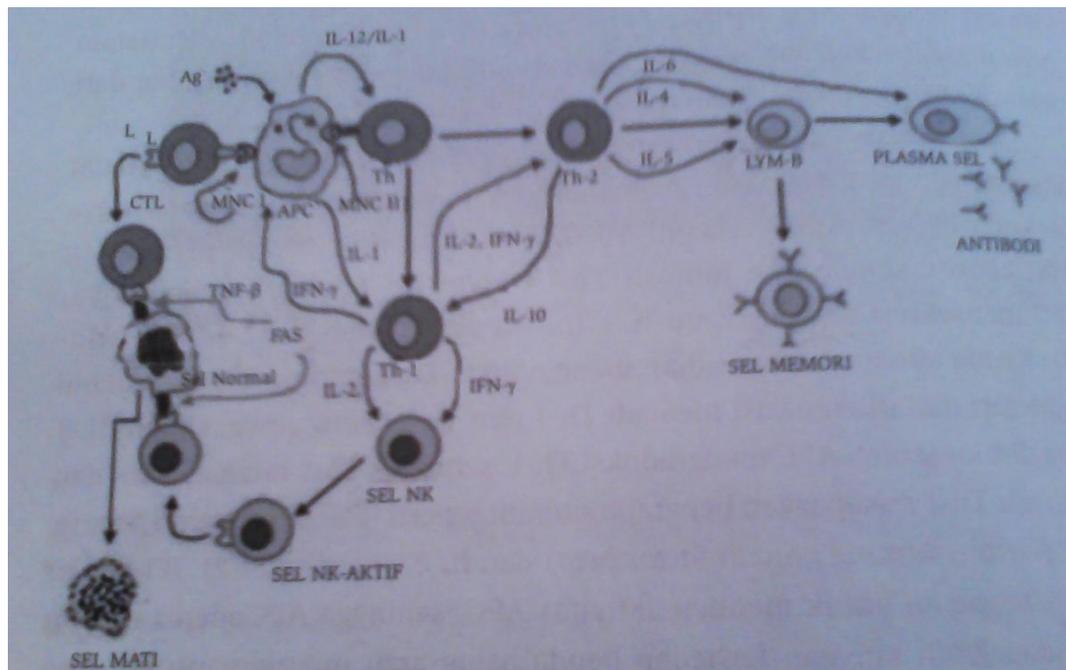
Sel kanker dikenal sebagai *nonself* (zat asing) yang bersifat antigenik pada sistem imunitas tubuh manusia sehingga ia akan menimbulkan respon imun secara seluler maupun humoral (Halim, 2001). Peningkatan jumlah leukosit total menunjukkan adanya respon leukosit secara humoral dan seluler dalam mengatasi adanya zat asing (sel kanker) (Erlinger, 2004). Sel tumor menunjukkan antigen yang tidak ditemukan pada sel normal sehingga antigen tersebut muncul sebagai antigen asing dan kehadiran mereka menyebabkan sel imun menyerang sel tumor (Finlay, 2006).

Sel abnormal (sel kanker) pada permukaannya akan terekspresi suatu protein asing yang dapat memicu respon imun baik humoral maupun seluler. Respon imun humoral tampaknya kurang mampu mengeksekusi sel kanker karena sel kanker berkemampuan menyembunyikan epitopnya (epitop atau antigen determinant adalah bagian yang menentukan spesifisitas dari reaksi antigen-antibodi dan penentu terhadap timbulnya respon imun) dari permukaan sel hingga tidak dapat dikenali oleh antibodi. Respon imun seluler lebih protektif dalam penanggulangan kanker karena sel kanker akan mengekspresikan fas di permukaannya, sedangkan sel NK (*Natural Killer Cell*) dan CTL (*Cytotoxic T-Lymphocyte*) mengekspresikan ligan pada permukaannya. Terekspresinya ligan pada permukaan sel NK atau CTL, serta adanya ekspresi fas pada permukaan sel kanker mengakibatkan terjadinya penempelan antara sel kanker dan sel NK atau CTL, melalui ikatan fas dengan ligan tersebut. Selanjutnya karena adanya ikatan tersebut pada sitosol sel kanker akan terjadi aktifitas FADD (*Fas Associated Proteid Death Domain*). Adanya aktifitas FADD inilah yang akan mengaktifkan

DNA-se, enzim ini yang kemudian menghancurkan (memfragmentasi) DNA sel kanker, sehingga sel kanker mengalami kematian (apoptosis) (Sudiana, 2008).

Antigen yang ditangkap APC jika tergolong eksogenus akan dipresentasikan ke permukaan bersama MHC kelas-II yang selanjutnya akan dikenali oleh limfosit Th (*lymphocyte T-helper*). Selanjutnya APC mensekresi sitokin IL-1 (*interleukin-1*) dan IL-2 (*interleukin-2*). Kedua sitokin menginduksi Th sehingga berproliferasi dan diferensiasi menjadi Th-1 dan Th-2. Berikutnya, sitokin IL-1 menginduksi Th-1 sehingga menjadi aktif dan melepaskan beberapa sitokin seperti IFN- $\gamma$  (*interferon gama*), TGF- $\beta$  (*transforming growth faktor beta*) dan IL-2. IFN- $\gamma$  dan TGF- $\beta$  berperan untuk memicu APC sehingga lebih aktif dan tanggap terhadap benda asing dalam tubuh. IL-2 dan IFN- $\gamma$  juga menginduksi Th-2 sehingga mensekresi sitokin IL-4, IL-5, IL-6 dan IL-10. IL-4, IL-5, IL-6 juga dapat mensekresi antibodi ( *$\gamma$ -globulin/immunoglobulin*) dan sel memori. IL-6 juga dapat langsung menginduksi sel plasma sehingga lebih aktif mensekresikan antibodi. IL-2 dan IFN- $\gamma$  yang dihasilkan Th-1 juga memicu aktifitas sel NK (*Natural Killer cell*), dimana sel NK yang aktif berperan membunuh sel-sel yang terinfeksi virus maupun sel tumor (sel abnormal) melalui jalur FADD yang diaktivasi oleh ikatan ligan di permukaan sel NK dengan fas di permukaan sel tumor atau sel yang terinfeksi virus (Sudiana, 2008).

Antigen yang ditangkap apabila tergolong endogenus APC akan mempresentasikan ke permukaan bersama MHC kelas-I yang akan dikenali oleh CTL (*Cytotoxic T-Lymphocyte*). CTL akan teraktivasi dan berperan dalam penghancuran sel-sel yang terinfeksi virus maupun sel tumor melalui jalur FADD, seperti yang dilakukan sel NK (Sudiana, 2008). Dapat dilihat pada gambar 2.1.



Sumber : Buku Patobiologi Molekular Kanker 2008

Gambar 2.1. Mekanisme Respon Imun Tubuh terhadap Sel Kanker

Pertumbuhan dan perkembangan sel kanker dalam tubuh telah melalui beberapa seleksi, antara lain melalui NER, aktivitas p-53, dan ketahanan imunologik. Apabila mekanisme tubuh ini tidak mampu mengendalikan perilaku sel abnormal, maka sel tersebut akan mengalami proliferasi yang berlebihan dan berkembang menjadi sel ganas/kanker (Sudiana, 2008).

### 2.3 Antioksidan

Secara fisiologis, tubuh manusia mempunyai beberapa macam enzim dan senyawa non enzim tertentu yang berfungsi sebagai antioksidan. Antioksidan merupakan molekul yang dapat mengendalikan reaksi berantai radikal bebas dalam tubuh. Antioksidan biologis dapat dibagi berdasarkan proses enzimatik dan non enzimatik. Antioksidan endogen terdiri atas enzim-enzim yang disintesis oleh tubuh seperti superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathion peroksidase.

Sedangkan antioksidan eksogen yang berasal dari luar tubuh termasuk antioksidan non-enzimatik, terbagi atas antioksidan larut lemak ( $\alpha$ -tokoferol, karotenoid, quinon dan bilirubin) dan antioksidan larut air (asam askorbat, asam urat, protein pengikat logam, protein pengikat heme) (Halliwell et.al., 1999).

Antioksidan enzimatis yang bekerja intraseluler sebagian besar terdapat dalam mitokondria dan sitoplasma sel. Menurut konsep radikal bebas, kerusakan sel akibat molekul radikal baru dapat terjadi apabila kemampuan mekanisme pertahanan tubuh sudah dilampaui atau menurun (Gitawati, 1995).

#### 2.4 Tempe

Komposisi gizi tempe baik kadar protein, lemak, dan karbohidratnya tidak banyak berubah dibandingkan dengan kedelai. Karena adanya enzim pencernaan yang dihasilkan oleh kapang tempe, maka protein, lemak, dan karbohidrat pada tempe menjadi lebih mudah dicerna di dalam tubuh dibandingkan yang terdapat dalam kedelai. Di dalam tempe juga ditemukan suatu zat antioksidan dalam bentuk isoflavon. Seperti halnya vitamin C, E, dan karotenoid, isoflavon juga merupakan antioksidan yang sangat dibutuhkan tubuh untuk menghentikan reaksi pembentukan radikal bebas. Tempe dapat berperan dalam sistem pertahanan tubuh yang berguna untuk menangkal kerusakan sel tubuh yang disebabkan oleh radikal bebas dari konsumsi makanan yang dapat menimbulkan kanker. Pada tempe di samping ketiga jenis isoflavon yang terdapat pada kedelai yaitu daidzein, glisitein, dan genistein juga terdapat antioksidan faktor II (6,7,4-trihidroksi isoflavon) yang mempunyai sifat antioksidan paling kuat dibandingkan dengan isoflavon dalam kedelai. Antioksidan ini disintesis pada saat terjadinya proses fermentasi kedelai menjadi tempe oleh bakteri *Micrococcus luteus* dan *Coreyne bacterium*. Kedelai yang di buat tempe mempunyai kandungan genestein, suatu anti oksidan flavonoid paling tinggi di banding produk olahan lainnya seperti tahu. Antioksidan flavonoid berfungsi sebagai anti tumor atau anti kanker (Atun, 2009).

Para ahli berupaya untuk meningkatkan kandungan isoflavon dari kedelai melalui teknik fermentasi. Penelitian yang dilakukan oleh Ralston (2005) menunjukkan bahwa enzim-enzim yang dihasilkan oleh bakteri *Rhizopus oligosporus* yang terdapat dalam ragi tempe dapat mengubah senyawa flavanon menjadi isoflavon selama proses fermentasi. Proses fermentasi juga dapat menghidrolisis senyawa-senyawa flavon glikosida menjadi aglikonnya, yang menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi. (Atun, 2009).

Selain sebagai sumber antioksidan yang mengandung isoflavon aglikon sebagai pencegah kanker, tempe juga dapat menjadi salah satu sumber antibiotik, zat anti bakteri yang memperkecil peluang infeksi. Penelitian yang dilakukan di Universitas North Carolina, Amerika Serikat, menemukan bahwa genistein dan fitoestrogen yang terdapat pada tempe ternyata dapat mencegah kanker prostat dan payudara.

Hasil penelitian Afandy dan Suhartono (2007) dalam proses kromatografi menunjukkan kandungan isoflavon jenis daidzein sebesar 0.129 mg/ml atau setara dengan 28.67 mg/100 g berat kering pada sampel kedelai dan 0.221 mg/ml atau setara dengan 49.11 mg/100 g berat kering pada sampel tempe. Potensi antioksidan yang dimiliki isoflavon kedelai dan tempe diuji dengan menggunakan metode kandungan total fenol dan aktivitas antioksidan. Kandungan total fenol yang ada dalam ekstrak isoflavon kedelai adalah sebesar 61.01 ppm atau setara dengan 13.56 mg/100 g berat kering, sedangkan pada ekstrak isoflavon tempe terdapat kandungan total fenol sebesar 69.23 ppm atau setara dengan 15.39 mg/100 g berat kering. Pengujian aktivitas antioksidan pada kedua jenis isoflavon menghasilkan aktivitas antioksidan sebesar 61.32% pada isoflavon kedelai dan 66.92% pada isoflavon tempe. Sehingga kandungan isoflavon dan aktifitas antioksidan lebih besar terdapat dalam tempe dibandingkan pada kedelai.

## A. Kandungan Tempe

Tabel 2.1 Komposisi Gizi Tempe per 100 gram :

Water	55.3 g	Isoflavones	49.11 mg
Energy	201 kcal	Calcium, Ca	155 mg
Energy	833 kJ	Iron, Fe	4 mg
Protein	20.8 g	Magnesium, Mg	70.0 mg
Fat	8.8 g	Phosphorus, P	206 mg
Sat. fatty acids	1.11 g	Potassium, K	367 mg
Mono-unsat.fatty acids	1.7 g	Sodium, Na	6.0 mg
Poly-unsat.fatty acids	4.3 g	Zinc, Zn	1.81 mg
Carbohydrates	17.0 g	Copper, Cu	0.67 mg
Fiber	4.8 g	Manganese, Mn	1.43 mg
Ash	1.4 g	Panhotenic acid (B5)	0.355 mg
Selenium, Se	8.8 µg	Vitamin B6	0.299 mg
Vitamin C	0.0 mg	Folic acid	52.0 µg
Niacin (B3)	4.63 mg	Thiamine (B1)	0.19 mg
Vitamin B12	1.0 µg	Riboflavin (B2)	0.111 mg
Vitamin A	69 µg		

Sumber : Afandy dan Suhartono (2007) dan buku bunga rampai tempe Indonesia

Selama proses fermentasi tempe terbentuk senyawa antioksidan faktor II (6,7,4' trihidroksi isoflavon) (Georgry, 1964). Tikus yang diberi tempe menunjukkan prosentase penghambatan oleh enzim superoksida dismutase yang paling tinggi sebesar 26,99% dibandingkan dengan kedelai (21,21%) dan kasein (20,07%). Enzim superoksida dismutase mempunyai substrat yang spesifik yaitu ion superoksida.



Apabila enzim superoksida dismutase kurang aktif maka radikal bebas superoksida akan membentuk radikal peroksil yang bersifat reaktif dan selanjutnya akan terjadi kerusakan asam lemak tidak jenuh dengan menghasilkan senyawa aldehyd yang beracun (Astuti, 1996).

Tempe mengandung alfa dan gama tokoferol dalam konsentrasi cukup tinggi

selain mineral mikro dan antioksidan. Menurut Jung (1991) alfa dan gama tokoferol merupakan antioksidan yang potensial untuk mencegah oksidasi lemak yang terjadi dalam minyak kedelai. Alfa tokoferol merupakan antioksidan pemutus rantai yang bersifat lipofilik dan dapat bereaksi dengan radikal peroksida lemak sehingga terjadi hambatan oksidasi asam lemak tidak jenuh terutama asam arakhidonat.

Dalam penelitian Astuti (1996) aktivitas enzim superoksida dismutase terdapat dalam tempe sedangkan tidak ditemukan dalam kedelai. Sehingga memberi harapan dalam mencegah penyakit degeneratif salah satunya kanker yang berkaitan dengan proses oksidasi dan menghasilkan radikal bebas.

### **B. Tempe Meningkatkan Sistem Imun**

Ada tiga kemungkinan komponen tempe mampu meningkatkan sistem imun di dalam tubuh, pada makrofag khususnya (Nurrahman, 2015). Makrofag adalah sel fagosit mononuklear yang utama dalam jaringan yang berperan dalam proses fagositosis mikroorganisme atau molekul kompleks asing (Paul, 2005).

1. Komponen tempe diantaranya vitamin E,  $\beta$ -karoten, asam folat, piridoksin, riboflavin dan vitamin B12 (Maggini, 2007) dan beberapa asam amino seperti lisin, metionin, tryptofan, treonin dan leusin (Karmini, 1996 dan Nurrahman, 2012) meningkatkan kinerja sel imun. Peningkatan respon imun tersebut ditentukan secara genetik dan dipengaruhi lingkungan terutama makanan yang mengandung gizi tertentu. Protein yang utama dari lima jenis asam amino esensial yaitu lysine, methionin, tryptophan, threonine dan leusin merupakan asam amino penting untuk produksi makrofag, kecuali methionin (asam amino pembatas) yang mana tempe dalam bentuk bebas. Vitamin A, asam panthotenat, piridoksin, riboflavin, vitamin B12 dan asam folat mempengaruhi pembentukan dan kualitas antibodi selain asam amino (Karmani, 1996). Komponen tersebut terdapat dalam jumlah besar dalam tempe kecuali vitamin A yang tidak terkandung dalam tempe (Nurrahman, 2015).
2. Komponen fitokimia pada tempe berinteraksi dengan reseptor pada permukaan sel imun yang kemudian meningkatkan aktivitas enzim protein

tirosin kinase (PTK) dan DNA *polymerase*. Peningkatan aktivitas kedua enzim ini mendorong sel imun untuk berproliferasi lebih tinggi (Tejasari, 2007). Genestein adalah salah satu isoflavon yang terdapat di kedelai dan produk dari kedelai yang mampu berikatan dengan reseptor ekstrogen menurut Dixon (2002). Zhao (2005) menyatakan pula isoflavon menunjukkan efek estrogenitas yang dapat berikatan dengan reseptor ekstrogen dan menginduksi produk spesifik (limfokin) dari gen yang merespon estrogen.

3. Komponen Zn, Cu dan Fe dalam tempe dapat meningkatkan aktivitas enzim antioksidan, sehingga kemampuan menghambat reaksi oksidasi juga meningkat dan *performance* sel tubuh diantaranya makrofag meningkat (Ramprasath, 2005 dan Rimbach, 2008). Dilaporkan dalam penelitian Nurrahman (2012) bahwa tikus yang mengkonsumsi tempe kedelai hitam menunjukkan adanya peningkatan aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) dan daya tahan limfosit terhadap hydrogen peroksida. Pada orang yang mengkonsumsi tempe kedelai hitam selama satu bulan meningkatkan daya tahan limfosit terhadap hydrogen peroksida (Nurrahman, 2003). Sehingga dimungkinkan keadaan yang sama dari kedua penelitian Nurrahman tersebut bahwa tempe kedelai juga mempunyai manfaat yang tidak jauh berbeda dari tempe kedelai hitam.

## 2.5 Isoflavon

Zat-zat gizi dalam tubuh yang berasal dari makanan merupakan suatu komponen yang sangat mempengaruhi sistem pertahanan tubuh untuk melawan radikal bebas. Upaya mempertinggi status antioksidan dalam tubuh dapat dilakukan dengan mengkonsumsi bahan pangan yang mengandung zat-zat gizi antioksidan maupun antioksidan non gizi (komponen bioaktif), hal tersebut dilakukan agar kadar antioksidan endogen dalam tubuh dipertahankan tetap tinggi sehingga status antioksidan tubuh menjadi tinggi.

Sumber antioksidan terdapat dalam dua kelompok, yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetik. Antioksidan alami adalah antioksidan hasil ekstraksi bahan alami atau yang terkandung dalam bahan alami sedangkan antioksidan sintetik adalah antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia.

Antioksidan alami berasal dari senyawa fenolik seperti golongan flavonoid (Astuti, 2008). Flavonoid yaitu suatu golongan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman.

Kedelai termasuk kelompok flavonoid, merupakan salah satu bahan pangan penghasil antioksidan alami. Salah satu komponen penting/senyawa bioaktif yang terdapat dalam kedelai dan bertindak sebagai antioksidan adalah isoflavon (Astuti 2008). Beberapa bahan pangan yang telah dianalisis, kedelai diketahui menempati urutan pertama mengandung senyawa isoflavon dan derivatnya. Isoflavon dan derivatnya merupakan senyawa yang diketahui berfungsi sebagai antioksidan, antitumor, antiosteroklerosis (Yuan, 2008). Salah satu upaya masyarakat untuk menekan tingginya prevalensi penyakit degeneratif dimana salah satunya kanker yaitu dengan meningkatkan konsumsi bahan pangan kaya antioksidan.

Kedelai merupakan sumber antioksidan isoflavon yang dapat dijadikan salah satu alternatif pemenuhan sumber antioksidan. Hal ini disebabkan karena kedelai mudah diperoleh dalam makanan sehari-hari dan merupakan komoditas yang populer di masyarakat. Berbagai produk olahan kedelai banyak dimanfaatkan masyarakat sebagai salah satu bahan makanan untuk mencukupi kebutuhan gizi.

Cassidy *et al.* (1994) menyatakan bahwa isoflavon sebesar 50 mg per hari sudah cukup untuk memperoleh pengaruh klinis/biologis dalam tubuh. Sedangkan *Indiana Soybean Board* (1998) menyarankan konsumsi isoflavon per hari sebesar 30-40 mg.

Isoflavon termasuk dalam golongan flavonoid yang merupakan senyawa polifenolik. Struktur kimia dasar dari isoflavon hampir sama seperti flavon, yaitu terdiri dari 2 cincin benzen (A dan B) dan terikat pada cincin C piran heterosiklik, tetapi orientasi cincin B nya berbeda. Pada flavon, cincin B diikat oleh karbon nomor 2 cincin tengah C, sedangkan isoflavon diikat oleh karbon nomor 3 (Schmidl dan Labuza, 2000).

Pada umumnya, senyawa isoflavon banyak ditemukan pada tanaman kacang kacangan atau *leguminosa* (Zubik dan Meydani, 2003). Isoflavon pada kedelai terdapat dalam empat bentuk, yaitu (1) bentuk aglikon (non gula) : genistein, daidzein, dan glycitein; (2) bentuk glikosida : daidzin, genistin dan glisitin; (3)

bentuk asetilglukosida : 6''-O-asetil daidzin, 6''-O-asetil genistin, 6''-O-asetil glisitin; dan (4) bentuk malonilglukosida : 6''-O-malonil daidzin, 6''-O-malonil genistin, 6''-O-malonil glisitin.

Isoflavon utama pada kedelai dan olahannya terdiri dari genistin (4',5',7-trihydroxyisoflavone) dan daidzein (4',7-dihydroxyisoflavone), serta turunan  $\beta$ -glukosida, gensitin dan daidzin. Ditemukan juga sejumlah kecil senyawa isoflavon lainnya seperti glycitein (7,4'-dihydroxy-6-methoxy-isoflavone) dan glukosidanya (Wang dan Murphy, 1994). Secara alami, isoflavon pada kedelai hampir seluruhnya terdapat dalam bentuk  $\beta$ -glukosida (glukosida). Bentuk glukosida dipertahankan oleh tanaman sebagai bentuk inaktif sehingga dibutuhkan sebagai antioksidan.

Ketika produk kedelai dikonsumsi, bentuk glukosida isoflavon didegradasi menjadi senyawa aglikon dalam bentuk bebas yang dihasilkan oleh pelepasan glukosa dari glukosida. Komposisi isoflavon dalam bentuk glukosida biasanya terdapat pada kedelai dan makanan olahan kedelai yang tidak difermentasi seperti susu kedelai, tofu, tepung kedelai, konsentrat protein kedelai dan isolat protein kedelai. Pada makanan olahan kedelai yang mengalami proses fermentasi seperti miso dan tempe, isoflavon dalam bentuk bebas (aglikon) lebih dominan (Coward *et al.*, 1998).

Hasil penelitian menunjukkan kedelai yang difermentasi jamur *Rhizopus oligosporus*, seperti tempe menunjukkan kandungan isoflavon dan derivatnya yang lebih tinggi dari pada dalam biji kedelai (Ralston L, 2005). Kandungan isoflavon yang lebih tinggi tersebut diakibatkan oleh reaksi metabolisme secara anaerob jamur *Rhizopus oligosporus* yang dapat mengubah senyawa flavonoid menjadi isoflavonoid.

Isoflavon dalam bentuk aglikon lebih mudah diserap oleh usus halus sebagai bagian dari misel yang dibentuk oleh empedu. Sirkulasi isoflavon dalam darah bersifat kompleks, karena sebagian larut lemak dan sebagian berikatan dengan protein dengan kekuatan yang lemah. Isoflavon kemungkinan didistribusikan melalui darah ke hati, atau didaur ulang sebagai bagian dari cairan empedu dan

sirkulasi enterohepatik. Ekskresi akhir isoflavon terjadi pada feses dan urin (Schmidl dan Labuza, 2000).

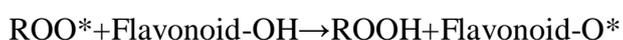
#### **A. Mekanisme Isoflavon sebagai Penangkap (*Scavenger*) Radikal Bebas sehingga mencegah kanker**

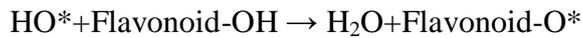
Sebagai salah satu golongan flavonoid, senyawa bioaktif isoflavon yang mengandung gugus fenolik telah dilaporkan mempunyai kemampuan sebagai antioksidan dan mencegah terjadinya kerusakan akibat radikal bebas melalui dua mekanisme, yaitu : mendonorkan ion hidrogen (Saija, 1995; Arora, 1998), dan bertindak sebagai *scavenger* radikal bebas secara langsung (Arora, 1998; Nijveldt, 2001).

Struktur *meta* 5,7-dihidroksil pada cincin A menunjukkan kemampuan isoflavon untuk berperan sebagai donor ion hidrogen sehingga terbentuk senyawa yang lebih stabil dan terbentuk radikal fenoksil yang kurang reaktif (Oteiza *et al.*, 2005), sedangkan gugus 4'-hidroksil pada cincin B senyawa isoflavon berperan sebagai *scavenger* senyawa ROS (Pokorny *et al.*, 2001). Konfigurasi grup hidroksil pada cincin B senyawa flavonoid telah dilaporkan berperan sebagai *scavenger* senyawa ROS (Heim *et al.*, 2002). Diketahui lebih lanjut bahwa grup hidroksil pada cincin B dapat mendonorkan ion hidrogen dengan mendonorkan sebuah elektron ke radikal hidroksil dan peroksil; menstabilkan kedua radikal tersebut, serta membentuk radikal flavonoid yang relatif lebih stabil.

Flavonoid efektif sebagai *scavenger* radikal hidroksil dan radikal peroksil (Lee *et al.*, 2004). Flavonoid (*flavonoid-OH*) dilaporkan dapat beraksi sebagai *scavenger* radikal peroksil ( $\text{ROO}^*$ ) yang akan diregenerasi menjadi  $\text{ROOH}$ , dan bertindak sebagai *scavenger* radikal hidroksil ( $\text{OH}^*$ ) yang akan diregenerasi menjadi  $\text{H}_2\text{O}$ . Senyawa hasil regenerasi radikal peroksil dan radikal hidroksil bersifat lebih stabil, sedangkan radikal fenoksil yang terbentuk (*flavonoid-O\**) menjadi bersifat kurang reaktif untuk melakukan reaksi propagasi (Arora *et al.*, 1998).

Senyawa radikal fenoksil menjadi inaktif akibat tingginya reaktivitas grup hidroksil senyawa flavonoid yang terjadi melalui reaksi (Nijveldt, 2001):





Suatu senyawa dapat bertindak sebagai antioksidan dan mencegah oksidasi lipid apabila potensial reduksi standar 1- elektron lebih rendah dari 600 mV (lebih rendah dari potensial reduksi PUFA). Flavonoid (isoflavon termasuk salah satu golongan flavonoid) memiliki potensial reduksi 530 mV (Buettner, 1993). Jadi berdasarkan data potensial reduksi tersebut isoflavon berperan sebagai antioksidan primer dengan mendonasikan atom hidrogen secara cepat pada radikal lipid. Isoflavon bekerja dengan memberikan satu atom hidrogen kepada radikal peroksil, sebelum PUFA memberikannya. Senyawa yang terbentuk sebagai hasil regenerasi radikal peroksil bersifat lebih stabil.

Proses pembentukan penyakit kanker dapat dibagi dalam 2 (dua) fase, yaitu fase inisiasi dan fase promosi. Senyawa flavonoida terbukti menghambat aktivitas senyawa promotor terbentuknya tumor, sehingga disebut sebagai anti tumor. Dari sejumlah senyawa flavonoida dan isoflavonoida, yang banyak disebut-sebut berpotensi sebagai antitumor/antikanker adalah genestein yang merupakan isoflavon aglikon. Potensi tersebut antara lain menghambat perkembangan sel kanker payudara (Lamastimere, 1996) dan sel kanker hati (Hendrich, 1996). Penghambatan sel kanker oleh senyawa flavon/isoflavon ini terjadi khususnya pada fase promosi (Fujiki dkk., 1986). Genestein yang merupakan salah satu komponen isoflavon tersebut juga terdapat pada kedelai dan tempe.

Penghambatan sel kanker oleh genestein ini diterangkan oleh Peterson dkk., (1997) melalui mekanisme sebagai berikut: Penghambatan pembelahan/proliferasi sel (baik sel normal, sel yang terinduksi oleh faktor pertumbuhan sitokinin, maupun sel kanker payudara yang terinduksi dengan nonil-fenol atau bi-fenol A) yang diakibatkan oleh penghambatan pembentukan membran sel, khususnya penghambatan pembentukan protein yang mengandung tirosin. Selanjutnya penghambatan aktivitas enzim DNA isomerase II. Lalu penghambatan regulasi siklus sel. Sifat antioksidan dan anti-angiogenik yang disebabkan oleh sifat reaktif terhadap senyawa radikal bebas. Sifat mutagenik pada gen endoglin (gen transforman faktor pertumbuhan beta atau TGF $\beta$ ). Mekanisme ini dapat berlangsung apabila konsentrasi genestein lebih besar dari 5  $\mu\text{M}$ .

## 2.6 Leukosit (Sel Darah Putih)

Leukosit berfungsi sebagai alat pertahanan tubuh terhadap masuknya benda asing. Mekanisme fagositosis dan pembentukan imunoglobulin juga diperankan oleh leukosit (Marsh dan Boggs, 1995). Jumlah leukosit yang menyimpang dari keadaan normal mempunyai arti klinik penting untuk evaluasi proses penyakit.

Leukosit sebagian dibentuk pada sumsum tulang (granulosit, monosit dan sedikit limfosit) dan sebagian lagi di jaringan limfe (limfosit dan sel-sel plasma). Setelah dibentuk sel-sel ini diangkut dalam darah menuju berbagai bagian tubuh untuk digunakan. Kebanyakan sel darah putih ditranspor secara khusus ke daerah yang terinfeksi dan mengalami peradangan serius (Guyton, 1983). Leukosit mempunyai peranan dalam pertahanan seluler dan humoral organisme terhadap zat-zat asing. Granulosit dan monosit melindungi tubuh terhadap organisme penyerang terutama dengan cara mencernanya yaitu melalui fagositosis. Fungsi pertama sel limfosit dan sel-sel plasma berhubungan dengan sistem imun (Mayer, 2008).

Terdapat enam macam sel darah putih yang ditemukan dalam darah yaitu netrofil polimorfonuklir, eosinofil polimorfonuklir, basofil polimorfonuklir, monosit, limfosit dan kadang-kadang sel plasma (Guyton, 1983). Sel neutrofil berperan dalam pertahanan awal terhadap infeksi bakteri (Baratawidjaja, 2004). Sel eosinofil merespon terhadap penyakit alergi dan parasitik (Hoffbrand, 2006 dalam Saputri). Sel basofil mempunyai peran dalam merespon peradangan, sedangkan limfosit berperan menanggapi adanya antigen atau zat asing dengan membentuk antibodi dalam sistem kekebalan seluler atau yang bersirkulasi dalam darah (Frandsen, 1996). Sel monosit berfungsi sebagai fagosit terhadap zat asing di dalam pembuluh darah, setelah masuk ke jaringan sel monosit mengalami proses pematangan menjadi makrofag yang berperan membersihkan tubuh dari sel mati atau debris lainnya (Mayer, 2008).

Pada manusia dewasa dapat dijumpai sekitar 7000 sel darah putih per mikroliter darah. Persentase normal dari sel darah putih yaitu netrofil polimorfonuklir 62%, eosinofil polimorfonuklir 2,3%, basofil polimorfonuklir 0,4%, monosit 5,3%, dan limfosit 30%. (Guyton, 1983).

### A. Leukosit Tikus

Jumlah seluruh leukosit jauh di bawah eritrosit, dan bervariasi tergantung jenis hewannya. Masa hidup sel darah putih pada hewan domestik sangat bervariasi mulai dari beberapa jam untuk granulosit, bulanan untuk monosit bahkan tahunan untuk limfosit (Frandsen, 1992).

Pada mencit (*Mus musculus*) yang mengalami kanker terjadi peningkatan jumlah leukosit total dan pada diferensial leukosit akan menunjukkan peningkatan persentase limfosit, monosit (makrofag) (Mayer, 2008 dalam Saputri).

Tabel 2.2 Data Sel Darah Putih Tikus Betina Umur 17 Minggu dan >17 Minggu

*Hematology data : Rats 17 weeks of old-Females*

Test	Unit	N	Mean	S.D.	Range
White Blood Cells	10 <sup>3</sup> /μL	165	4.28	2.14	1.98-11.06
Neutrofiles	10 <sup>3</sup> /μL	165	0.87	0.42	0.33-1.89
Lymphocytes	10 <sup>3</sup> /μL	165	3.19	1.89	1.19-9.45
Monocytes	10 <sup>3</sup> /μL	167	0.09	0.06	0.03-0.27
Eusino-fils	10 <sup>3</sup> /μL	166	0.07	0.04	0.01-0.19
Basofils	10 <sup>3</sup> /μL	166	0.01	0.01	0-0.04
% Neutrofiles	%	167	22.2	10	9-49.3
% Lymphocytes	%	167	73.3	10.6	44.7-87.1
% Monocytes	%	166	2	0.7	1-3.6
% Eusino-fils	%	166	1.7	0.9	0.4-4
% Basofils	%	167	0.3	0.2	0-0.6

Sumber: Giknis, et.al from E-Book Clinical Laboratory Parameters for Crl:WI(Han).2008

### 2.7 DMBA (7.12-Dimetylbenz (α) Antrasen)

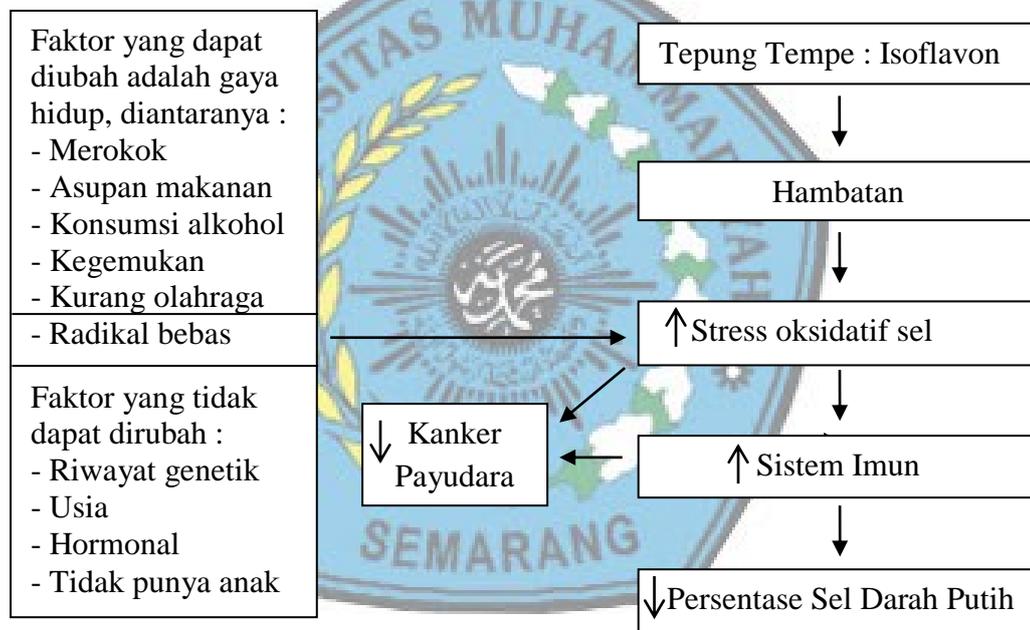
Pada penelitian dilakukan induksi DMBA (7.12-Dimetylbenz (α) Antrasena) yaitu bahan karsinogenik dari kelas senyawa hidrokarbon poliaromatik (PAH), yang telah banyak digunakan untuk menginduksi pertumbuhan kanker payudara pada tikus. Kerentanan kelenjar susu zat karsinogenik tergantung pada usia hewan, sekitar usia 40-60 hari setelah kelahiran. Masuk pada usia pubertas tikus

sebelumnya dengan tingkat proliferasi terminal tunas akhir (Tebis) tinggi pada kelenjar susu (Kubatkaet, 2002).

Menurut Kubatkaet (2002) DMBA dipilih sebagai bahan karsinogen karena :

1. Senyawa ini dengan cepat dimetabolisme menjadi karsinogen reaktif untuk membentuk DNA *adduct*.
2. Berbagai penelitian telah menunjukkan tingkat keberhasilan yang tinggi dalam mengembangkan karsinogenesis menggunakan senyawa ini.
3. Reseptor senyawa DMBA adalah *arylhydrocarbon* (AHR) yang sebagian besar terkandung dalam kelenjar reproduksi, khususnya kelenjar susu.

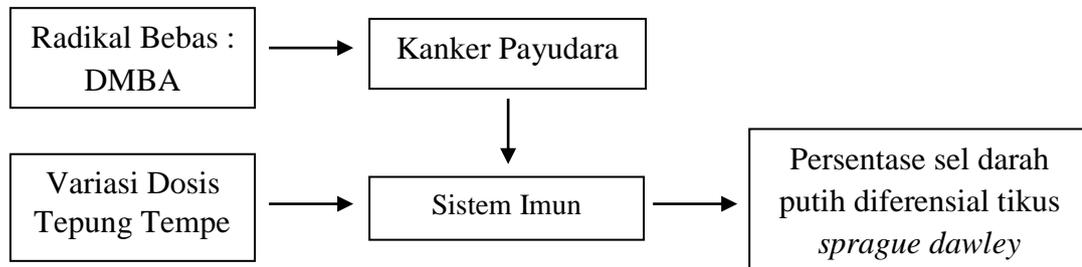
## 2.8 Kerangka Teori



Gambar 2.2 Kerangka Teori

## 2.9 Kerangka konsep

Kerangka konsep dalam penelitian ini disusun berdasarkan uraian pada kerangka teori, penelitian ini mengamati variabel-variabel yang terdiri dari variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu variasi dosis campuran tepung tempe dengan pakan dan variabel terikatnya yaitu persentase sel darah putih diferensial limfosit dan monosit tikus post perlakuan. Penetapan dosis tepung tempe yang dicampur pada pakan yaitu 0%, 1%, 10%, 50%, dan 75%.



Gambar 2.3 Kerangka Konsep

## 2.10 Hipotesis

### A. Hipotesis mayor

Variasi dosis campuran tepung tempe dengan pakan dapat menurunkan persentase sel darah putih pada tikus *sprague dawley* betina yang diinduksi DMBA sebagai karsinogenik kanker payudara.

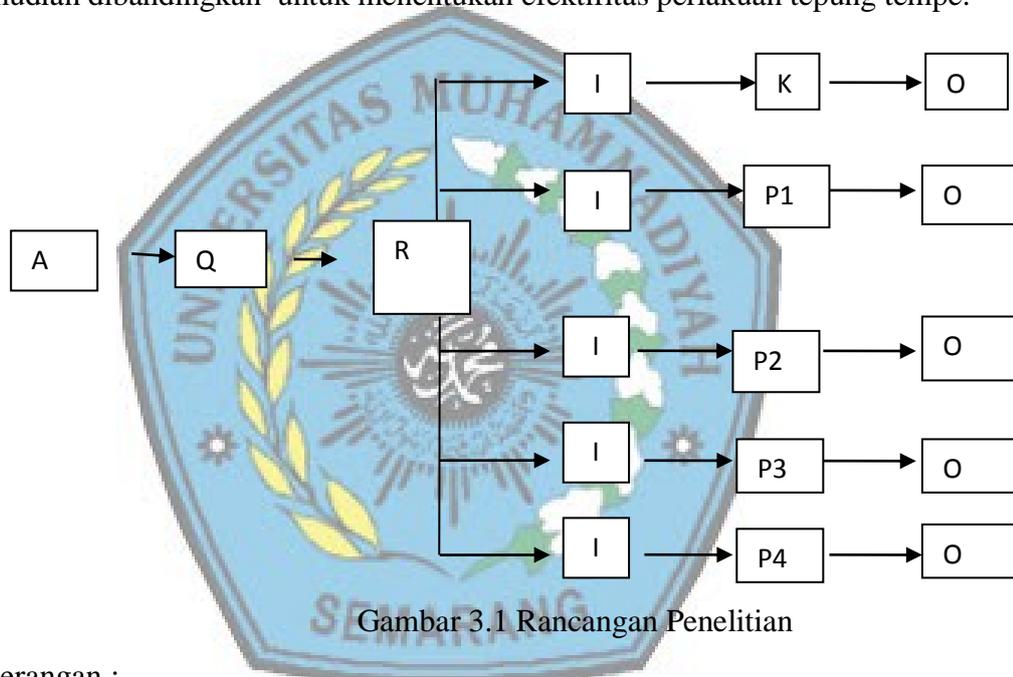
### B. Hipotesis minor

Campuran tepung tempe pada pakan dengan variasi dosis 0%, 1%, 10%, 50%, dan 75% pada tikus putih *sprague dawley* betina yang diinduksi DMBA sebagai karsinogenik kanker payudara dapat menurunkan persentase sel darah putih.

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Desain dan Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah penelitian *true experimental* dengan rancangan *post test only-randomized, control group trial*. Subyek penelitian diambil secara acak ke dalam kelompok-kelompok sebagai variabel independen dan dilihat secara *post test only*. Nilai *Post-test* untuk masing-masing kelompok kemudian dibandingkan untuk menentukan efektifitas perlakuan tepung tempe.



Gambar 3.1 Rancangan Penelitian

Keterangan :

- A = Inklusi populasi sampel –pakan standart sebagai tahap adaptasi selama 14 hari
- Q = Pemberian pakan tempe sesuai konsentrasi campuran
- R = Randomisasi
- I = Induksi DMBA pada tikus pada usia tikus 49 hari secara berkala seminggu dua kali
- K = Tikus putih yang diberi pakan standar AIN-93M modifikasi sebanyak 20gram/ hari tanpa campuran tepung tempe sebagai kontrol.
- P1 = Tikus putih yang diberi campuran 1% tepung tempe pada pakan AIN-93M modifikasi sebagai perlakuan 1
- P2 = Tikus putih yang diberi campuran 10% tepung tempe pada pakan AIN-93M modifikasi sebagai perlakuan 2
- P3 = Tikus putih yang diberi campuran 50% tepung tempe pada pakan AIN-93M modifikasi sebagai perlakuan 3
- P4 = Tikus putih yang diberi campuran 75% tepung tempe pada pakan AIN-93M modifikasi sebagai perlakuan 4
- O = Hari ke 137 penelitian tikus dari masing masing kelompok perlakuan diambil darahnya melalui mata untuk diperiksa persentase sel darah putih diferensialnya

### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Pangan dan Gizi PAU Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Pemeriksaan jumlah sel darah putih dilakukan di laboratorium klinis Universitas Muhammadiyah Semarang. Penelitian dilakukan selama 151 hari yang terbagi atas 14 hari masa adaptasi dan 137 hari perlakuan.

### 3.3 Populasi dan Besar Sampel

#### A. Populasi

- Populasi target adalah tikus putih *rattus norvergicus* galur *sprague dawley*
- Populasi terjangkau adalah tikus putih betina *rattus norvergicus sprague dawley* pada usia sekitar 35 hari dan berat badan  $\pm 100-115$  gram per ekor yang aktif bergerak dan sehat tidak dalam kondisi sakit di Laboratorium Pangan dan Gizi PAU, Universitas Gajahmada Yogyakarta.

#### B. Sampel

Sampel yang digunakan diambil secara acak dari populasi terjangkau yaitu tikus putih betina *sprague dawley* berusia 35 hari yang berada di Laboratorium Pangan dan Gizi PAU, Universitas Gajahmada Yogyakarta dengan syarat sesuai kriteria inklusi.

Kriteria inklusi : Sehat dan lincah

Jumlah sampel: Penentuan jumlah sampel dilakukan dengan menggunakan rumus Federer sebagai berikut:

$$BS = (t - 1) (r - 1) \geq 15$$

”t” adalah Jumlah perlakuan

”r” adalah Jumlah hewan coba tiap kelompok perlakuan.

Penelitian dengan 4 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol, sehingga  $t=5$ ,  $(5-1)(r-1) \geq 15$  ---  $r \geq 5$ . Jumlah tikus yang digunakan minimal sebanyak 5 ekor untuk masing-masing kelompok (4 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol). Untuk mengantisipasi kemungkinan terdapat tikus yang mati maka tiap-tiap kelompok diberi cadangan 1 ekor sehingga jumlah tikus pada setiap kelompok 6 ekor, dengan keseluruhan 30 ekor tikus.

Variabel yang diamati dalam sampel adalah persentase sel darah putih diferensial dengan kriteria sampel : sel limfosit dan sel monosit.

### 3.4 Variabel Penelitian

#### Klasifikasi Variabel

1. Variabel bebas : Dosis campuran tepung tempe pada pakan
2. Variabel terikat : Persentase sel darah putih diferensial dalam darah tikus *sprague dawley*
3. Variabel kendali : Jenis tikus, umur tikus SD, berat badan tikus SD, jenis kelamin tikus SD

### 3.5 Definisi Operasional Variabel

1. Dosis tepung tempe adalah dosis tempe murni secara peroral dengan dosis tiap-tiap perlakuan secara bertingkat yaitu campuran 0%, 1%, 10%, 50% dan 75% tepung tempe pada pakan AIN-93M modifikasi.
2. Jumlah sel darah putih adalah jumlah diferensial total komponen sel darah putih dalam ukuran per seratus yang diukur menggunakan metoda apusan darah lalu dibaca pada mikroskop cahaya dan dinyatakan dengan persen jumlah komponen sel darah putih dari jumlah total sel darah putih.

### 3.6 Bahan dan alat

#### A. Bahan Utama

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini tikus putih *rattus novergicus* strain *sprague dawley* yang berjenis kelamin betina, usia 35 hari dan berat badan 100-115 gram yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.

#### B. Pakan

Pakan diberikan sebanyak 20 gram/hari/tikus. Pakan menggunakan AIN-93M modifikasi, yaitu mengganti beberapa bahan dalam AIN-93M dengan tepung tempe pada saat pembuatannya. AIN-93 merupakan salah satu jenis pakan untuk hewan coba yang menggantikan versi sebelumnya yaitu AIN-76A untuk meningkatkan kinerja hewan yang mengkonsumsinya. Diet 1993 memiliki keseimbangan yang lebih baik dari nutrisi daripada diet 1976 dan pilihan yang lebih baik untuk studi dengan tikus laboratorium (Reeves 1997)

AIN 93 terbagi atas dua jenis yaitu AIN-93G yang dikhususkan untuk pertumbuhan, kehamilan dan menyusui, dan AIN-93M yang diformulasikan untuk

pemeliharaan (Reeves 1993). Pada penelitian ini menggunakan pakan AIN-93M karena tikus yang diambil sebagai sampel percobaan perlu *maintenance* atau perbaikan sebagai usaha perbaikan kerusakan sel yang ditimbulkan oleh kanker.

Pembuatan pakan dalam penelitian ini memodifikasi AIN-93 tersebut dengan penambahan tepung tempe sebagai pengganti beberapa bahan yang dihilangkan. Pakan modifikasi tersebut dibuat iso kalori dengan pakan AIN-93 M sehingga jumlah kalori pada pakan modifikasi tersebut sama dengan jumlah kalori pakan AIN-93 M.

Tabel 3.1 Dosis Tepung Tempe pada Pakan

No	Dosis Tepung Tempe	Bahan AIN 93 M yang diganti	Kandungan tepung tempe/ makan
1	0% (kontrol)	40 gr minyak kedelai diganti dengan 40 gr minyak jagung	0 gr
2	1% per 1000 gr pakan = 10 gr	10 gr <i>cornstarch</i>	$\frac{20}{1000} \times 10 = 0,5$ gr
3	10% per 1000 gr pakan = 100 gr	100 gr <i>cornstarch</i>	$\frac{20}{1000} \times 100 = 2$ gr
4	50% per 1000 gr pakan = 500 gr	500 gr <i>cornstarch</i>	$\frac{20}{1000} \times 500 = 10$ gr
5	75 per 1000 gr pakan = 750 gr %	620 gr <i>cornstarch</i> dan 130 gr <i>casein</i>	$\frac{20}{1000} \times 750 = 15$ gr

### C. Peralatan Penelitian

1. Alat untuk mengambil darah : Pipet mikro kapiler.
2. Bahan dan Alat untuk menguji jumlah sel darah putih :

Darah tikus kontrol dan darah tikus hewan perlakuan, gelas benda yang baru dan bebas lemak, fiksatif methanol, pemulas giemsa 3%, aquadest dingin yang sebelumnya telah dididihkan, rak pewarnaan, pipet tetes, mikroskop.

### D. Prosedur Perlakuan

1. Pemeliharaan tikus percobaan

Tikus dipelihara dalam kandang secara individual dalam suatu ruangan yang berventilasi cukup dengan suhu ruangan berkisaran 28-32<sup>0</sup>C, dengan kelembapan 56 ± 5%. Kandang dibersihkan rutin secara berkala 2-3 kali dalam satu minggu.

2. Prosedur

Ransum pakan dibuat dari pakan AIN 93 M dimodifikasi dengan ditambah campuran tepung tempe , diberikan sebanyak 20 gram/hari/tikus dan minuman dilakukan secara *ad libitum* untuk semua tikus dan diberikan setiap hari selama penelitian.

- Kelompok kontrol hanya diberikan pakan AIN 93M modifikasi.
- Kelompok perlakuan I, II, III dan IV berturut-turut diberikan pakan AIN 93M modifikasi ditambah ekstrak tepung tempe, dengan dosis penambahan tepung tempe 1%, 10%, 50% dan 75%.

### 3.7 DMBA

DMBA sebagai karsinogenik pada tikus sebagai penginduksi pertumbuhan kanker pada payudara tikus. Induksi DMBA dilakukan dua kali dalam satu minggu secara terus menerus hingga penelitian selesai. Diperlakukan pemberian dengan 20 mg / kg BB DMBA. Pemberian DMBA melalui oral pada tikus *sprague dawley* betina. Pemberian pertama kali pada tikus setelah aklimatisasi selama 14 hari yaitu saat tikus berumur sekitar 49 hari.

### 3.8 Prosedur Pengumpulan Data

#### 1. Aklimatisasi

Sebanyak tiga puluh ekor tikus putih *sprague dawley* umur sekitar 35 hari dengan berat  $\pm$  100 gram diaklimatisasi di laboratorium selama 14 hari. Hal ini diharapkan terjadi penyesuaian hewan coba terhadap kondisi lingkungan yang ada sehingga tidak terjadi kematian.

#### 2. Jumlah pakan tikus

Pemberian pakan sekali dalam sehari dan dicek apabila dalam sehari terdapat sisa pakan maka akan dicatat agar dapat mengetahui seberapa banyak pakan yang dikonsumsi tikus.

#### 3. Persentase sel darah putih diferensial

Jumlah sel darah putih tikus diukur pada hari ke 151 setelah dilakukan awal aklimatisasi atau hari ke 137 setelah perlakuan injeksi DMBA, dan hari ke 137 setelah pemberian perlakuan campuran pakan dengan tepung tempe.

Sampel darah tikus diambil dari mata menggunakan pipet kapiler, darah yang keluar ditampung menggunakan mikrotube 1,5 ml. Sampel darah yang diperoleh

kemudian ditetaskan pada *object glass* untuk dibuat apusan darah dan dilakukan pengecatan untuk selanjutnya dilakukan tahap penghitungan jumlah leukosit diferensial.

#### **4. Penghitungan leukosit diferensial**

Penghitungan leukosit diferensial dilakukan dengan metode *smear* atau dengan membuat preparat apus darah. Pembuatan preparat apus darah dimulai dengan meneteskan sampel darah pada ujung gelas benda. Kemudian dengan menggunakan ujung gelas benda yang lain, disentuh pada tetesan darah tersebut dan gelas benda digeser atau ditarik dengan sudut  $45^\circ$ . Sediaan dibiarkan beberapa saat hingga mengering dengan cara dikering-anginkan. Sediaan difiksasi selama 5 menit dengan methanol dengan cara ditetaskan di atas permukaan sediaan yang telah diletakkan di atas rak pewarna. Pemulas Giemsa ditetaskan di atas sediaan hingga apusan tertutup seluruhnya oleh pemulas, biarkan selama 30 menit. Sediaan dicuci dengan aquades dan biarkan mengering dalam suhu ruangan. Terakhir dilakukan pengamatan dibawah mikroskop terhadap jumlah jenis neutrofil yang ditemukan pada setiap bidang pandang (Suntoro, 1983). Penghitungan jumlah leukosit diferensial dilakukan hingga jumlah total leukosit mencapai 100 sel. Masing-masing jenis leukosit dihitung persentasenya dari 100 leukosit yang ditemukan pada setiap sediaan (Fox, 1990).

#### **3.9 Analisis Data**

Data yang terkumpul dikelompokkan berdasarkan perlakuan, diberi kode dan dimasukkan dalam file komputer. Dalam penelitian ini seluruh data hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan program *SPSS for windows* Versi 16.0 Data dianalisis secara statistik dengan proses sebagai berikut:

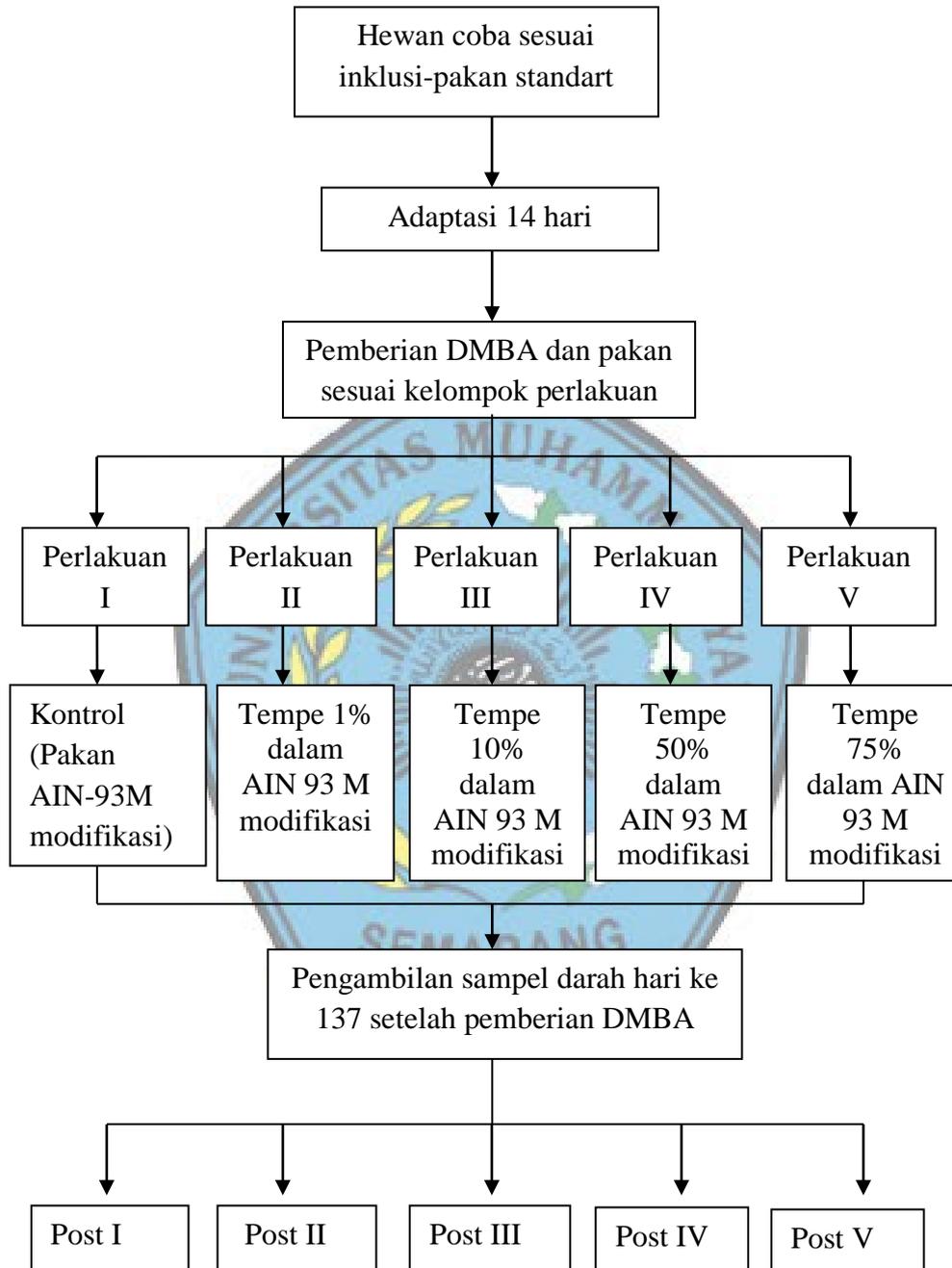
1. Analisis deskriptif dengan menampilkan rata-rata, mean sd, nilai tertinggi dan terendah menurut kelompok intervensi. Dikelompokkan dan ditampilkan berat badan tikus, kenaikan berat badan tikus dan persentase sel darah putih limfosit dan monosit pada kelompok kontrol, perlakuan 1, 2, 3 dan 4.
2. Analisis statistik dengan melakukan uji bivariat yang didahului uji kenormalan dengan uji *Kolmogorov Smirnov* untuk mengetahui normalitas distribusi data.

3. Analisis komparasi dengan *One Way Anova* karena data kenaikan berat badan tikus dan data persentase sel darah putih limfosit dan monosit berdistribusi normal dan homogen, untuk mengetahui perbedaan perubahan persentase sel darah putih pada kelompok kontrol, perlakuan 1, 2, 3 dan 4.
4. Analisis lanjut dengan uji LSD karena data peningkatan berat badan terdapat perbedaan pada kelompok kontrol, perlakuan 1, 2, 3 dan 4.



### 3.10 Alur Penelitian

Gambar 3.2 Alur Penelitian



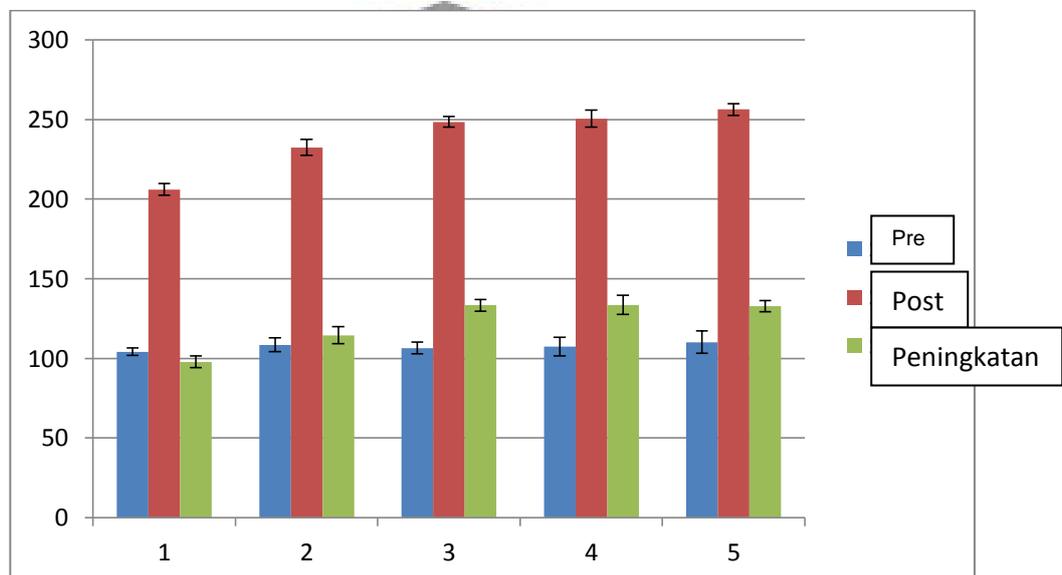
Keterangan :

Post I sampai dengan post V adalah jumlah leukosit diferensial setelah perlakuan.

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Berat Badan Tikus Perlakuan

Berat badan tikus merupakan salah satu data pendukung dalam penelitian. Berat badan tikus tidak mempengaruhi variabel yang diamati yaitu persentase sel darah putih diferensial. Untuk mengetahui perbedaan rata-rata berat badan pre dan post perlakuan serta peningkatan berat badan antar kelompok perlakuan dapat dilihat pada gambar 4.1.



Gambar 4.1 Peningkatan Berat Badan Tikus dan Berat Badan Pre Post Perlakuan

Pada gambar 4.1 dapat terlihat peningkatan berat badan tikus *sprague dawley* post perlakuan pada kelompok kontrol maupun pada seluruh kelompok perlakuan. Hal ini tidak sejalan dengan penelitian Burhan, 2011 dengan menggunakan tikus wistar betina yang induksi DMBA sebagai karsinogenik kanker payudara, menyebutkan pada minggu ke-2 perlakuan terjadi kenaikan rata-rata berat badan pada seluruh kelompok perlakuan. Namun pada minggu ke-3 mulai terjadi penurunan berat badan pada seluruh kelompok perlakuan yang berlanjut pada minggu ke-4 dan hingga akhir penelitian (42 hari). Hasil penelitian ini tidak sejalan dengan penelitian tersebut dimungkinkan karena tepung tempe yang diberikan memiliki kandungan yang iso kalori dengan pakan standar namun belum iso protein sehingga pada tikus perlakuan terjadi kenaikan berat badan.

Diketahui tempe memiliki kandungan protein yang tinggi dan beberapa asam amino seperti lisin, metionin, tryptofan, treonin dan leusin (Karmini, 1996 dan Nurrahman, 2012). Manfaat dari kandungan protein yang tinggi dan beberapa asam amino tersebut dapat memacu pertumbuhan sel sehingga dapat meningkatkan berat badan tikus meskipun diinduksi DMBA sebagai zat karsinogenik kanker.

Pada uji *kolmogorov* menunjukkan data rata-rata persentase peningkatan berat badan tikus termasuk dalam kategori normal dengan nilai  $p$  0,178 ( $>0,05$ ) dan merupakan data yang homogen karena nilai  $p$  0,639 ( $>0,05$ ). Dengan memenuhi syarat data berdistribusi normal dan homogen maka dapat diuji menggunakan uji anova untuk mengetahui perbedaan rata-rata persentase peningkatan berat badan tikus antar kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

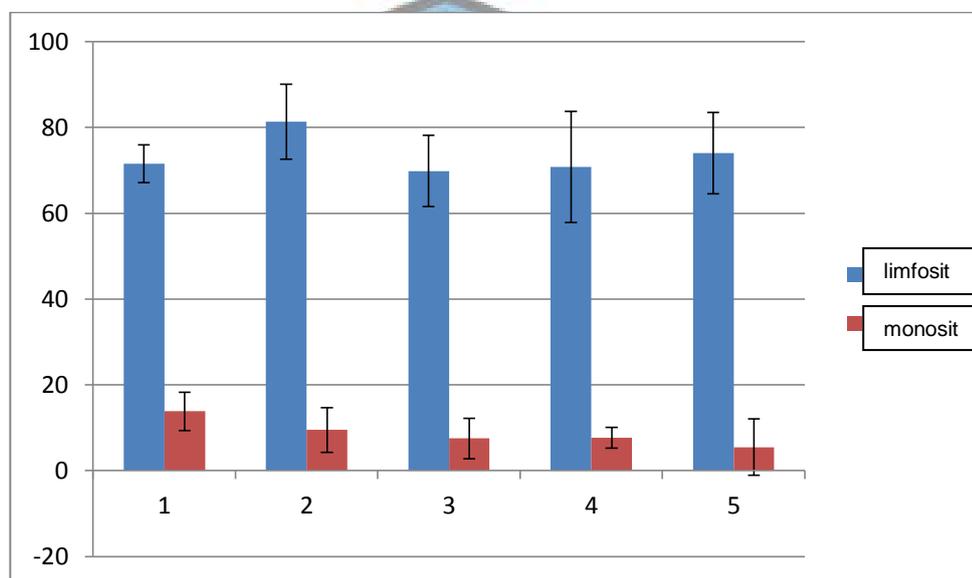
Hasil uji anova menunjukkan terdapat perbedaan antara kelompok kontrol dan keempat kelompok perlakuan karena nilai  $p < 0,05$  yaitu sebesar 0,000. Hasil uji anova yang menunjukkan terdapat perbedaan antara semua kelompok dapat dilanjutkan diolah dengan uji LSD. Uji LSD yang menunjukkan perbandingan antara rata-rata persentase peningkatan berat badan tikus pada tiap kelompok perlakuan menunjukkan hasil terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol (pada gambar kelompok 1) dengan seluruh kelompok perlakuan, begitu pula pada kelompok perlakuan 2 yang diberi campuran 1% tepung tempe pada pakan dengan 3 kelompok perlakuan lain. Pada perbandingan rata-rata peningkatan berat badan antara kelompok perlakuan 3, 4 dan 5 yaitu masing-masing pemberian tepung tempe sebanyak 10%, 50% dan 75% tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

#### **4.2 Persentase sel darah putih diferensial post perlakuan**

Sel darah putih merupakan salah satu komponen dalam sistem imun (Baratawidjaja, 2004). Dari hasil hitung persentase sel darah putih diferensial tidak terdapat sel basofil dan eusinofil. Sel eusinofil berperan dalam respon terhadap penyakit parasitik dan alergi (Hoffbrand, 2006). Dalam penelitian tidak terdapat sel eusiofil dimungkinkan karena tikus tidak mengalami alergi atau sakit yang berasal dari parasit. Sel basofil berperan dalam respon peradangan menurut

penelitian Frandson (1996). Tidak ditemukannya sel basofil diperkirakan tidak terdapat satupun tikus sampel dalam penelitian yang mengalami peradangan. Data yang dimasukkan dalam pengolahan program *spss* hanya data sel limfosit dan monosit yang merupakan jenis sel darah putih diferensial yang merespon sebagai perlawanan adanya kanker. Dari hasil perhitungan terdapat jenis sel darah putih neutrofil namun tidak diuji karena sel neutrofil berperan dalam pertahanan awal terhadap infeksi bakteri (Baratawidjaja, 2004).

Untuk mengetahui rata-rata persentase sel darah putih diferensial tikus pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dapat dilihat pada gambar 4.2.



Gambar 4.2 Perbedaan Rata-rata Persentase Sel Darah Putih Diferensial Tikus Post Perlakuan

Gambar 4.2 menunjukkan persentase sel darah putih diferensial jenis limfosit dan monosit pada kelompok kontrol (pada gambar kelompok pertama), dan keempat kelompok perlakuan. Kelompok kedua pada gambar merupakan kelompok perlakuan dengan pemberian campuran tepung tempe 1% pada pakan, dan kelompok 3, 4 dan 5 masing masing diberi 10%, 50%, dan 75 % tepung tempe pada pakan.

Jumlah sel limfosit kelompok kontrol (71,5%) tidak mengalami peningkatan dibandingkan dengan rata-rata persentase standar berdasarkan data oleh Giknis, *et al* (2008) yaitu 73,3%. Hal ini tidak sejalan dengan penelitian sebelumnya

pada mencit yang mengalami kanker terjadi peningkatan jumlah leukosit total dan pada diferensial leukosit akan menunjukkan peningkatan persentase limfosit (Radoja, 2006; Mayer, 2008). Hal ini dimungkinkan karena setelah dilakukan pembedahan pada payudara tikus belum terlihat sel kanker secara palpasi, namun baru terlihat secara mikrobiologi. Hasil induksi DMBA pada tikus belum menghasilkan sel kanker dimungkinkan karena dosis yang diberikan belum sesuai atau waktu penginduksian DMBA kurang lama sehingga hasil induksi masih berupa sel tumor maka belum terjadi peningkatan sel limfosit di atas batas normal.

Persentase sel limfosit pada kelompok 3 (69,83%) dan 4 (70,83%) di bawah rata-rata persentase limfosit normal, dan terdapat penurunan persentase sel limfosit dari rata-rata persentase limfosit kelompok kontrol (71,5%). Penurunan persentase sel limfosit tersebut belum dapat dikatakan disebabkan oleh pemberian dosis tepung tempe yang tepat karena penurunan tidak signifikan menurut statistik, selain itu persentase limfosit kelompok kontrol yang juga di bawah persentase normal mengasumsikan meskipun tidak diberi perlakuan pemberian tepung tempe dengan dosis tertentu persentase limfosit tersebut tetap di bawah normal. Hal tersebut belum memenuhi kesesuaian penelitian dengan Atun (2009) Kedelai yang di buat tempe mempunyai kandungan genestein, suatu anti oksidan flavonoid paling tinggi di banding produk olahan lainnya seperti tahu. Antioksidan flavonoid berfungsi sebagai anti tumor atau anti kanker.

Pada kelompok 2 dan 5 terjadi peningkatan persentase sel limfosit masing masing 81,33% dan 74 % dari kelompok kontrol (71,5%) dan persentase limfosit normal (73,3%) menurut Giknis, *et.al*, (2008). Hasil tersebut sejalan dengan penelitian sebelumnya oleh Radoja, 2006 dan Mayer, 2008 yang menyebutkan pada mencit yang mengalami kanker pada diferensial leukosit akan menunjukkan peningkatan persentase limfosit. Sel limfosit mengatur pembentukan antibodi (Feldman, 2000). Hal ini dimungkinkan karena dosis tepung tempe pada kelompok 2 dan 5 tidak sesuai untuk dapat menurunkan persentase darah putih diferensial jenis limfosit. Faktor lain juga dapat menyebabkan persentase limfosit tidak mengalami penurunan hal ini dimungkinkan karena menurut Feldman (2000) limfosit merupakan komponen yang beradaptasi dengan sistem imun dan

sel limfosit mengatur pembentukan antibodi. Pada perlakuan 2 dan 5 persentase limfosit yang cenderung meningkat mungkin dikarenakan sistem imun pada tikus dalam kelompok 2 dan 5 sedang meningkat. Dilaporkan dalam penelitian Nurrahman (2012) bahwa tikus yang mengkonsumsi tempe kedelai hitam menunjukkan adanya peningkatan aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) dan daya tahan limfosit terhadap hydrogen peroksida. Pada orang yang mengkonsumsi tempe kedelai hitam selama satu bulan meningkatkan daya tahan limfosit terhadap hydrogen peroksida (Nurrahman, 2003). Sehingga dimungkinkan keadaan yang sama dari kedua penelitian Nurrahman tersebut bahwa tempe kedelai juga mempunyai manfaat yang tidak jauh berbeda dari tempe kedelai hitam.

Pada gambar 4.2 menurut sumber yang sama (Giknis, *et.al*, 2008) menyebutkan jumlah monosit sebesar 13,83% pada kelompok 1 yaitu kontrol melebihi jumlah rata-rata persentase sel monosit normal pada tikus yaitu 2%. Fungsi dari monosit sebagai fagosit (Handayani, 2008). Terjadi peningkatan persentase monosit dimungkinkan karena sebagai salah satu proteksi dalam melawan radikal bebas (DMBA) yang diinduksikan pada tikus agar tidak terjadi stress oksidatif yang terus meningkat hingga terbentuk sel kanker dengan stadium yang lebih tinggi.

Dapat dilihat pada gambar 4.2 keempat kelompok perlakuan dari kelompok 2, 3, 4 dan 5 masing masing 9,5%, 7,5%, 7,67% dan 5,5% terjadi peningkatan persentase monosit melebihi jumlah rata-rata persentase sel monosit normal pada tikus yaitu 2% (Giknis, *et.al*, 2008). Sesuai penelitian sebelumnya oleh Ramprasath (2005) dan Rimbach (2008) yang menyebutkan komponen Zn, Cu dan Fe dalam tempe dapat meningkatkan aktivitas enzim antioksidan, sehingga kemampuan menghambat reaksi oksidasi juga meningkat dan *performance* sel tubuh diantaranya makrofag meningkat. Makrofag adalah sel fagosit mononuclear (monosit) yang utama dalam jaringan yang berperan dalam proses fagositosis mikroorganisme atau molekul kompleks asing (Paul, 2005). Nurrahman (2015) sebelumnya yang menyatakan terdapat tiga kemungkinan komponen tempe mampu meningkatkan sistem imun di dalam tubuh, pada makrofag khususnya.

Dalam proses pembentukan penyakit kanker yang dapat dibagi dalam 2 (dua) fase, yaitu fase inisiasi dan fase promosi. Menurut Lamastimere (1996) senyawa flavonoida terbukti menghambat aktivitas senyawa promotor terbentuknya tumor, sehingga disebut sebagai antitumor. Dari sejumlah senyawa flavonoida dan isoflavonoida, yang banyak disebut-sebut berpotensi sebagai antitumor/antikanker adalah genestein yang merupakan isoflavon aglikon. Potensi tersebut antara lain menghambat perkembangan sel kanker payudara yang telah terbukti dalam penelitian Lamastimere (1996). Penghambatan sel kanker oleh senyawa flavon/isoflavon ini terjadi khususnya pada fase promosi (Fujiki *et al.*, 1986). Genestein yang merupakan salah satu komponen isoflavon tersebut juga terdapat pada kedelai dan tempe. Kandungan isoflavon pada tempe dapat mencegah stress oksidatif yang disebabkan radikal bebas dan dapat mencegah peningkatan stadium sel kanker pada payudara tikus. Sebagai salah satu golongan flavonoid, senyawa bioaktif isoflavon yang mengandung gugus fenolik telah dilaporkan mempunyai kemampuan sebagai antioksidan dan mencegah terjadinya kerusakan akibat radikal bebas melalui dua mekanisme, yaitu : mendonorkan ion hidrogen (Saija *et al.*, 1995; Arora *et al.*, 1998), dan bertindak sebagai *scavenger* radikal bebas secara langsung (Arora *et al.*, 1998; Nijveldt *et al.*, 2001). Pemberian tepung tempe diharapkan dapat membantu menghambat perkembangan sel kanker payudara sehingga jumlah sel darah putih diferensial jenis limfosit maupun monosit dapat menurun atau mendekati normal. Kecenderungan peningkatan sel limfosit dan monosit dimungkinkan karena dosis tepung tempe yang diberikan yang kurang efektif atau modifikasi AIN-93 M yang kurang tepat.

#### **4.3. Perbedaan persentase sel darah putih diferensial antar kelompok tikus**

Untuk mengetahui kenormalan data dilakukan uji kenormalan menggunakan *kolmogorov smirnov*. Dari keseluruhan data hasil uji *kolmogorov smirnov* menunjukkan data dalam kategori normal karena menunjukkan  $p > 0,05$  dimana hasil data sel limfosit 0,91 dan sel monosit 0,851. Dilanjutkan untuk mengetahui homogenitas data menggunakan uji *kolmogorov smirnov*. Pada jumlah limfosit menghasilkan nilai  $p$  0,121. Nilai  $p$  pada jumlah monosit sebesar 0,703. Kedua nilai  $p > 0,05$  sehingga data tersebut merupakan data yang homogen.

Hasil uji kenormalan menggunakan *kolmogorov smirnov* menunjukkan data termasuk ke dalam kategori normal dan homogen karena keseluruhan nilai  $p > 0,05$  sehingga dilanjutkan menggunakan uji *anova* melalui program SPSS. Berdasarkan analisis dengan uji *anova* untuk melihat perbedaan persentase sel darah putih diferensial post perlakuan antara tikus kelompok kontrol dengan keempat kelompok tikus perlakuan yaitu pada kelompok 2 yang mengkonsumsi pakan dengan campuran tepung tempe sebanyak 1%, tikus perlakuan 3 diberi pakan dengan dosis tepung tempe sebanyak 10%, tikus perlakuan 4 diberi dosis 50% campuran tepung tempe pada pakan, dan tikus perlakuan 5 dengan dosis tepung tempe pada pakan sebanyak 75%. Nilai  $p$  dari hasil uji *anova* pada limfosit yaitu 0,225. Dari hasil tersebut tidak terdapat perbedaan yang signifikan dari kelompok kontrol, kelompok perlakuan 2,3,4, maupun kelompok perlakuan 5 karena hasil uji *anova* melebihi nilai 0,05. Hasil limfosit pada penelitian tidak berbeda signifikan dimungkinkan karena dosis tepung tempe yang kurang tepat untuk menurunkan persentase sel limfosit, atau karena kandungan dari pakan yang belum sama dari segi kandungan protein. Pakan yang diberikan iso kalori namun belum iso protein dapat mempengaruhi hasil dari perlakuan.

Sel sel sistem imun berasal dari sel prekursor (induk) yang pleuripoten dalam sum sum tulang yang kemudian berdiferensiasi menjadi sel pre-monosit (Baratawidjaja, 2009). Monosit dibentuk di dalam sumsum tulang, masuk ke dalam sirkulasi dalam bentuk imatur dan mengalami proses pematangan menjadi makrofag setelah masuk ke jaringan. Fungsinya sebagai fagosit (Handayani, 2008). Berdasarkan kedua pernyataan tersebut sel monosit erat kaitannya dengan sistem imun dimana sistem imun akan meningkat apabila terdapat benda asing salah satunya sel kanker. Sejalan dengan penelitian Radoja (2006), dalam Mayer (2008) menyatakan persentase sel monosit sebagai makrofag akan meningkat pada mencit (*Mus musculus*) yang mengalami kanker. Pada hasil penelitian diketahui jumlah persentase sel monosit tidak mengalami penurunan, cenderung meningkat melebihi rata-rata persentase sel monosit normal. Hal ini dimungkinkan merupakan salah satu reaksi sistem imun dalam mencegah meningkatnya stadium sel tumor menjadi sel kanker. Namun hasil uji *anova*

jumlah sel monosit antar kelompok kontrol dan keempat kelompok perlakuan tidak mengalami perbedaan yang signifikan dengan hasil p di atas 0,05 yaitu 0,67. Hasil tersebut dapat diasumsikan tidak terdapat perbedaan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan sehingga efek dari tepung tempe belum sesuai dengan hipotesa. Hal ini dimungkinkan karena komposisi dari bahan pakan AIN 93M yang dimodifikasi belum tepat.



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1. Kesimpulan

1. Terdapat hubungan antara pemberian diet dengan peningkatan berat badan tikus, terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata persentase peningkatan berat badan antar kelompok perlakuan, termasuk kelompok kontrol. Kecuali pada antara kelompok perlakuan yang diberi tepung tempe 10%, 50% dan 75% tidak terdapat perbedaan yang signifikan.
2. Terdapat perbedaan rata-rata persentase sel limfosit dan monosit setelah perlakuan antara kelompok perlakuan pertama hingga perlakuan keempat dengan kelompok kontrol, akan tetapi secara statistik tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Perbedaan dosis tepung tempe tidak berpengaruh terhadap persentase sel limfosit dan monosit pada tikus *sprague dawley* yang diinduksi DMBA.

#### 5.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai potensi isoflavon dalam tepung tempe sebagai preventif kanker payudara dengan waktu penelitian yang lebih lama dan komposisi tepung tempe yang lebih tepat serta dosis tepung tempe yang lebih bervariasi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amandito, R., Viryawan, C., Santoso, F., Gautami, W., Sonar Soni Panigoro, S.S. 2013. *The Characteristics of Breast Cancer Patients in "Dharmais" Hospital National Cancer Center Jakarta Based on Occupational and Environmental Status*. Indonesian Journal of Cancer. Vol. 7 No.2. April - June 2013.
- Astuti, M. 1992. Iron bioavailability of traditional Indonesian Soybean Tempe. Ph.D Thesis, Tokyo University of Agriculture, Japan.
- Astuti, M. 1996. Tempe dan antioksidan prospek pencegahan penyakit degeneratif. Dalam : Sapuan dan Soetrisno, N. (eds). *Bunga rampai tempe Indonesia*, hal. 61-67. Yayasan Tempe Indonesia. Jakarta.
- Astuti, S. 2008. *Isoflavon Kedelai Dan Potensinya Sebagai Penangkap Radikal Bebas*. Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian Volume 13, No. 2, September 2008.
- Atun, S. 2009. *Potensi Senyawa Isoflavon dan Derivatnya dari Kedelai (Glycine Max.L) Serta Manfaatnya Untuk Kesehatan*. Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan dan Penerapan MIPA UNY 16 Mei 2009.
- Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan RI. 2008. *Laporan Nasional 2007*. Ebook Laporan Riset Kesehatan Dasar.
- Baratawidjaja, K.G. dan Rengganis, I. 2009. *Imunologi Dasar edisi 8*. Balai Penerbit FK UI. Jakarta.
- Burhan, B.A. 2011. *Peningkatan Nilai Mutu Tempe Sebagai Induktor Apoptosis Dan Penghambat Proliferasi Sel Kanker Payudara*.
- Cassidy, A., Bingham, S., and Setchell, K.R.D. 1994. *Biological effects of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal woman*. Am J. Clin. Nutr. 60: 333340.
- Clarisa, A. 2009. *Respon Limfosit Lokal Pada Kejadian Rekurensi Kanker Serviks Di Rumah Sakit Dr. Kariadi Semarang*. Laporan Hasil Penelitian Karya Tulis Ilmiah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Darwito. 2009. Omega 3 dan Kanker Payudara.
- Departemen Kesehatan RI. *Laporan hasil riset kesehatan dasar 2007*. Jakarta. Depkes RI. 2008.
- Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Tengah. *Profil Kesehatan Provinsi Jawa Tengah Tahun 2009*. 2010

- Dixon, R.A. and Ferreira, D. 2002. Genestein. *Phytochemistry* 60: 205-211.
- Dixon, R.A. and Steele, C.L. 1999. *Flavonoids and Isoflavone : a gold mine for metabolic engineering*. *Trends Plant Sci*, 4, 394 -400.
- Effendi, Z. 2003. *Peranan Leukosit Sebagai Anti Inflamasi Alergik dalam Tubuh*. USU Digital Library.
- Erlinger, T.P. 2004. *WBC Count and the Risk of Cancer Mortality in a National Sample of U.S. Adults: Results from the Second National Health and Nutrition Examination Survey Mortality Study*. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 13: 1052
- Feldman, B.F. 2000. *Veterinary Hematology Fifth Edition*. Lippincot William and Wilkins: California.
- Finlay, B. and McFadden, G. 2006. *Antiimmunology: evasion of the host immune sistem by bacterial and viral pathogens*. *Cell* 124 (4): 767-82
- Forouzanfar, M.H., Foreman, K.J., Delossantos, A.M., Lozano, R., Lopez, A.D., Murray, C.J., et al. *Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: A sistematic analysis*. *Lancet*. 2011, 378:1461-84.
- Fujii, J., Iuchi, Y., Matsuki, S., and Ishii. T. 2003. *Cooperative function of antioxidant and redox sistems against oxidative stress in male reproductive tissues*. *Asian J. Androl*. 5: 231-242
- Fujiki, H., Horiuci, T., Yamashita, K., Haki, H., Suganuma, M., Nishino, H., Iwashima A., Hirata, Y., dan Sugimura T. 1986. *Inhibition of Tumor Promotion by Flavonoids*. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmaceutical and Structure Activity Relationships*. Alan R. Liss, Tnc. p: 429-440.
- Geogry, P. K., Murata and Ikehata, H. 1964. *Antioxidants isolated from fermented soybeans*. *Nature*. 203 : 870.
- Giknis, M.L.A., Clifford, C.B., 2008. *Clinical Laboratory Parameters for Crl:WI(Han)*. Charles River Laboratory.
- Globocan 2008 International Agency for Research on Cancer (IARC). *Section of Cancer Information*. Indonesia. <http://globocan.iarc.fr/>
- Halim, Binarwan. 2001. *Imunologi Kanker*. Cermin Dunia Kedokteran No. 132 : 47-51
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 1990. *Role of free radical and catalytic logam ions in humans disease : An overview*. *Meth. Enzymol*. 186: 1-83.

- Handajani, N.S., Ruben, D.R. 2009. *Pengaruh VCO Terhadap Hitung Jenis Leukosit, Kadar Glukosa Dan Kreatinin Darah MusMusculus Balb/C Hiperglikemi Dan Tersensitisasi Ovalbumin*. Bioteknologi 6 (1): 1-10, Mei 2009, ISSN: 0216-6887.
- Hendrich, S. Lu, Z., Wang, Hopmans, E. dan Murphy, P. 1996. *Soy Isoflavone Extract Suppresses Fumonisin B1-Promoted Rat Hepatocarcinogenesis*. Second International Symposium on the Role of Soybean in Preventing and Treating Chronic Diseases, September 15-18, 1996, Brussel, Belgique.
- Junaidi, Iskandar. 2007. *Kanker*. Jakarta: PT. Bhuana Ilmu Populer.
- Jung, M.Y., Choe and Min, D.B. 1991. *Alpa, beta and gamma tocopherol effects on chlorophyll photosentized oxidation of soybean oil*. Jurnal Food Science 56 : 807-815.
- Karmini, M. 1996. *Tempe dan Infeksi*. Dalam : Sapuan dan Soetrisno, N. (eds). *Bunga rampai tempe Indonesia*, hal. 61-67. Yayasan Tempe Indonesia. Jakarta.
- Kementrian Kesehatan RI. 2015. *Stop Kanker*. Pusat Data dan Informasi Kementrian Kesehatan RI.
- Khairinal. 2012. *Efek Kurkumin Terhadap Proliferasi Sel Limfosit Dari Limpa Mencit C3H Bertumor Payudara Secara In Vitro*. Tesis Universitas Indonesia 2012.
- Lamastimere, C.A., Murril, B.W. and Brown, N.M. 1996. *Genistein Supresses Chemically-Induced Mammary Cancer*. Second International Symposium on the Role of Soybean in Preventing and Treating Chronic Diseases, September 15-18, 1996, Brussel, Belgique.
- Langseth, L. 2000. *Antioxidants and Their Effect on Health*. Di dalam: Schmidl M.K. and T.P. Labuza (Eds.). *Essentials of Functional Foods*. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.
- Lee, J., Koo, N., and Min, D.B. 2004. *Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals*. Compre Rev. in Food Sci. and Food Safety. 3: 21-33
- Lukmasari, A. 2006. *Pengaruh Teh Hijau Terhadap Jumlah Leukosit Mencit Balb/C Yang Diberi Metotreksat*. Artikel Karya Tulis Ilmiah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Maggini, S., Wintergerst, E.S., Beveridge, S. and Honig, D.H. 2007. *Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening ephitelial barriers and cellular and humoral immune reponses*. British Journal of Nutrition 1 : 29-35.

- Marsh JC, Boggs DR. *Leukosit dan sel – sel induk hematopoesik*. In : Suyono J, editor. *Patofisiologi Sodeman*. Jakarta:Hipokrates;1995.228 - 303
- Mayer, A., Gustafson, K. 2008. *Antitumour and Cytotoxic Compounds*. *European Journal Of Cancer* 44: 2357–2387.
- Nabet, F.B. 1996. *Zat gizi antioksidan penangkal senyawa radikal pangan dalam sistem biologis*. Di dalam Zakaria, F.R., Dewanti, R., dan Yasni, S., (Ed..) : *Prosiding Seminar Senyawa Radikal dan Sistem Pangan : Reaksi Biomolekuler, Dampak terhadap Kesehatan dan Panangkalan*. Kerjasama Pusat Studi Pangan dan Gizi IPB dengan Kedutaan Perancis, Jakarta.
- Nurrahman. 2012. *Potensi tempe kedelai hitam dalam meningkatkan kadar IgA sekretori dan proliferasi limfosit in vivo*. Disertasi. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
- Nurrahman, Nurhidajah. 2015. *Pengaruh konsumsi tempe kedelai hitam terhadap aktivitas makrofag dan kadar interleukin 1 (IL-1) pada tikus secara in vivo*. *Journal Agritech* 35(3) : 249 – 299.
- Oemiati, R., Rahajeng, E., Kristanto, A.Y. *Prevalensi tumor dan beberapa faktor yang mempengaruhinya di Indonesia*. *Buletin Penelitian Kesehatan*. 2011;39(4):190-204.
- Paarrang, Y.B., Mantik, M.F.J., Gunawan.S. 2015. *Hubungan Antara Ratio Netrofil Limfosit Dengan Klasifikasi Risiko Pada Leukemia Limfoblastik Akut*.*Jurnal E-Clinic (Ecl)*, Volume 3, Nomor 1, Januari-April 2015.
- Paul, W.E. 2008. *Fundamental immunology*. Lippincott Williams and Willkins. New York.
- Peterson, T.G Kim, H. dan Bames, S. 1997. *Mechanisms of Action of The Soy Isoflavone Genistein at the Cellular Level*. Second International Symposium on the Role of Soybean in Preventing and Treating Chronic Deseases, September 15-18, 1996, Brussel, Belgique.
- Radji, M. 2009. *Vaksin Kanker*. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol. Vi, No. 3, Desember 2009, 109 – 118
- Ralston L, 2005, *Partial reconstruction of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis in Yeast using soybean type I and II chalcone isomerase*, *Plant physiology*, vol. 137, p 1375-1388
- Ramprasath, V.R., Shanthi, P. and Sachdanandam, P. 2005. *Evaluation antioxidant effect of samecarpus anacardium linn. Extract on the components of immune sistem in adjuvant arthritis*. *Vaskular Pharmacology* 42 : 179-186.

- Restuati, M. 2013. *Uji Efek Ekstrak Daun Sirsak (Annona muricata) Terhadap Leukosit Tikus Putih (Rattus norvegicus)*. Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung, 2013.
- Reeves, P.G., Nielsen, F.H., George C. Fahey, G.C. 1993. *Ain-93 Purified Diets For Laboratory Rodents: Final Report Of The American Institute Of Nutrition AdHoc Writing Committee On The Reformulation Of The Ain-76a Rodent Diet*. Journal American Institute of Nutrition.
- Reeves, P.G. 1997. *Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet*. Journal American Society for Nutritional Sciences.
- Rimbarch, G., Saadatmandi, C.B., Frank, J., Fuchs, D., Wenzel, U., Daniel, H., Hall, W.L. and Weinberg, P.D. 2008. *Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease- A molecular prespective*. Food and chemical toxicology 46 : 1308-1319.
- Rogers, K. 2011. *Blood - Physiology and Circulation*. Britannica Educational Publishing. New York.
- Safrida. *Gambaran Diferensiasi Sel Darah Putih Tikus (Rattus norvegicus) Betina Pada Starvasi*. Jurnal Program Studi Pendidikan Biologi FKIP Unsyiah Banda Aceh.
- Saija, A. et al. 1995. *Flavonoids as antioxidant agents : importance of their interaction with biomembranes*. Free Radic. Biol. & Med. 19(4): 481-486.
- Saleh, R.A., and Agarwal. A. 2002. *Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice*. J. Androl. 23(6):737-752
- Sapuan dan Soetrisno. 1996. *Bunga Rampai Tempe Indonesia*. Yayasan Tempe Indonesia. Jakarta.
- Saputri, D.N.E., Dyah, A.P.N, Abdulgani, N. *Jumlah Total Dan Diferensial Leukosit Mencit (Mus Musculus) Pada Evaluasi In Vivo Antikanker Ekstrak Spons Laut Aaptos Suberitoides*. Jurnal Program Studi Biologi – Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Sekeres, M.A., Kalaycio, M.E., Bolwell, B.J. 2007. *Clinical Maglinant Hematology*. McGraw-Hill Companies. United States of America.
- Shankar, A. et al. 2011. *Association Between Circulating White Blood Cell Count and Cancer Mortality Population-Based Cohort Study Free*. Arch Intern Med; 166(2):188-194.
- Sikka, S.C., Rajasekaran, M., and Hellstrom. W.J.G. 1995. *Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility*. J. Androl. 16(6): 464-468.
- Sudiana, I.K. 2008. *Patobiologi Molekuler Kanker*. Salemba Medika. Jakarta.

- Sundaryono, A. 2011. *Uji Aktivitas Senyawa Flavonoid Total Dari Gynura Segetum(Lour) Terhadap Peningkatan Eritrosit Dan Penurunan Leukosit Pada Mencit (Mus Musculus)*. Jurnal Exacta, Vol. IX No.2 Desember 2011.
- Supari, F. 1996. *Radikal Bebas dan Patofisiologi Beberapa Penyakit*. Di dalam Zakaria F.R., R. Dewanti, dan S. Yasni (Edt.). Di dalam : Prosiding Seminar Senyawa Radikal dan Sistem Pangan : *Reaksi Biomolekuler, Dampak terhadap Kesehatan dan Penangkalan*. Kerjasama Pusat Studi Pangan dan Gizi IPB dengan Kedutaan Perancis. Jakarta.
- Suryani, A.I. 2011. *Efek Jus Tomat Terhadap Jumlah Total Leukosit Dan Neutrofil Tikus Wistar Yang Leukositosis Setelah Diberi Paparan Asap Rokok*. Artikel Ilmiah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Tambunan, N., Umbas, R. 2014. *Peran Faktor Nutrisi Pada Pencegahan Kanker Prostat*. Indonesian Journal Of Cancer Vol. 8, No. 3 July - September 2014.
- Tejasari. 2007. *Evaluation of ginger (Zingiber officinale Roscoe) bioactive compounds in increasing the ratio of T-cell surface molecule of CD3+ CD4+: CD3+ CD8+ in vitro*. Malaysian Journal of Nutrition 13(2) : 161-170.
- Theml, H., Diem, H., Haferlach, T. 2004. *Color Atlas of Hematology*. Thieme Verlag, Stuttgart. Germany.
- Wibowo, A.R., Sriningsih, Wuyung, P.E., Ranasasmita, R. 2010. *The Influence of DMBA (7,12-dimethylbenz- [a] anthracene) Regimen In The Development of Mamame Carcinogenesis on Sprague dawley Female Rat*. Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention, 2010, I(1):60-66.
- World Health Organization. *The global burden of disease : 2004 update*. Geneva. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2008.
- Yuan D, PAN, Y., Chen, Y., Uno, T., Zhang, S., Kano, Y., 2008, *An improved method for basic hydrolysis of isoflavone malonylglucosides and quality evaluation of Chinese soy materials*. Chem. Pharm. Bull., 56(1), 1-6.
- Zakaria, F.R., Veronica E.D.C. 2002. *Pengaruh Ekstrak Jamu Terhadap Aktivitas Sel Natural Killer Dalam Melisis Alur Sel Leukimia (K-562) Secara In Vitro*. Jurnal Teknol dan Industri Pangan, Volo.XIII, No.1 Th.2002.
- Zhao, J.H., Sun, S.J., Horiguchi, H., Arao, Y., Kanamori, N., Kikuchi, A., Oguma, E. and Kayama, F. 2005. *A soy diet accelerates renal damage in autoimmune MRL/Pp-lpr/lpr mice*. International immunopharmacology 5 : 1601-1610.



## Lampiran 1

## Komposisi pakan standar AIN-93 M

***AIN-93M diet formulated for maintenance of adult rodents***

Ingredient	<i>g/kg diet</i>
Cornstarch	465.692
Casein (≥85% protein)	140.000
Dextrinized cornstarch (90–94% tetrasaccharides) <sup>1</sup>	155.000
Sucrose	100.000
Soybean oil (no additives)	40.000
Fiber <sup>2</sup>	50.000
Mineral mix (AIN-93M-MX)	35.000
Vitamin mix (AIN-93-VX)	10.000
L-Cystine	1.800
Choline bitartrate (41.1% choline) <sup>3</sup>	2.500
Tert-butylhydroquinone	0.008

<sup>1</sup>Dyetrose (Dyets, Bethlehem, PA) and Lo-Dex 10 (American Maize, Hammond, IN) meet these specifications. An equivalent product may also be used.

<sup>2</sup>Solka-Floc<sup>®</sup>, 200 FCC (FS&D, St. Louis, MO) or its equivalent is recommended.

<sup>3</sup>Based on the molecular weight of the free base.

Sumber. Reeves 1993



Lampiran 2

**Formulir Pengambilan Data Tikus *Sprague dawley* Betina Sampel Penelitian**

**POTENSI TEPUNG TEMPE TERHADAP PERSENTASE  
SEL DARAH PUTIH DIFERENSIAL LIMFOSIT DAN MONOSIT  
(*STUDY* pada *TIKUS SPRAGUE DAWLEY* BETINA yang DIINDUKSI  
DMBA sebagai KARSINOGENIK KANKER PAYUDARA)**

Kode Sampel :

Leukosit	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\Sigma$
Basofil											
Eusinofil											
Neutrofil											
Limfosit											
Monosit											
$\Sigma$											

Kode Sampel :

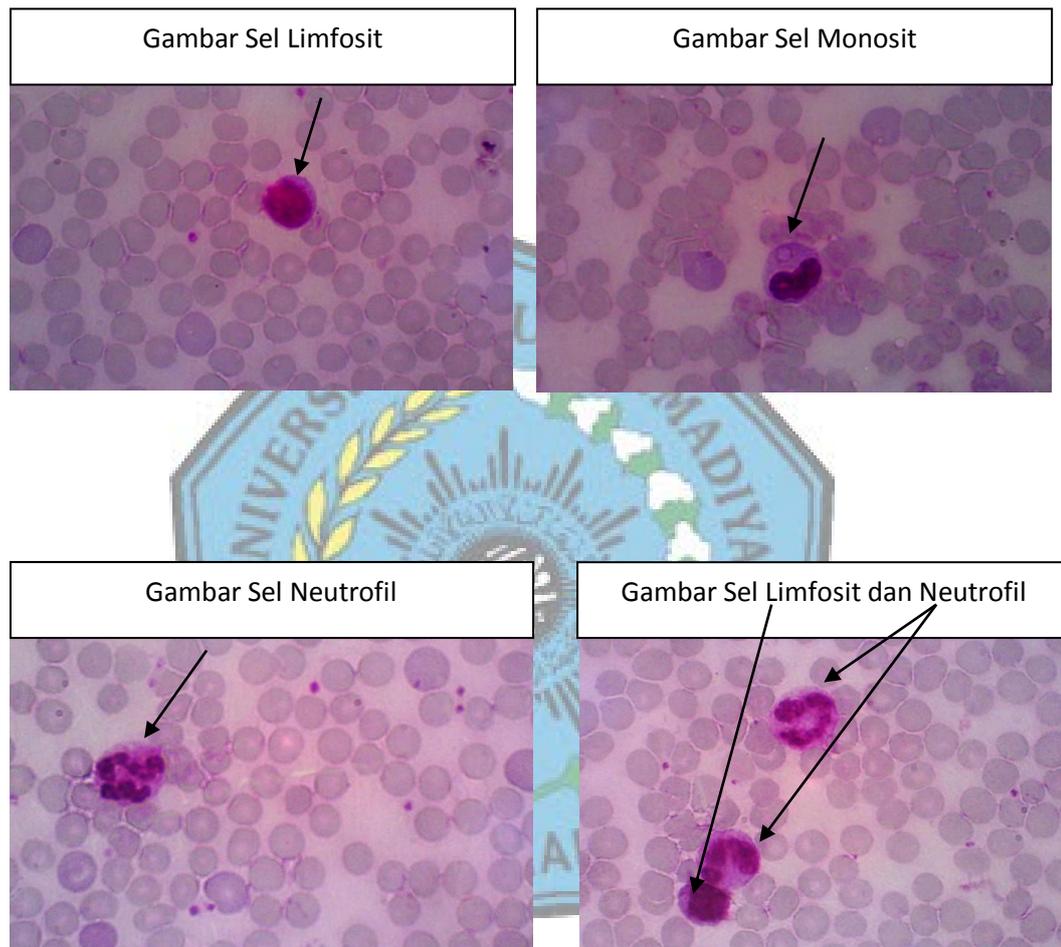
Leukosit	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\Sigma$
Basofil											
Eusinofil											
Neutrofil											
Limfosit											
Monosit											
$\Sigma$											

Kode Sampel :

Leukosit	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\Sigma$
Basofil											
Eusinofil											
Neutrofil											
Limfosit											
Monosit											
$\Sigma$											

## Lampiran 3

Penampakan Sel Darah Putih Diferensial Sel Neutrofil, Limfosit, dan Monosit menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 100x10 kali.



## Lampiran 4

Nilai rata rata, nilai tertinggi, nilai terendah dan standar deviasi berat badan tikus dan sel darah putih diferensial limfosit dan monosit post perlakuan dengan Uji DESKRIPTIF

Descriptives								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Limfosit 1	6	71.50	4.416	1.803	66.87	76.13	63	75
2	6	81.33	8.710	3.556	72.19	90.47	69	90
3	6	69.83	8.329	3.400	61.09	78.57	59	80
4	6	70.83	12.983	5.300	57.21	84.46	51	85
5	6	74.00	9.487	3.873	64.04	83.96	59	86
Total	30	73.50	9.529	1.740	69.94	77.06	51	90
Monosit 1	6	13.83	4.446	1.815	9.17	18.50	7	18
2	6	9.50	5.244	2.141	4.00	15.00	0	15
3	6	7.50	4.764	1.945	2.50	12.50	2	15
4	6	7.67	2.422	.989	5.12	10.21	4	10
5	6	5.50	6.535	2.668	-1.36	12.36	0	18
Total	30	8.80	5.352	.977	6.80	10.80	0	18
BB Post 1	6	206.00	3.688	1.506	202.13	209.87	202	211
2	6	232.50	5.010	2.045	227.24	237.76	225	240
3	6	248.50	3.271	1.335	245.07	251.93	245	252
4	6	250.50	5.431	2.217	244.80	256.20	244	258
5	6	256.33	3.615	1.476	252.54	260.13	250	260
Total	30	238.77	18.922	3.455	231.70	245.83	202	260

## Deskriptif Berat Badan Pre Perlakuan :

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
BB Pre 1	6	107.3	2.242	97.0	111
2	6	108.5	4.326	119	120
3	6	106.9	3.589	130	143
4	6	107.3	5.759	130	143
5	6	110.1	6.986	129	144

## Deskriptif Persen Peningkatan Berat Badan :

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
1	6	97.84	3.775	97.0	111
Peningkatan BB 2	6	114.56	5.210	119	120
3	6	133.41	3.688	130	143
4	6	133.57	5.959	130	143
5	6	132.73	3.516	129	144

Uji kenormalan data berat badan menggunakan *UJI KOLMOGOROV*

## One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		persen_peningkatan_berat_badan
N		30
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	122.4199
	Std. Deviation	15.26383
Most Extreme Differences	Absolute	.201
	Positive	.127
	Negative	-.201
Kolmogorov-Smirnov Z		1.099
Asymp. Sig. (2-tailed)		.178
a. Test distribution is Normal.		

Uji kenormalan sel darah putih differensial limfosit dan monosit menggunakan *UJI KOLMOGOROV*

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Pakan	limfosit	monosit
N		30	30	30
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	3.00	73.50	8.80
	Std. Deviation	1.438	9.529	5.352
Most Extreme Differences	Absolute	.157	.104	.111
	Positive	.157	.055	.111
	Negative	-.157	-.104	-.110
Kolmogorov-Smirnov Z		.857	.570	.610
Asymp. Sig. (2-tailed)		.454	.901	.851

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Uji homogenitas persen peningkatan berat badan menggunakan *UJI KORMOGOROV*

**Test of Homogeneity of Variances**

persen\_peningkatan\_berat\_badan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.639	4	25	.639

Uji homogenitas sel darah putih differensial limfosit dan monosit post perlakuan menggunakan *UJI KORMOGOROV*

**Test of Homogeneity of Variances**

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
limfosit	2.026	4	25	.121
monosit	.547	4	25	.703

Uji beda persen peningkatan berat badan dengan UJI ANOVA

**ANOVA**

persen\_peningkatan\_berat\_badan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6104.000	4	1526.000	58.463	.000
Within Groups	652.549	25	26.102		
Total	6756.549	29			

Uji beda persentase peningkatan berat badan dengan UJI ANOVA

**ANOVA**

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.	
Limfosit	Between Groups	517.000	4	129.250	1.527	.225
	Within Groups	2116.500	25	84.660		
	Total	2633.500	29			
Monosit	Between Groups	238.133	4	59.533	2.511	.067
	Within Groups	592.667	25	23.707		
	Total	830.800	29			



## Uji lanjut data persentase peningkatan berat badan dengan UJI LSD

## Multiple Comparisons

Dependent

Variable:persen\_peningkatan\_beratbadan

(I) sampel	(J) sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
LSD kontrol	perlakuan 1 pemberian tepung tempe 1%	-16.71826*	2.94969	.000	-22.7933	-10.6433
	perlakuan 2 pemberian tepung tempe 10%	-35.57145*	2.94969	.000	-41.6464	-29.4965
	perlakuan 3 pemberian tepung tempe 50%	-35.72709*	2.94969	.000	-41.8021	-29.6521
	perlakuan 4 pemberian tepung tempe 75%	-34.88925*	2.94969	.000	-40.9642	-28.8143
perlakuan 1 pemberian tepung tempe 1%	kontrol	16.71826*	2.94969	.000	10.6433	22.7933
	perlakuan 2 pemberian tepung tempe 10%	-18.85319*	2.94969	.000	-24.9282	-12.7782
	perlakuan 3 pemberian tepung tempe 50%	-19.00883*	2.94969	.000	-25.0838	-12.9338
	perlakuan 4 pemberian tepung tempe 75%	-18.17098*	2.94969	.000	-24.2460	-12.0960
perlakuan 2 pemberian tepung tempe 10%	kontrol	35.57145*	2.94969	.000	29.4965	41.6464
	perlakuan 1 pemberian tepung tempe 1%	18.85319*	2.94969	.000	12.7782	24.9282
	perlakuan 3 pemberian tepung tempe 50%	-.15564	2.94969	.958	-6.2306	5.9194
	perlakuan 4 pemberian tepung tempe 75%	.68220	2.94969	.819	-5.3928	6.7572
perlakuan 3 pemberian tepung tempe 50%	kontrol	35.72709*	2.94969	.000	29.6521	41.8021
	perlakuan 1 pemberian tepung tempe 1%	19.00883*	2.94969	.000	12.9338	25.0838
	perlakuan 2 pemberian tepung tempe 10%	.15564	2.94969	.958	-5.9194	6.2306
	perlakuan 4 pemberian tepung tempe 75%	.83784	2.94969	.779	-5.2371	6.9128
perlakuan 4 pemberian tepung tempe 75%	kontrol	34.88925*	2.94969	.000	28.8143	40.9642
	perlakuan 1 pemberian tepung tempe 1%	18.17098*	2.94969	.000	12.0960	24.2460
	perlakuan 2 pemberian tepung tempe 10%	-.68220	2.94969	.819	-6.7572	5.3928
	perlakuan 3 pemberian tepung tempe 50%	-.83784	2.94969	.779	-6.9128	5.2371

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.