

Bidang Unggulan : Herbal

Kode/Rumpun Ilmu : 304/Ilmu Biomedik

LAPORAN AKHIR

PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI



**Potensi Hidrolisat Protein Kacang Polong Hijau (*Pisum Sativum*) untuk
Terapi Diet Penyakit Ginjal Kronis**

Oleh:

Dr. Meilinah Hidayat, dr., M.Kes. (NIDN 0404126301)

Sijani Prahastuti, dr., M.Kes. (NIDN 0403036101)

Prof. Andreanus A. Soemardji, DEA (NIDN0027105001)

Dibiayai oleh:

**Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat
Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan
Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi
Sesuai dengan Kontrak Penelitian
Nomor: 0815/K4/KM/2018**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS KRISTEN MARANATHA
NOVEMBER 2018**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Potensi Protein Hidrolisat Kacang Polong Hijau (Pisum sativum) untuk Terapi Penyakit Ginjal Kronik

Peneliti/Pelaksana
 Nama Lengkap : Dr. dr. MEILINAH HIDAYAT, M.Kes
 Perguruan Tinggi : Universitas Kristen Maranatha
 NIDN : 0404126301
 Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
 Program Studi : Kedokteran
 Nomor HP : 08122163203
 Alamat surel (e-mail) : mellahidayat@yahoo.com

Anggota (1)
 Nama Lengkap : dr. SIJANI PRAHASTUTI M.Kes
 NIDN : 0403036101
 Perguruan Tinggi : Universitas Kristen Maranatha

Anggota (2)
 Nama Lengkap : Dr. Drs ANDREANUS ANDAJA SOEMARDJI D.E.A
 NIDN : 0027105001
 Perguruan Tinggi : Institut Teknologi Bandung

Institusi Mitra (jika ada)
 Nama Institusi Mitra : -
 Alamat : -
 Penanggung Jawab : -
 Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 3 tahun
 Biaya Tahun Berjalan : Rp 9,743,000
 Biaya Keseluruhan : Rp 446,810,000

Mengetahui,
 Dekan Fakultas Kedokteran UK Maranatha

Kota Bandung, 14 - 11 - 2018
 Ketua,



(dr. Lusiana Darsono M.Kes)
 NIP/NIK 110300

(Dr. dr. MEILINAH HIDAYAT, M.Kes)
 NIP/NIK 110165

Menyetujui,
 Ketua LPPM UK Maranatha



(Dr. Teresa Liliana Wargasetia S.Si.,M.Kes.,PA(K))
 NIP/NIK 110325

RINGKASAN

Salah satu butir Rencana Induk Penelitian Universitas Kristen Maranatha adalah peningkatan kualitas hidup masyarakat secara holistik dalam bidang Kesehatan dan Degeneratif berbasis Herbal dan Gizi. Di Indonesia angka kejadian penyakit ginjal kronis (PGK) atau *Chronic Kidney Disease* (CKD) terus meningkat setiap tahunnya. Nutrisi yang baik berperan penting dalam memperbaiki fungsi, memperlambat progresivitas penyakit ginjal serta meningkatkan kualitas hidup dan kesehatan penderita PGK. Sebuah penelitian di Kanada menemukan bahwa protein hidrolisat dalam kacang polong kuning (*Pisum sativum* L.) dapat menjadi obat alami terhadap tekanan darah tinggi dan PGK. Di Indonesia, kacang polong jenis kuning ini jarang terdapat, bahkan jenis kacang polong hijau pun belum umum ditanam oleh petani di Indonesia. Hasil penelitian sebelumnya, yang membandingkan kandungan dan potensi beberapa protein hidrolisat kacang, menunjukkan bahwa protein hidrolisat kacang polong hijau Indonesia (*Pisum sativum*) yang dihidrolisis menggunakan bromelain (PHPHB) memiliki efek yang baik terhadap fungsi ginjal tikus Wistar betina yang diinduksi Cisplatin. Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji efektivitas beberapa dosis dan dosis efektif dari PHPHB untuk mencegah perburukan PGK, memelihara dan meningkatkan fungsi ginjal. Pengetahuan yang didapat dari hasil penelitian ini adalah karakteristik formula, dosis efektif dan mekanisme kerja dari PHPHB untuk terapi diet para penderita PGK. Manfaat penelitian ini adalah untuk pengembangan dan aplikasi ilmu pengetahuan dalam terapi diet pada penderita PGK. Pemanfaatan kacang polong hijau Indonesia (*Pisum sativum*) dapat meningkatkan nilai tambah dan ekonomi dan mempertahankan keanekaragaman hayati Indonesia serta mengembangkan industri farmasi Indonesia.

Pada penelitian tahun pertama ini dilakukan uji efektivitas *in vivo* aktivitas PHPHB terhadap fungsi ginjal untuk memperoleh dosis efektif berdasarkan parameter: Ureum, Kreatinin, Profil lipid: kolesterol total, LDL dan Trigliserida, hematologi, berat organ dan histopatologi ginjal tikus model PGK yang diinduksi gentamycin serta mekanisme kerja dari protein hidrolisat kacang polong hijau ini berdasarkan parameter: *Superoxide Dismutase* (SOD), *Atrial Natriuretic Peptide* (ANP), Siklooksigenase 1 (COX-1) dan Renin.

Simpulan, PHPHB mempunyai efek mencegah perburukan PGK, memelihara dan meningkatkan fungsi ginjal, dengan dosis efektif 200mg/kgBB dan hipotesis mekanisme kerjanya adalah melalui aktivitas antioksidan SOD dan ANP. Penemuan ini akan dilanjutkan pada tahun berikutnya dengan menguji mekanisme kerja yang lain serta uji keamanan dari protein hidrolisat kacang polong hijau.

Kata kunci: protein hidrolisat, kacang polong hijau, bromelain, penyakit ginjal kronis

PRAKATA

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Mahakuasa atas rahmat, karunia serta perkenanNya jika kami memperoleh hibah PDUPT 2018 dengan judul " Potensi Hidrolisat Protein Kacang Polong Hijau untuk Penyakit Ginjal Kronis" ini.

Penyakit ginjal dapat menyerang semua usia baik yang sebelumnya menderita penyakit serius atau mengalami gangguan langsung pada ginjal itu sendiri. Nutrisi yang baik berperan penting dalam memelihara kesehatan serta menghambat progresivitas penyakit ginjal. Penderita perlu mendapat saran diet yang sebaiknya disantap serta menghindari bahan makanan dan minuman yang dapat memperberat penyakitnya.

Dalam pelaksanaan penelitian ini, kami banyak mendapat bantuan dan dukungan dari banyak pihak. Pada kesempatan ini kami ingin menyampaikan terima kasih dan penghargaan kepada semua pihak yang memberikan bantuan. Pertama, kami menghaturkan terima kasih atas kesempatan dan bantuan dana Hibah PDUPT 2018 Dikti RI yang telah diberikan. Ucapan terima kasih kami haturkan kepada Kemenristek Dikti Republik Indonesia, kepada Prof Armijn Z.R Langi selaku Rektor Universitas Kristen Maranatha, dan kepada LPPM UK Maranatha. Terima kasih atas kerjasama untuk mahasiswa Karya Tulis Ilmiah tahun 2018 yang berperan dalam penelitian, Gabriella Widya Arina, Silvia Somya, Ricki Febriansyah, Audrey Aurelia dan Destiya Ulfa Riany.

Akhir kata, kami berharap agar penelitian "Potensi Hidrolisat Protein Kacang Polong untuk Penyakit Ginjal Kronik" ini sungguh dapat bermanfaat bagi kemajuan ilmu pengetahuan, dunia penelitian serta peningkatan kesehatan masyarakat Indonesia, khususnya penderita penyakit ginjal. Semoga Tuhan Yang Mahakuasa memberkati semua hasil usaha dan pekerjaan kita semua. Amin.

Bandung, November 2018

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	0
HALAMAN PENGESAHAN	1
RINGKASAN	2
PRAKATA	3
DAFTAR ISI	4
DAFTAR TABEL	5
DAFTAR GAMBAR	6
DAFTAR LAMPIRAN	6
BAB 1. PENDAHULUAN	7
1.1 Latar belakang.....	7
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1 <i>State of The Art</i>	10
2.2 Kacang polong (<i>Pisum sativum</i>).....	11
2.3 Proses Hidrolisis Protein dan Hidrolisat Protein.....	13
2.4 Penyakit Ginjal Kronis.....	13
2.5 Mekanisme Kerja Protein Hidrolisat Kacang Polong dalam PGK.....	14
2.6 Kerangka Pemikiran.....	15
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	17
BAB 4. METODE PENELITIAN	19
4.1 Alat dan Bahan.....	19
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	19
4.3 Prosedur Penelitian.....	20
BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	26
BAB 6. RENCANA TAHAPAN SELANJUTNYA	53
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN	54
DAFTAR PUSTAKA	56
LAMPIRAN	58

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1. Tahap Perlakuan Tikus dan Jadwal Pemeriksaan Sampel Darah.....	30
Tabel 5.2. Hasil Pengolahan Data Indeks Organ.....	31
Tabel 5.3. Hasil Pengolahan Data Profil Hematologi.....	32
Tabel 5.4. Skor Median Degenerasi Tubulus Bengkak Keruh.....	34
Tabel 5.5. Skor Median Nekrosis Inti.....	35
Tabel 5.6 Skor Median <i>Hyaline Cast</i>	36
Tabel 5.7. Hasil Pengukuran Kadar Ureum.....	38
Tabel 5.8. Perubahan Kadar Ureum Serum.....	39
Tabel 5.9. Hasil Pengukuran Kadar Kreatinin Serum Tikus Wistar.....	39
Tabel 5.10. Perubahan Kadar Kreatinin Serum.....	40
Tabel 5.11. Analisis Statistika Kadar Rerata Kolesterol Total Serum.....	41
Tabel 5.12. Analisis Statistika Kadar Rerata LDL Serum.....	42
Tabel 5.13. Analisis Statistika Kadar Rerata Trigliserida Serum.....	43
Tabel 5.14. Hasil Pengukuran Kadar SOD dan Hasil Olah Data Statistik.....	45
Tabel 5.15. Rerata Pengukuran Kadar ANP, COX-1 dan Renin.....	47

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Pisum sativum</i>	10
Gambar 4.1 Alur Penelitian Dosis Efektif Protein Hidrolisat Kacang Polong Hijau Bromelain.....	20
Gambar 5.1. Buah Nanas dari Subang, Hasil Blender Nanas dan Filtrasi Nanas.....	26
Gambar 5.2 Kurva Baku Tryptophan.....	27
Gambar 5.3 Kurva Baku Kadar Protein BSA Standar.....	28
Gambar 5.4 Hasil SDS PAGE <i>Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder</i>	30
Gambar 5.5 Hubungan antara Skor Nekrosis Inti dengan Kelompok Perlakuan.....	35
Gambar 5.6 Hubungan antara Skor <i>Hyaline Cast</i> dengan Kelompok Perlakuan.....	36
Gambar 5.7 Gambaran Sediaan Histopatologis Ginjal Berdasarkan 3 Parameter.....	38
Gambar 5.8 Grafik Selisih Rerata Kadar Kolesterol Total H 35-H7.....	42
Gambar 5.9 Grafik Selisih Rerata Kadar LDL H 35-H7.....	43
Gambar 5.10 Grafik Selisih Rerata Kadar Trigliserida H 35-H7.....	44
Gambar 5.11. Rerata Hasil Pemeriksaan ANP H35 Homogenat Ginjal Tikus.....	47
Gambar 5.12. Rerata Hasil Pemeriksaan COX-1 H35 Homogenat Ginjal Tikus.....	48
Gambar 5.13. Rerata Hasil Pemeriksaan Renin H35 Homogenat Ginjal Tikus.....	48

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hak Cipta.....	58
Lampiran 2. Draft Artikel Ilmiah.....	59

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Penyakit Ginjal Kronik (PGK) adalah salah satu penyakit yang dapat menyebabkan gagal ginjal terminal, penyakit kardiovaskular (CVD) dan kematian. PGK dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti faktor genetik, aktivitas dan asupan makanan. PGK juga berkaitan erat dengan diabetes dan tekanan darah tinggi atau hipertensi yang mana sebanyak 39% PGK disebabkan oleh DM tipe I dan II yang tidak terkontrol dan 28% disebabkan oleh hipertensi (Hidayat, 2016). Selain hipertensi dan diabetes, ternyata obesitas atau kegemukan terbukti secara ilmiah meningkatkan risiko PGK. Penyakit ini bisa dicegah dengan pola makan sehat, olah raga dan pemeriksaan kesehatan secara rutin. Data Riset Kesehatan Dasar 2013 menunjukkan, prevalensi obesitas kelompok usia di atas 18 tahun mencapai 28,7 persen, sedangkan prevalensi gagal ginjal sebesar 0,2 persen (Kompas, 2017).

Salah satu butir Rencana Induk Penelitian Universitas Kristen Maranatha adalah Peningkatan kualitas hidup masyarakat secara holistik dalam bidang Kesehatan, Penyakit Tropik, Metabolik dan Degeneratif berbasis Herbal, Gizi dan pendekatan Medis lainnya. Di beberapa negara berkembang, termasuk Indonesia, angka kejadian PGK terus meningkat setiap tahunnya dan menimbulkan masalah baik dari segi sosial maupun ekonomi bagi penderita dan keluarga penderita (Prodjosudjadi dan Suhardjono, 2009). Di Indonesia diperkirakan terdapat 100 orang per sejuta penduduk atau sekitar 20000 kasus PGK baru dalam setahun. Sebagian besar penderita PGK datang mencari pertolongan saat sudah jatuh ke dalam stadium akhir, karena pada saat awal umumnya penyakit ginjal tidak menunjukkan gejala (Widiana, 2007). Oleh karena itu, penyakit ginjal kronis (PGK) sulit disembuhkan dan banyak penderita stadium akhir PGK terpaksa menjalani cuci darah seumur hidup atau perlu menjalani transplantasi ginjal. Hal yang menjadi masalah adalah tidak semua kebutuhan cuci darah penderita PGK terlayani karena keterbatasan unit mesin dialisis di rumah sakit-rumah sakit rujukan di Indonesia (Pernefri, 2013). Dalam *International Seminar on Phamacology and Clinical Pharmacy*, September 2016, menteri kesehatan RI, Prof Dr Nila Moeloek, memaparkan fakta bahwa angka kejadian PGK di Indonesia dalam beberapa tahun terakhir ini

mengalami peningkatan yang luar biasa, bahkan banyak penderita PGK yang masih berusia muda dan terpaksa harus menjalani dialisis sepanjang hidup selanjutnya. Beliau berpendapat kemungkinan ada pola makan dan gaya hidup yang keliru pada masyarakat Indonesia dewasa ini. Dengan demikian, beliau berpesan pada para ilmuwan untuk terus mencari terapi dan diet yang tepat untuk mengobati serta menjaga fungsi ginjal penderita PGK agar tidak memburuk (ISPCP, ITB 2016). Sekali seseorang mengalami PGK, walaupun baru mencapai stadium I, kondisi ginjalnya tidak bisa kembali normal. Upaya maksimal yang bisa dilakukan adalah memperlambat progresivitas kerusakannya. Oleh karena itu, pencegahan menjadi amat penting (Kompas, 2017).

Penelitian di Kanada menunjukkan bahwa protein dalam kacang polong kuning (*Pisum sativum* L.) dapat digunakan sebagai obat alami bagi tekanan darah tinggi dan penyakit ginjal kronis (PGK) atau *Chronic Kidney Disease* (CKD) (Li, 2011). Protein kacang polong digunakan sebagai produk makanan alami seperti aditif atau suplemen makanan untuk membantu jutaan orang di seluruh dunia yang menderita penyakit ini. Akan tetapi dalam tahap pemanfaatannya, hasil penelitian menunjukkan bahwa kacang polong kuning dalam keadaan alami tidak memberikan manfaat kesehatan sebaik ekstrak protein hidrolisat kacang polong kuning karena ternyata protein hanya dapat diaktifkan menggunakan enzim khusus (Hoskins, 2009).

Di Indonesia, kacang polong kuning (*Pisum sativum* L.) jarang didapat, bahkan kacang polong hijau belum umum ditanam petani Indonesia serta pemanfaatannya masih sangat terbatas. Di beberapa kota besar, kacang polong hijau dapat diperoleh di supermarket dalam bentuk beku atau dikemas dalam bentuk kaleng yang umumnya merupakan produk impor.

Berdasarkan fakta bahwa kacang polong dalam keadaan alami tidak akan memberikan manfaat kesehatan yang sama dengan protein hidrolisat dan protein dalam kacang hanya dapat diaktifkan dengan enzim khusus, maka dalam penelitian sebelumnya telah dilakukan preparasi pembuatan protein hidrolisat, digunakan 2 jenis enzim protease, yaitu Neutrase® dan Bromelain (enzim pemecah protein yang didapat dari buah nenas). Hidayat (2017) dalam penelitiannya mengemukakan protein hidrolisat kacang polong hijau Indonesia (*Pisum sativum*) dari perkebunan Magelang menggunakan enzim bromelain berpotensi baik sebagai

terapi bagi penderita PGK. Protein hidrolisat kacang polong hijau yang berasal dari Indonesia tersebut menunjukkan efek yang baik dalam memperbaiki fungsi ginjal tikus Wistar betina yang diinduksi Cisplatin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa parameter fungsi ginjal (Ureum dan Kreatinin) tikus kelompok kacang polong hijau dengan enzim bromelain menunjukkan hasil paling baik dibandingkan dengan protein hidrolisat kacang lain, yaitu kacang polong kuning Kanada, protein isolat polong kuning Kanada dan kacang Gude (baik yang menggunakan enzim Neurase maupun bromelain), tidak berbeda signifikan dengan kontrol negatif ($p > 0,05$) dan berbeda sangat signifikan dengan kontrol Cisplatin ($p < 0.05$).

Berdasarkan hal tersebut, pada penelitian ini akan dilakukan pengujian lebih lanjut dari protein hidrolisat kacang polong hijau (*Pisum sativum*) bromelain untuk mengetahui dosis efektif dan keamanannya sebagai terapi diet PGK.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *State of The Art*

Pada *state of the art* ini, diambil beberapa contoh penelitian terdahulu sebagai panduan ataupun contoh untuk penelitian yang dilakukan yang nantinya akan menjadi acuan dan perbandingan dalam melakukan penelitian ini.

Judul Jurnal	Pembahasan
<p><i>Blood Pressure Lowering Effect of a Pea Protein Hydrolysate in Hypertensive Rats and Humans</i></p> <p>Peneliti Huan Li, Natalie Prairie, Chibuike C. Udenigwe, Abayomi P. Adebisi, Paramjit S. Tappia, Harold M. Aukema, Peter J. H. Jones, and Rotimi E. Aluko</p> <p>Lokasi University of Manitoba, Kanada</p> <p>Tahun 2011</p> <p>Nama Jurnal Journal of Agricultural and Food Chemistry</p>	<p>Hasil Penelitian</p> <p>Jurnal ini meneliti efek dari protein kacang polong kuning Kanada yang digunakan sebagai obat alami bagi tekanan darah tinggi dan penyakit ginjal. Dalam keadaan alami kacang polong kuning ini tidak memberi manfaat kesehatan yang sama dengan ekstrak protein hidrolisat, karena protein dalam kacang hanya dapat diaktifkan dengan enzim khusus.</p> <p>Alasan menjadi Tinjauan Penelitian</p> <p>Pembahasan mengenai hidrolisat kacang tersebut memperkuat dasar teori dalam penelitian ini karena memiliki dampak positif terhadap penderita tekanan darah tinggi dan penyakit ginjal.</p>
<p><i>Determination of nutritional and bioactive properties of peptides in enzymatic pea, chickpea, and mung bean protein hydrolysates.</i></p> <p>Peneliti Aluko RE</p> <p>Nama Jurnal Journal of AOAC International</p>	<p>Hasil Penelitian</p> <p>Penelitian yang dilakukan terhadap hewan coba tikus, dosis kecil protein hidrolisat kacang polong terbukti menurunkan tekanan darah sebanyak 20%, memperbaiki fungsi ginjal yang ditunjukkan dengan peningkatan urin sebesar 30%, menurunkan kadar angiotensin II dan kadar renin sebesar 50%. Pengaturan pengeluaran renin oleh ginjal, akibat pemberian protein hidrolisat menghasilkan penurunan kadar Angiotensin II</p>

	sebesar 45% oleh perubahan sistem Renin Angiotensin Aldosteron (RAA).
<p><i>Potential of Pea Protein Hydrolysates as Antinephrotoxicity</i></p> <p>Authors: Meilinah Hidayat, Sijani Prahastuti, Teresa L Wargasetia, Vincentius Ferdi, Andreas A Soemardji, Siti F Rachmawati, Nova Suliska, Khomaini Hasan</p> <p>Accepted Jurnal Internasional: <i>Journal of Pharmaceutical Research and Sciences</i> September 2018</p> <hr/> <p><i>Green Peas Protein Hydrolyzed by Bromelain in Simple Procedure to Improve Kidney Function in Cisplatin-induced Rats</i></p> <p>Authors: Meilinah Hidayat, Sijani Prahastuti, Teresa L Wargasetia, Kirana Nugraha, Andreas A Soemardji, Siti F Rachmawati, Nova Suliska, Khomaini Hasan</p> <p>Accepted Jurnal Internasional: <i>Journal of Pharmaceutical Research and Sciences</i> September 2018</p>	<p>Hasil Penelitian</p> <p>Dari hasil uji Kunitz: Aktivitas enzim Neutrase: 40.650 U / mg dan Bromelain: 35.773 U / mg, aktivitas spesifik total antara kedua enzim hampir sama.</p> <p>Dari hasil SDS PAGE: Protein hidrolisat yang menggunakan enzim neutrase umumnya memiliki rentang berat molekul yang lebar mulai dari <14,4 kDa sampai 25,0 kDa. Protein hidrolisat yang menggunakan enzim bromelain umumnya memiliki rentang berat molekul kecil, yaitu di bawah 14,4 kDa.</p> <p>Uji pada hewan coba: Pemberian protein hidrolisat (kacang polong hijau Indonesia, kacang polong kuning Kanada, protein isolat polong kuning Kanada dan kacang Gude, masing2 menggunakan enzim Neutrase atau bromelain), pada 10 kelompok perlakuan tikus Wistar betina yang diinduksi Cisplatin: menggunakan parameter fungsi ginjal (Ureum dan Kreatinin), tikus kelompok kacang polong hijau dengan enzim bromelain menunjukkan hasil paling baik dibandingkan dengan protein hidrolisat kacang lain, tidak berbeda signifikan dengan kontrol negatif ($p > 0,05$) dan berbeda sangat signifikan dengan kontrol Cisplatin ($p < 0,05$).</p> <p>Kesimpulan penelitian, hidrolisat protein dari kacang polong hijau menggunakan bromelain menunjukkan hasil paling baik dalam memperbaiki fungsi ginjal tikus Wistar yang diinduksi dengan Cisplatin.</p>

2.2 Kacang polong (*Pisum sativum*)

Pisum sativum adalah tanaman yang termasuk ke dalam famili Fabaceae yaitu polong-polongan. Protein kacang dapat digunakan sebagai produk makanan alami seperti aditif atau suplemen makanan sebagai terapi bagi penderita PGK. Kacang polong kuning dianggap

sebagai "superstar nutrisi" karena tinggi protein, serat, vitamin dan rendah lemak serta bebas kolesterol.

Klasifikasi tanaman kacang polong (*Pisum sativum*).



Gambar 2.1 *Pisum sativum*

Kerajaan	<u>Plantae</u>
Filum	<u>Tracheophyta</u>
Kelas	<u>Magnoliopsida</u>
Bangsa	<u>Fabales</u>
Famili	<u>Fabaceae</u>
Genus	<u><i>Pisum</i></u>
Spesies	<i>Pisum sativum</i>

Pada orang dengan tekanan darah tinggi, protein hidrolisat polong berpotensi menunda atau mencegah timbulnya kerusakan ginjal sehingga bisa membantu penderita penyakit ginjal hidup lebih lama dengan tekanan darah terkontrol (Li, 2011).

Prosedur dalam penelitian tersebut: Ekstrak hidrolisat protein dari kacang polong kuning diberikan dalam dosis kecil setiap hari pada tikus laboratorium yang dibuat menjadi sakit ginjal polikistik. Setelah 8 minggu pemberian protein kacang, tikus menunjukkan penurunan tekanan darah sebesar 20% dibandingkan dengan tikus yang hanya diberi diet normal. Mayoritas penderita PGK meninggal karena komplikasi kardiovaskular yang timbul dari tekanan darah tinggi yang terkait dengan kerusakan ginjal (Hoskins, 2009). Pada tikus dan manusia, penyakit ginjal polikistik *output* urin sangat berkurang, hal ini menyebabkan ginjal tidak mampu membersihkan tubuh dari racun. Dalam penelitian tersebut tikus yang diberi ekstrak kacang polong kuning menunjukkan peningkatan produksi urine sebesar 30%, mengembalikan ke tingkat normal selain itu tikus tidak menunjukkan efek samping dari asupan protein kacang polong (Li, 2011).

Mekanisme protein kacang polong menurunkan tekanan darah adalah dengan merangsang produksi COX-1 (cyclooxygenase-1), protein yang dapat meningkatkan fungsi ginjal, bekerja serupa dengan obat anti hipertensi ACE inhibitor. Akan tetapi zat aktif dalam kacang polong ini masih perlu diteliti (Li, 2011).

2.3 Proses Hidrolisis protein dan Hidrolisat Protein

Hidrolisis diartikan sebagai pemecahan banyak ikatan menjadi ikatan lebih kecil dan sederhana (Kirk dan Othmer, 1953). Pada hidrolisis, ikatan antara dua atom dipecah. Reaksi hidrolisis protein dapat dibagi dalam beberapa tipe, yaitu: Hidrolisis murni; Hidrolisis dengan larutan asam; Hidrolisis dengan larutan alkali; Hidrolisis dengan peleburan alkali yang menggunakan air atau tanpa air pada temperatur tinggi; Hidrolisis dengan enzim sebagai katalisator (Purbasari, 2008).

Hasil hidrolisis protein berupa suatu hidrolisat yang mengandung peptida dengan berat molekul lebih rendah dan asam amino bebas (Purbasari, 2008). Hidrolisat protein dapat diperoleh dari hidrolisis enzimatik protein sumber makanan, seperti protein kedelai, susu (misalnya, *whey*, *kasein*), gandum, canola, jagung, protein nabati, dan protein hewani. Berat molekul hidrolisat protein rata-rata sekitar 2.000 sampai sekitar 10.000 Dalton. Produk hidrolisat mempunyai kelarutan yang tinggi dalam air, kapasitas emulsinya baik, kemampuan mengembang besar serta mudah diserap tubuh (Fox *et al.*, 1991).

Produk hidrolisat protein secara umum mempunyai kelebihan yaitu daya larut tinggi dan kondisinya stabil. Hidrolisat protein digunakan untuk memperbaiki karakteristik berbagai produk pangan, sebagai penyedap rasa, sebagai lanjutan isolasi asam amino serta untuk pengobatan selain itu juga sering digunakan sebagai menu diet bagi para penderita gangguan pencernaan (Purbasari, 2008).

2.4 Penyakit Ginjal Kronis

Penyakit ginjal kronis (PGK) merupakan penyakit yang berkaitan dengan meningkatnya morbiditas dan mortalitas kardiovaskuler. Indonesia belum memiliki sistem pencatatan yang lengkap namun insidensi kasus PGK di diperkirakan mencapai 100 orang per juta penduduk atau sekitar 20000 kasus baru PGK terjadi dalam setahun (Widiana, 2007).

Penyakit ginjal kronis (PGK) didefinisikan sebagai kelainan dan kerusakan fungsi ginjal yang ditandai dengan berkurangnya laju filtrasi glomerulus di bawah 60mL/menit/1.73m² atau di atas nilai tersebut disertai dengan kelainan sedimen urin (Levin *et al.*, 2008).

Penyakit ginjal kronis (PGK) disebabkan oleh banyak faktor namun umumnya kebanyakan dari kasus PGK pada orang dewasa terutama disebabkan oleh diabetes mellitus, penyebab kedua terbanyak adalah hipertensi. Penyebab lain PGK adalah glomerulonefritis, infeksi ginjal baik oleh bakteri maupun virus dan sumbatan batu ginjal.

2.5. Mekanisme Kerja Protein Hidrolisat Kacang Polong dalam PGK

Kacang polong kuning Kanada (*Pisum sativum* L.) dalam keadaan alami tidak memberikan manfaat kesehatan yang sama dengan ekstrak protein hidrolisat, karena protein dalam kacang hanya dapat diaktifkan dengan enzim khusus. Mekanisme protein hidrolisat kacang polong memperbaiki fungsi organ ginjal adalah dengan menurunkan tekanan darah lewat mekanisme serupa ACE inhibitor, yaitu merangsang produksi COX-1 (*cyclooxygenase-1*), protein yang dapat menurunkan tekanan darah, sehingga hipertensi sebagai faktor risiko penyakit PGK dapat dikendalikan dan meningkatkan fungsi ginjal (Li, 2011). Protein hidrolisat dengan berat molekul rendah secara teori akan mengaktifkan jalur COX – 1. Siklooksigenase merupakan enzim terikat membran yang ditemukan dalam retikulum endoplasmik dan membran inti. Siklooksigenase terdapat dalam dua bentuk, yaitu Siklooksigenase 1 dan Siklooksigenase 2. Secara garis besar Siklooksigenase 1 (COX – 1) esensial dalam pemeliharaan berbagai fungsi dalam kondisi normal di berbagai jaringan, khususnya ginjal, saluran cerna dan trombosit (Syarif, 2007).

Menurut Hoskins (2009), hidrolisat protein kacang polong (*Pisum sativum* L.) mengandung inhibitor *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE). ACE merupakan komponen utama dalam *renin-angiotensin system* (RAS) yang mengatur tekanan dengan meregulasi volume cairan tubuh. Pada penelitian terhadap hewan coba tikus, dosis kecil protein hidrolisat kacang polong menurunkan tekanan darah sebanyak 20%, memperbaiki fungsi ginjal yang ditunjukkan dengan peningkatan urin sebesar 30%, menurunkan kadar angiotensin II dan kadar renin sebesar 50%. Pengaturan sekresi renin oleh ginjal, akibat pemberian protein hidrolisat menghasilkan penurunan kadar Angiotensin II sebesar 45% oleh perubahan RAA sistem (Aluko, 2008).

Kerusakan ginjal berhubungan dengan banyak faktor, antara lain hiperaktivasi

Angiotensin Converting Enzyme (ACE) dan Renin dalam Renin-angiotensin system (RAS), Calmodulin Phosphodiesterase 1 (CaMPDE) dan *Atrial Natriuretic peptide* (ANP). Target utama peptida antihipertensi adalah renin dan ACE (Santos-Araújo, C., 2015) (Aluko, 2015b). ANP disebut sebagai salah satu peptida yang terbukti memiliki efek pada hipertensi dan ekspansi volume plasma (Levin, Gardner, & Samson, 1998). ANP merupakan komponen utama dalam aksis jantung-ginjal yang berperan dalam kondisi penurunan hemodinamik jantung, meningkatkan ekskresi Sodium untuk memperbaiki tekanan darah dan fungsivaskular. ANP meningkat pada pasien PGK yang rumit dengan fungsi ginjal yang memburuk, tetapi hubungan kadar plasma ANP dengan kerusakan PGK masih perlu diselidiki (Saito, 2010)(Santos-Araújo, C., Leite-Moreirab, A., Pestana, 2015). Efek perlindungan ANP pada ginjal adalah dengan cara menghambat proliferasi sel mesangial dan mekanisme fibrosis ginjal (Ogawa, Komura, Kuwasako, Kitamura, & Kato, 2015). Nilai prediktif ANP sebagai penanda PGK dalam kasus penyakit jantung dan pembuluh darah, belum baku dan masih kontroversial (de Chatel, Mako, Toth, Barna, & Lang, 1991)

2.6 Kerangka Pemikiran

Di Indonesia, jumlah penderita PGK terus meningkat setiap tahun sehingga perlu ditemukan terapi untuk menurunkan jumlah penderita PGK di Indonesia. Hasil penelitian di Kanada menemukan bahwa protein hidrolisat kacang polong kuning dapat menjadi obat alami terhadap tekanan darah tinggi dan penyakit ginjal kronis atau *Chronic Kidney Disease* (PGK) (Li, 2011). Fakta bahwa kacang polong dalam keadaan alami tidak akan memberikan manfaat kesehatan yang sama dengan protein hidrolisat dan protein dalam kacang hanya dapat diaktifkan dengan enzim khusus. Hasil penelitian sebelumnya enzim protease, yaitu Bromelain (enzim pemecah protein yang didapat dari buah nenas) dapat memecah protein yang terdapat dalam kacang polong hijau. Kacang polong hijau memiliki kandungan nutrisi yang tidak jauh berbeda dari kacang polong kuning Kanada. Mekanisme protein hidrolisat dalam kacang polong hijau menurunkan tekanan darah adalah protein hidrolisat dengan berat molekul kecil akan merangsang produksi COX-1, selain itu dihipotesiskan bahwa protein hidrolisat mampu meningkatkan ANP serta menurunkan produksi renin, dalam sistim Renin

Angiotensin, sehingga peningkatan tekanan darah dapat dicegah. Mekanisme protein hidrolisat dalam kacang polong hijau memperbaiki fungsi ginjal adalah melalui aktivitas antioksidan yang diperiksa berdasarkan parameter SOD.

BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan

3.1.1 Tujuan Umum

Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji aktivitas protein hidrolisat kacang polong hijau (*Pisum sativum*) untuk mencegah perburukan PGK, memelihara dan meningkatkan fungsi ginjal. Pengetahuan yang didapat dari hasil penelitian ini adalah karakteristik formula, dosis efektif dan mekanisme kerja dari protein hidrolisat kacang polong hijau (*Pisum sativum*) yang dihidrolisis menggunakan bromelain untuk terapi diet para penderita PGK.

3.1.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus penelitian tahun pertama ini yaitu:

1. Menguji karakteristik dan membuat protein hidrolisat dari kacang polong hijau (*Pisum sativum*), kacang gude (*Cajanus cajan*) menggunakan enzim bromelain.
2. Mengetahui efek beberapa dosis dan dosis paling efektif dari protein hidrolisat kacang polong hijau yang dihidrolisis menggunakan enzim bromelain secara *in vivo* pada tikus normal dan tikus model PGK yang diinduksi dengan Gentamycin. Parameter yang diperiksa: Ureum, Kreatinin, profil hematologi: Hb, Ht, profil Lipid: Kolesterol total, Trigliserida, LDL, Hb, uji serologis ANP, COX-1 dan Renin, Berat organ jantung, ginjal; serta histopatologi ginjal.

3.2. Manfaat Penelitian

Sesuai dengan pelaksanaan Rencana Induk Penelitian Universitas Kristen Maranatha, peningkatan kualitas hidup masyarakat Indonesia sangat penting dilakukan. Terapi berbasis Herbal dan Gizi akan sangat menunjang kesehatan masyarakat, khususnya penderita PGK.

Diharapkan dari hasil penelitian ini, diperoleh pengetahuan mengenai protein hidrolisat kacang polong hijau (*Pisum sativum*) yang dapat bermanfaat untuk terapi diet bagi para penderita PGK sehingga fungsi ginjalnya tidak memburuk dan tidak jatuh ke dalam gagal ginjal kronis sehingga memerlukan tindakan dialisis seumur hidup atau transplantasi organ ginjal. Manfaat penelitian ini adalah untuk pengembangan dan aplikasi ilmu pengetahuan dalam terapi diet pada penderita PGK. Pemanfaatan hidrolisat kacang polong hijau Indonesia (*Pisum sativum*) dapat meningkatkan nilai tambah dan ekonomi dan mempertahankan keanekaragaman hayati Indonesia serta mengembangkan industri farmasi Indonesia.

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Alat dan Bahan

A. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *beaker glass*, timbangan analitik, tabung eppendorf, stirrer *flowcytometry*, penangas air, *stopwatch*, sentrifugal, tips pipet 1-10 μ l, tips pipet 10-100 μ l, tips pipet 100-1000 μ l, micropipette, *biosafety cabinet*, Inkubator CO₂, Tube Falcon 15ml, Tube Falcon 50ml, *Cryo tank*, *deep freezer*, *96 well plate*, spektrofotometer, *Flask* kultur, pisau bedah, spuit, kelereng, sonde, microtome, kaca objek, dan mikroskop.

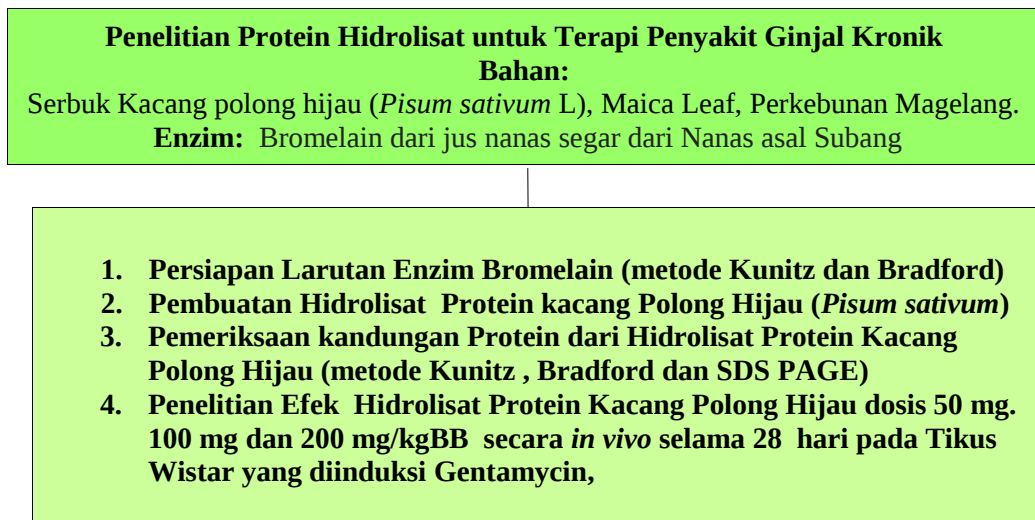
B. Bahan

Kacang Hijau (*Pisum sativum* L) dari Maica leaf, Perkebunan Magelang, Jawa Tengah, Indonesia. Enzim Bromelain diperoleh dari sari nanas (*Ananas sativus*) dari Subang, Bandung Utara Indonesia. Gentamicyn 80 mg untuk injeksi / intra peritoneal dibeli dari toko obat lokal. SOD Aktivitas Colorimetric Assay Kit (BioVision Incorporated, USA K335), kit Reagen dari ANP (QY-E11002), COX-1 (QY-E10736), dan Renin (QY-11096) dari Qayee-bio untuk metode ELISA, buffer 10xRIPA (ab 156034) dan protease and phosphatase inhibitor cocktail (ab 201119).

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Pusat Penelitian Kimia Singaperbangsa Bandung, Laboratorium Farmakologi, Sekolah Farmasi Institut Teknologi Bandung. Laboratorium Patologi Klinik Rumah Sakit Dr Hasan Sadikin- Univeristas Padjadjaran Bandung, Laboratorium Puri Medika Purwakarta. Penelitian berlangsung sejak bulan April 2018 hingga September 2018.

4.3 Prosedur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian Dosis Efektif Protein Hidrolisat Kacang Polong Hijau Bromelain

4.3 Persiapan Pembuatan Hidrolisat Protein Kacang Polong Hijau

4.3.1 Persiapan Larutan Enzim Bromelain

Disiapkan 1 buah nanas asal Subang yang belum terlalu matang. Selanjutnya nanas diblender lalu disaring (filtrasi) menggunakan kertas saring kemudian didapat larutan bromelain.

4.3.2. Tahap Pembuatan Protein Hidrolisat

Kacang polong hijau (*Pisum sativum*) Maica Leaf dari Magelang dibuat menjadi serbuk selanjutnya disaring menggunakan MESH 120. Serbuk kacang dihidrolisis menggunakan enzim Bromelain dari jus nanas segar dari Nanas asal Subang. Serbuk kacang yang telah disaring melalui saringan MESH no 120, ditimbang 900g dan dimasukkan ke dalam 2 botol gelas, ditambahkan 200 ml setelah ditambahkan 10% dari berat serbuk yaitu 90 ml larutan enzim Bromelain. Penambahan bromelain sebanyak 10% (berdasarkan penelitian Restiani R, 2016 yang menyatakan konsentrasi enzim bromelain sebesar 10% menghasilkan derajat hidrolisis (DH) tertinggi pada penelitian hidrolisis secara enzimatis protein bungkil biji

nyamplung (*Calophyllum inophyllum*). Kemudian dibiarkan selama 72 jam (berdasarkan Hale LP, 2005: aktivitas proteolitik dari larutan bromelain relatif tetap stabil minimal 1 minggu pada suhu kamar), pada pengaduk pada suhu kamar (25 °C) (Berdasarkan penelitian Poh SS, 2011: aktivitas enzimatik bromelain menurun secara bertahap mulai 25°C hingga 95 °C, stabil di suhu kamar); berdasarkan penelitian Li, 2011, modifikasi prosedur Huan Li (Li et al., 2011). Setelah 72 jam, cairan yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung falcon dan disentrifugasi pada 6000g selama 10 menit. Cairan supernatan diambil, dan disaring menggunakan kertas saring.

4.3.3 Pengukuran Aktivitas Spesifik Total Enzim Bromelain

Pada tahap pertama dilakukan pengukuran aktivitas spesifik total dari enzim yang dipakai untuk pembuatan protein hidrolisat, yaitu bromelain.

4.3.3.1 Pengukuran konsentrasi protein dengan metode Bradford (Harlow, 2016).

Bradford protein assay adalah prosedur analisis spektroskopi yang digunakan untuk mengukur konsentrasi protein dalam larutan. Total aktivitas enzim spesifik adalah aktivitas enzim yang dibagi dengan jumlah produk protease dalam larutan. Pertama ditentukan kandungan protein enzim dengan uji Kunitz, selanjutnya dibuat kurva Tryptophan untuk mencari kesetaraan antara protein yang diperiksa dengan protein Tryptophan karena mempunyai panjang gelombang yang sama. Terakhir hasil yang didapat diproyeksikan ke dalam persamaan kurva Bradford, untuk menghitung berapa banyak kandungan protein di dalam larutan.

4.3.3.2 Uji Kunitz (uji protease)

Tujuan dari pengujian ini adalah untuk mengetahui aktivitas enzim total. Sebanyak 900 µL aquadest dimasukkan ke dalam tabung falcon 15 mL. Kemudian, sebanyak 500 µL kasein 0,1% (b/v) ditambahkan ke aquadest. Setelah itu, sebanyak 100 µL enzim bromelain ditambahkan ke larutan dan diinkubasi pada suhu 37 ° C selama 30 menit. Setelah inkubasi, 500 µL TCA (Asam Trikloroasetat) 10% (b / v) ditambahkan ke larutan. Endapan dan

supernatan yang terbentuk dalam larutan dipisahkan dengan menggunakan metode sentrifugasi pada laju 6000 G selama 10 menit pada suhu 4 °C. Supernatan dimasukkan ke kuartet kuarsa 1 mL dan diukur serapan pada panjang gelombang **280 nm** dengan menggunakan visual spektrofotometer UV.

4.3.3.3 Pembuatan Kurva Baku Tryptophan

Pertama TSS standar 3,2 mg/3mL aquadest diencerkan menjadi 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; Dan 0,1 mg / mL dengan pengenceran bertingkat. Selanjutnya, sebanyak 30 µL TSS standar dalam 1 mL plastic cuvette ditambahkan 1 mL *Bradford Protein Assay Dye Reagent*, diguncang, dan dibiarkan selama 5 menit pada suhu kamar. Setelah itu, absorbansi diukur pada panjang gelombang 280 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, kemudian diperoleh kurva standar dengan persamaan regresi ($y = bx + a$). Prosedur ini dilakukan dua kali, dan hasil absorbansi dimasukkan ke dalam kurva baku tryptophan.

4.3.3.4 Pembuatan kurva baku *Bovine Serum Albumin (BSA)* standar

BSA sandard sebanyak 2 mg/mL diencerkan menjadi 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; dan 0,1 mg / mL dengan pengenceran bertingkat. Selanjutnya, sebanyak 30 µL BSA standar dalam 1 mL plastic cuvette ditambahkan 1 mL *Bradford Protein Assay Dye Reagent*, diguncang, dan dibiarkan selama 5 menit pada suhu kamar. Setelah itu, absorbansi diukur pada panjang gelombang 595 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Prosedur BSA ini dilakukan dua kali, kemudian hasilnya dimasukkan ke dalam kurva BSA dengan persamaan regresi ($y = bx + a$).

4.3.4 Prosedur Karakterisasi Protein Menggunakan *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)*

- Pembuatan Larutan
- Pembuatan Gel

- Preparasi Sampel

4.3.4.1 Elektroforesis

Gel yang sudah memadat dimasukkan ke dalam *chamber* elektroforesis dan ditambahkan *running buffer* (bufer elektroforesis SDS-PAGE pH 8,3). Sebanyak 25 μ L sampel dimasukkan ke dalam sumur pada gel. Elektroforesis dilakukan pada tegangan tetap 100 V selama 100 menit. Marka protein, sebagai standar, dimasukkan ke salah satu sumur pada gel. Alat elektroforesis dipadamkan setelah *blue dyes* berjarak sekira 0,5 cm di atas ujung bawah gel.

4.3.4.2 Staining dan Destaining

Gel dikeluarkan dari plat kaca kemudian dicuci 3 kali selama 5 menit dalam 20 mL air, lalu diinkubasi dalam larutan *staining* (*coomassie brilliant blue* 0,25 % b/v, asam asetat glasial 10 % v/v, metanol 45 % v/v, dan akuades) hingga terendam (selama 18 jam). Kemudian gel dipindahkan ke dalam larutan *destaining* (asam asetat glasial 10 % v/v glasial, metanol 45 % v/v, dan akuades) dan dibiarkan sampai pita-pita pada gel menjadi jelas (60 menit sampai semalam). Gel yang sudah bersih dipindai dan ditentukan berat molekul proteinnya dengan cara dibandingkan terhadap marka protein.

Penelitian tahun pertama ini dilakukan uji *in vivo* aktivitas protein hidrolisat kacang polong hijau enzim bromelain parameter ANP, *renin* dan COX- 1, dan uji *in vivo* efektivitas beberapa dosis protein hidrolisat kacang polong hijau enzim bromelain pada tikus model PGK dengan parameter fungsi ginjal (Ureum, Kreatinin), profil lipid Kolesterol Total, LDL, Trigliserida, hematology dan histopatologis organ ginjal.

4.4. Pemilihan Subjek Penelitian, Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Hewan coba yang digunakan adalah tikus Wistar jantan yang sehat, usia sekitar 2 bulan, berat 200 – 300 gram sebanyak 30 ekor, yang akan dikelompokkan secara acak ke dalam 5 kelompok: $(t - 1)(r - 1) \geq 15$ $4r - 4 \geq 15$ $4r \geq 19$

Replikasi = minimal 4 ekor; untuk cadangan ditambah 20%, jadi 5 ekor.

4.5. Prosedur Kerja Penelitian In vivo

Semua Kelompok diinduksi Gentamycin 80 mg/kgBB selama 7 hari, kecuali kelompok kontrol Sehat (K IV). Selanjutnya Kelompok Perlakuan diberi perlakuan selama 28 hari.

- I. Protein Hidrolisat Kacang Polong Hijau dosis 50 mg/kgBB
- II. Protein Hidrolisat Kacang Polong Hijau dosis 100 mg/kgBB
- III. Protein Hidrolisat Kacang Polong Hijau dosis 200 mg/kgBB
- IV. Kontrol Sehat (=Kontrol Normal= Kontrol Negatif) Pelarut CMC 0,5%
- V. Kontrol Sakit (Kontrol positif = hanya induksi Gentamycin)
- VI. Kontrol Simvastatin 10 mg/kgBB pelarut CMC 0,5%
- VII. Kontrol Fenofibrate 300 mg/kgBB pelarut CMC 0,5%
- VIII. Kontrol Ketosteril 630 mg/kgBB pelarut CMC 0,5%
- IX. Kontrol Vitamin E 200 IU pelarut CMC 0,5%

Parameter yang diperiksa: bobot badan, pemeriksaan pemantauan fungsi ginjal, dengan parameter Ureum/Kreatinin, profil Lipid: Kolesterol total, Trigliserida, LDL, diperiksa menggunakan metode kolorimetri dengan alat Cobas ROCHE 311; hematologi, dengan alat hematoanalyzer; berat organ, dengan timbangan analitik histopatologi organ ginjal tikus Wistar jantan dari preparat yang diwarnai Haematoksilin Eosin, uji serologis ELISA: SOD, ANP, COX-1, Renin dilihat menggunakan spektrofotometri.

4.6. Pengujian Kadar SOD, ANP, COX-1 dan Renin

Prosedur pengujian kadar SOD, ANP, COX-1 dan Renin adalah sebagai berikut, 100 μ L standar atau sampel dimasukkan pada setiap well dan selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit. Semua cairan dipindahkan dan ditambahkan 100 μ L Biotinylated Detection Ab pada setiap well dan inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Semua larutan dalam well dibuang, dan plate dicuci sebanyak 3x menggunakan *wash buffer*. 100 μ L HRP Conjugate ditambahkan pada setiap well dan inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Semua larutan dalam well dibuang, dan plate dicuci sebanyak 5x menggunakan *wash buffer*.

90 μ L substrat reagen ditambahkan pada setiap *well* dan inkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. 50 μ L stop solution ditambahkan pada setiap well dan absorbansi dibaca pada panjang gelombang 450nm.

BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1 Penelitian Dosis Efektif Protein Hidrolisat Kacang Polong Hijau

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan dosis efektif dari beberapa dosis protein hidrolisat terhadap organ ginjal dan kadar penanda kerusakan fungsi ginjal tikus Wistar jantan yang ginjalnya dibuat terganggu dengan cara diinduksi Gentamycin. Parameter yang diperiksa:

- Ureum Kreatinin
- Profil lipid: Kolesterol, Triglicerida, dan LDL
- Hemoglobin, Hematokrit, profil Hematologi lain
- Berat organ ginjal
- Kadar Antioksidan *Super Oxyde Dismutase* (SOD)
- Kadar Atrial Natriuretic Peptide (ANP), Cyclooxygenase-1 (COX-1), dan Renin pada homogenat jaringan ginjal dengan metode ELISA

5.2 Persiapan Pembuatan Hidrolisat Protein Kacang Polong Hijau

5.2.1 Persiapan Larutan Enzim Bromelain



Gambar 5.1 Buah Nanas dari Subang, Hasil Blender Nanas dan Filtrasi Nanas (Dokumentasi pribadi).

5.2.2 Pengukuran Aktivitas Spesifik Total Enzim Bromelain

Pada tahap pertama dilakukan pengukuran aktivitas spesifik total dari enzim yang dipakai untuk pembuatan protein hidrolisat, yaitu bromelain.

5.2.2.1 Pengukuran konsentrasi protein dengan metode Bradford (Harlow, 2016).

5.2.2.2 Uji Kunitz (uji protease)

Dilihat dengan panjang gelombang A280 bromelain: 0,626

Aktivitas total bromelain (U) = aktivitas bromelain (U/mL) x V total enzim (mL)

Aktivitas total bromelain (U) = 208,07 U/mL x 246 mL

5.2.2.3 Pembuatan Kurva Baku Tryptophan

Hasil Pengukuran Tryptophan pada Panjang Gelombang 280 nm

Gambar 5.2 Kurva Baku Tryptophan
Persamaan: $y = 24,44x + 0,481$

5.2.2.4 Perhitungan Aktivitas spesifik Bromelain

$$\text{Aktivitas spesifik bromelain (U/mg)} = \frac{\text{Aktivitas Total Bromelain (U)}}{\text{Protein Total Bromelain (mg)}}$$

$$\text{Aktivitas spesifik bromelain (U/mg)} = \frac{51.185,22 \text{ U}}{90,282 \text{ mg}}$$

$$\text{Aktivitas spesifik bromelain} \left(\frac{\text{U}}{\text{mg}} \right) = 556,94 \text{ U/mg}$$

Jadi, total aktivitas spesifik bromelain sebesar 556,94 U/mg.

5.2.2.5 Pembuatan kurva baku *Bovine Serum Albumin* (BSA) standar **Hasil Pengukuran BSA pada panjang gelombang 595 nm**

Gambar 5.3 Kurva Baku Kadar Protein BSA Standar
Persamaan: $y = 1,3376x + 0,1471$

Perhitungan konsentrasi bromelain (mg/mL)

A₅₉₅ bromelain : 0,638

$y = bx + a$ dimana $y = 1,3376x + 0,1471$ (y : A₅₉₅ dan x : konsentrasi (mg/ml))

$$0,638 = 1,3376x + 0,1471$$

$$x = 0,3670 \text{ mg/mL}$$

Jadi kadar protein bromelain adalah 0,3670 mg/mL

Kadar protein total bromelain (mg) = kadar protein bromelain (mg/ml) x V total enzim (mL)

Kadar protein total bromelain (mg) = 0,3670 mg/mL x 246 mL

Kadar protein total bromelain (mg) = 90,282 mg

5.3.2 Hasil Perhitungan Jumlah Kandungan Protein Hidrolisat Protein

Kacang Polong Hijau dengan metode Bradford

Setelah 72 jam dibiarkan di atas stirrer dalam suhu ruangan, jumlah total produk larutan, pH dan jumlah protease dihitung berdasarkan persamaan BSA. Jumlah protein dihitung dengan membagi absorbansi sampel hidrolisat pada diencerkan 50x (0,02 sampel + 0,98 aquadest) pada panjang gelombang A280 dengan persamaan BSA. Hasilnya adalah sebagai berikut:

$$y = bx + a$$

$$y = 1,3376x + 0,1471 \text{ (y : A595 dan konsentrasi (mg/x : ml))}$$

$$1,452 = 1,3376x + 0,1471$$

$$x = 0,9756 \text{ mg/mL}$$

$$x = 0,9756 \text{ mg/mL} \times 50 = 48,778 \text{ mg/mL}$$

Kandungan protein dalam PHPHB adalah **48,778 mg/mL**

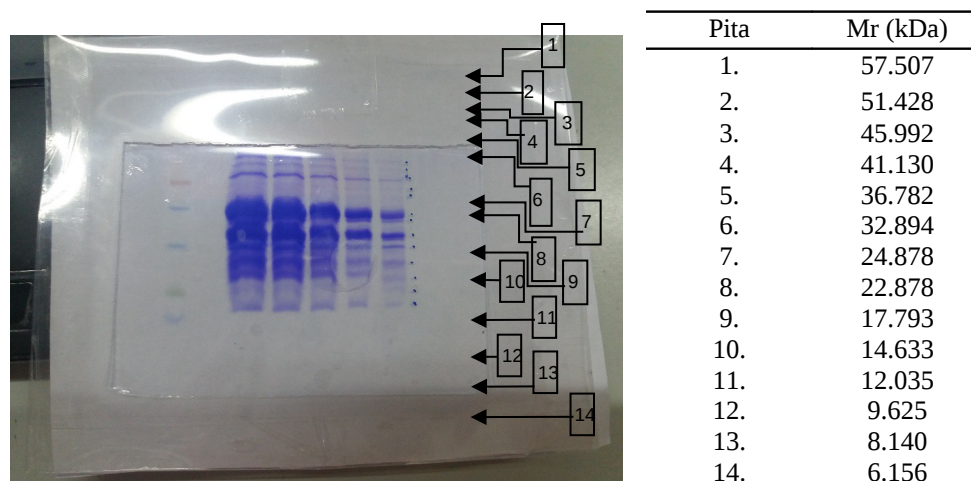
Pada penelitian ini diperoleh 800 mL larutan, maka didapat

$$48,778 \text{ mg/mL} \times 800 \text{ mL} = 39,022,12 \text{ mg}$$

Jumlah protein hidrolisat protein kacang polong hijau adalah 39,02 gram

Serbuk kacang polong hijau (*Pisum sativum*) memiliki kandungan protein yang sangat tinggi sehingga pita yang tampak kurang begitu jelas dan bertumpuk. Demikian pula dengan hidrolisat protein kacang polong hijau (*Pisum sativum*) botol A, hidrolisat protein kacang polong hijau (*Pisum sativum*) botol B, hidrolisat protein kacang polong hijau (*Pisum sativum*) botol A & B dan Larutan enzim bromelain; semuanya memiliki kandungan protein yang sangat tinggi sehingga pita yang tampak kurang begitu jelas dan sulit diinterpretasi. Dengan demikian perlu dilakukan pengenceran.

Untuk memperjelas hasil pita dengan berat molekul rendah, protein hidrolisat diperiksa kembali menggunakan SDS PAGE *Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder*. Hasil Running SDS PAGE dari PHPHB beberapa pengenceran (dari kiri ke kanan: tanpa pengenceran, pengenceran 10x, 20x, 30x, 40x) menggunakan konsentrasi gel 15%, Voltase 90 V, Waktu 120 menit adalah sebagai berikut:



Gambar 5.4. Hasil SDS PAGE *Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder*

Hasil SDS PAGE *Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder*, diperlihatkan dalam gambar 5.6 bahwa PHPHB memiliki 3 buah pita yang lebih kecil dari 10 kDa, yaitu 9,625 kDa, 8,140 kDa dan 6,156 kDa.

Berikut adalah Tahap Perlakuan Tikus dan Jadwal Pengambilan Sampel Darah

Tabel 5.1 Tahap Perlakuan Tikus dan Jadwal Pemeriksaan Sampel Darah

Induksi Gentamycin 7 hr		Perlakuan selama 4 minggu			
Data Baseline	Minggu 0	Minggu I	Minggu II	Minggu III	Minggu IV
	7 hari.	7 hari.	7 hari.	7 hari.	7 hari.
H0	H7	H14	H21	H28	H35

12/3/2018	19/3/2018	26/3/2018	2/4/2018	9/4/2018	16/4/2018
Pemeriksaan I	Pemeriksaan II	Pemeriksaan III	Pemeriksaan IV	Pemeriksaan V	Pemeriksaan VI
Ureum	Ureum	Ureum	Ureum	Ureum	Ureum
Kreatinin	Kreatinin	Kreatinin	Kreatinin	Kreatinin	Kreatinin
Kolesterol Total	Hematologi				Hematologi
LDL	Kolesterol Total				Kolesterol Total
Trigliserida	LDL				LDL,
SOD	Trigliserida				Trigliserida
	SOD				SOD
					ANP, COX-1 dan Renin

5.4. Bobot Badan

Bobot badan tiap tikus ditimbang setiap hari sekali untuk menentukan dosis dan volume bahan uji yang diberikan. Secara umum, semua kelompok tikus mengalami penurunan bobot badan setelah pemberian induksi Gentamycin, kecuali kelompok kontrol negatif. Pada minggu ke 3 mulai tampak kenaikan bobot badan kembali. Hasil pengukuran bobot badan untuk masing-masing tikus, dosis dan volume pemberian bahan uji selama penelitian selengkapnya dapat dilihat pada lampiran. Berikut hasil pengolahan data dari Indeks Organ, yaitu Bobot organ dibandingkan dengan bobot Badan dari masing-masing tikus

Tabel 5.2 Hasil Pengolahan Data Indeks Organ

Kelompok	Indeks Organ	
	Ginjal	Jantung
Dosis 50	0.38±0.03 ^a	0.36±0.02
Dosis 100	0.42±0.04	0.36±0.04
Dosis 200	0.40±0.03	0.37±0.03
Kontrol Negatif	0.35±0.02 ^a	0.37±0.02
Kontrol Positif	0.43±0.04	0.36±0.02
Simvastatin	0.41±0.04	0.35±0.35
Fenofibrat	0.46±0.04	0.35±0.04
Ketosteril	0.42±0.04	0.37±0.02
Vitamin E	0.43±0.03	0.35±0.03

Ket: a = berbeda bermakna terhadap data kelompok kontrol positif

Hasil analisis statistik ANAVA menunjukkan indeks organ jantung tidak berbeda bermakna pada terhadap semua kelompok dibandingkan dengan kelompok kontrol positif.

Hasil analisis statistik menunjukkan indeks organ ginjal berbeda bermakna pada kelompok dosis 50 dan kelompok negatif jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif

5.5. Hematologi Darah Tikus Wistar yang Diinduksi Gentamycin H7 dan H35

Hasil pemeriksaan hematologi darah tikus wistar yang diinduksi Gentamycin Hari ke 7 dan 35 selengkapnya dapat dilihat pada lampiran.

Tabel 5.3 Hasil Pengolahan Data Profil Hematologi

KELOMPOK	Lekosit		Hemoglobin		Eritrosit		Trombosit	
	7	35	7	35	7	35	7	35
DOSIS 50	2.03±0.31	1.75±0.51	2.23±0.13	2.01±0.23 ^b	0.61±0.05 ^a	0.59±0.08	546.00±59.07	489.25±54.11 ^c
DOSIS 100	1.93±0.53	1.80±0.37	2.28±0.14	1.93±0.40 ^b	0.69±0.08	0.56±0.03 ^b	475.63±57.37	548.00±96.97 ^c
DOSIS 200	2.15±0.40	1.99±0.65	2.34±0.16	2.24±0.20	0.75±0.07	0.63±0.07	449.14±33.79	525.14±53.98 ^c
Kontrol negatif	2.03±0.31	2.30±1.19	2.35±0.21	2.25±0.08	0.71±0.08	0.53±0.09 ^{bc}	466.50±102.3	647.83±75.39 ^{bc}
Kontrol positif	2.60±0.43 ^a	1.78±0.50 ^c	2.38±0.14	2.29±0.12	0.78±0.05	0.64±0.07 ^c	420.63±49.53	474.50±52.24
Simvastatin	2.01±0.57	1.63±0.39	2.31±0.45	2.20±0.08	0.65±0.12	0.59±0.05	545.86±136.8	552.86±105.27 ^b
Fenofibrat	1.40±0.40 ^a	1.60±0.59	2.11±0.17	2.10±0.16	0.58±0.08 ^a	0.57±0.06 ^b	525.25±100.5	466.13±78.37
Ketosteril	1.66±0.53	2.09±0.33	2.14±0.19	2.20±0.08	0.59±0.06 ^a	0.58±0.06 ^b	489.13±52.30	547.88±62.49 ^c
Vitamin E	1.28±0.59 ^a	1.48±0.30	1.88±0.26 ^a	2.16±0.26	0.50±0.07 ^a	0.55±0.08 ^b	453.75±84.69	600.75±97.88 ^{bc}

Keterangan:

^a Berbeda bermakna terhadap kelompok kontrol negatif

^b Berbeda bermakna terhadap kelompok kontrol positif

^c Berbeda bermakna terhadap data hari ke-7

Pemeriksaan Lekosit pada hari ke 35, hanya kontrol positif (Gentamycin) yang berbeda dari kontrol negatif. Semua kelompok perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna.

Pemeriksaan Hb, tidak terdapat perbedaan bermakna antara kontrol negatif dan kontrol positif. Pada hari ke 35 kelompok PHPHB 50 dan 100 mg/kgBB menunjukkan penurunan Hb dan berbeda bermakna dengan kontrol positif, namun tidak berbeda bermakna dengan kontrol negatif.

Pemeriksaan Eritrosit pada hari ke 35, kontrol negatif berbeda dengan kontrol positif, demikian pula dengan kelompok PHPHB dosis 100 mg/kgBB, Ketosteril, Vitamin E, Simvastatin dan Fenofibrate.

Pemeriksaan Trombosit pada hari ke 35, kontrol negatif, kelompok PHPHB dosis 100 dan 200 mg/kgBB, Ketosteril dan vitamin E menunjukkan peningkatan dibandingkan hari ke 7. Kontrol negatif berbeda dengan kontrol positif, demikian pula dengan Vitamin E, Simvastatin dan Simvastatin.

Lanjutan Tabel 5.3

KELOMPOK	MCH		MCV		Hematokrit	
	7	35	7	35	7	35
DOSIS 50	36.11±2.02 ^a	35.18 ±2.23	37.24±0.20 ^a	37.88±0.69 ^c	2.28±0.11 ^a	2.19±0.32
DOSIS 100	33.81±2.34	37.73 ±2.59 ^c	37.56±0.39 ^a	37.67±0.50	2.56±0.32	2.07±0.14 ^{bc}
DOSIS 200	31.56±2.79	36.14±2.12 ^c	37.61±0.65	37.71±0.54	2.80±0.26	2.36±0.28 ^c
K negatif	33.40±1.42	44.40±7.37 ^{bc}	38.00±0.33	37.15±0.48 ^{bc}	2.67±0.30	1.93±0.31 ^{bc}
K positif	30.91±1.19	36.14±2.88 ^c	38.19±0.37	37.80±0.57	2.95±0.19	2.41±0.29 ^c
Simvastatin	35.46±2.92	38.36±3.14	37.26±0.39 ^a	37.87±0.86	2.43±0.39	2.19±0.25
Fenofibrat	37.28±4.19 ^a	37.81±2.61	37.11±0.35 ^a	38.10±0.90 ^c	2.14±0.30 ^a	2.16±0.26
Ketosteril	36.50±1.37 ^a	37.38±1.89	37.30±0.30 ^a	37.46±0.39	2.20±0.26 ^a	2.00±0.62 ^{bc}
Vitamin E	37.25±2.09 ^a	40.08±3.14 ^b	37.26±0.41 ^a	37.04±0.32 ^b	1.91±0.31 ^a	1.99±0.27 ^b

Keterangan:

^a Berbeda bermakna terhadap kelompok kontrol negatif

^b Berbeda bermakna terhadap kelompok kontrol positif

^c Berbeda bermakna terhadap data hari ke-7

Hasil analisis pemeriksaan MCH, MCV dan Hematokrit hari ke 35, kontrol negatif berbeda bermakna dengan kontrol positif, demikian pula dengan kelompok PHPHB dosis 100 mg/kgBB dan Ketosteril untuk pemeriksaan hematokrit. Pada pemeriksaan hari ke 35 kontrol negatif mengalami penurunan kadar hematokrit, demikian pula semua kelompok perlakuan kecuali kelompok vitamin E.

5.6. Hasil Analisis Gambaran Histopatologis Ginjal Tikus Wistar yang Diinduksi Gentamicin.

Parameter yang diperiksa dalam gambaran histopatologis ginjal tikus Wistar yang diinduksi gentamicin adalah degenerasi tubulus bengkak keruh, nekrosis inti dan *hyaline*

cast. Pengamatan histopatologis dilakukan pada 3 preparat setiap kelompok perlakuan melalui mikroskop cahaya perbesaran objektif 10 dan 40 kali, pada 5 lapang pandang selanjutnya diinterpretasi dalam bentuk skoring. Pada setiap kelompok diambil nilai median dari skor parameter. Setelah median ditentukan, dilakukan uji homogenitas *Levene Statistic* dengan hasil $p=0,00$ dan uji normalitas *Saphiro-Wilk* dengan hasil $p=<0,05$. Hasil dari skor degenerasi tubulus bengkak keruh, nekrosis inti dan *hyaline cast* menunjukkan hasil yang tidak homogen dan tidak berdistribusi normal sehingga dilakukan analisis statistik menggunakan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis*. Nilai bermakna yang digunakan adalah $\alpha=5\%$. Nilai p menunjukkan hasil bermakna, yang berarti terdapat minimal satu perlakuan yang berbeda. Berikutnya dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* dengan $\alpha=0,05$ dengan batas kemaknaan $p<0,05$ dan sangat bermakna jika $p<0,01$.

Hasil analisis uji *Kruskal-Wallis* degenerasi tubulus bengkak keruh, menunjukkan nilai $p > 0,05$. Hasil analisis uji *Kruskal-Wallis* nekrosis inti dan *hyaline cast* menunjukkan nilai masing-masing $p= 0,045$ dan $p= 0,026$.

5.6.1. Skor Gambaran Histopatologis Ginjal Berdasarkan Parameter

Degenerasi Tubulus Bengkak Keruh

Tabel 5.4. Skor Median Degenerasi Tubulus Bengkak Keruh

Tikus	Kelompok								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Tikus 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tikus 2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tikus 3	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Keterangan:

- I. Protein Hidrolisat Kacang Polong Hijau dosis 50 mg/kgBB
- II. Protein Hidrolisat Kacang Polong Hijau dosis 100 mg/kgBB
- III. Protein Hidrolisat Kacang Polong Hijau dosis 200 mg/kgBB
- IV. Kontrol Sehat (=Kontrol Normal= Kontrol Negatif) Pelarut CMC 0,5%
- V. Kontrol Sakit (Kontrol positif = hanya induksi Gentamicin)
- VI. Kontrol Simvastatin 10 mg/kgBB pelarut CMC 0,5%
- VII. Kontrol Fenofibrate 300 mg/kgBB pelarut CMC 0,5%
- VIII. Kontrol Ketosteril 630 mg/kgBB pelarut CMC 0,5%

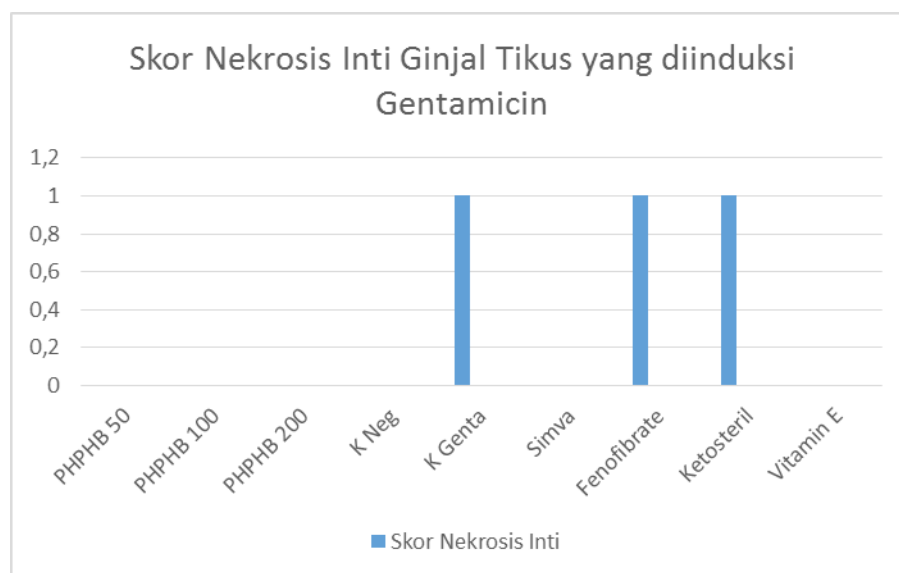
IX. Kontrol Vitamin E 200 IU pelarut CMC 0,5%

Hasil analisis uji *Kruskal-Wallis* degenerasi tubulus bengkak keruh menunjukkan nilai $p > 0,05$. Nilai $p > 0,05$ menunjukkan hasil yang didapat tidak bermakna, berarti tidak terdapat hasil perlakuan yang berbeda antara semua kelompok. Hal ini menandakan pada semua kelompok menunjukkan hasil yang sama, memperoleh nilai skor 1. Pada semua kelompok terjadi gambaran bengkak keruh akibat jejas intraselular, mengakibatkan gangguan pada pompa ion Natrium. Protein hidrolisat terutama berefek pada sistim RAA dan COX-1, yang mempengaruhi sistim vaskular atau pembuluh darah, dan bukan sel epitel tubulus.

5.6.2 Hasil Penelitian Skor Histopatologis Ginjal Berdasarkan Parameter Nekrosis Inti

Tabel 5.5. Skor Median Nekrosis Inti dari Sediaan Histopatologis Ginjal

Tikus	Perlakuan								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Tikus 1	1	0	0	0	1	1	2	1	0
Tikus 2	0	0	1	0	2	0	1	1	0
Tikus 3	0	0	0	0	1	0	1	1	0



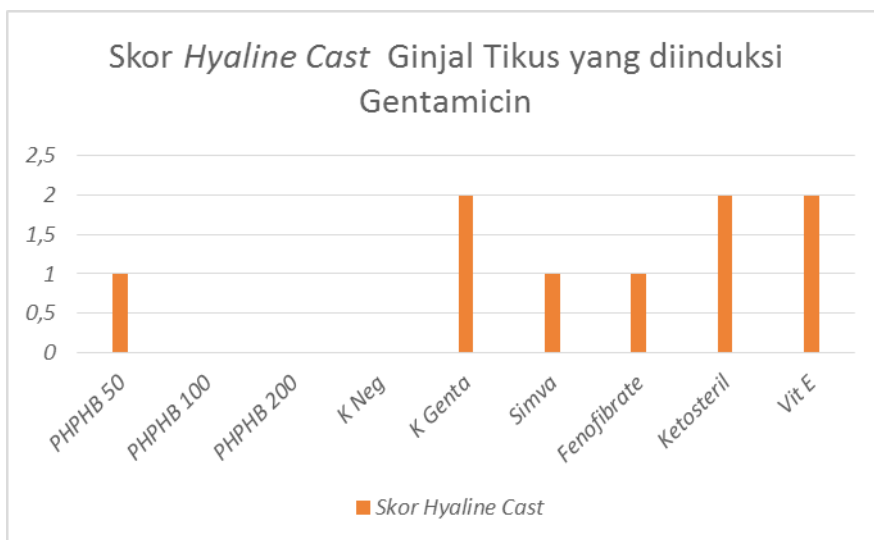
Gambar 5.5. Hubungan antara Skor Nekrosis Inti dengan Kelompok Perlakuan

Nekrosis inti terjadi pada kerusakan sel yang parah, sehingga inti sel rusak dan menghilang yang dikenal sebagai nekrosis inti. Induksi gentamicin selama 7 hari menyebabkan kerusakan sel yang jelas pada ginjal tikus Wistar. Kelompok kontrol gentamicin menunjukkan gambaran nekrosis inti yang parah, hampir seluruh inti sel menghilang, difus sehingga diberi skor 2. Hasil analisis nekrosis inti antara skor median kelompok 4 kontrol negatif dan kelompok 5 kontrol Gentamicin, menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ($p < 0,01$). Hal ini menunjukkan bahwa penelitian ini sah. Hasil analisis skor kelompok 2 dan 9 tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol negatif ($p > 0,05$); hampir tidak terlihat gambaran nekrosis inti pada kelompok ini. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian PHPHB dosis 100 mg/kgBB dan vitamin E mempunyai efek menurunkan skor nekrosis inti. Hasil analisis skor kelompok 1, 3, dan 6 berbeda bermakna dengan kelompok kontrol Gentamicin ($p < 0,05$), akan tetapi nilai skor kelompok 1, 3, dan 6 lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Pemberian PHPHB dosis 100 mg/kgBB dan Vitamin E mempunyai efek paling baik dalam menurunkan skor nekrosis inti.

5.6.3. Hasil Penelitian Skor Gambaran Histopatologis Ginjal Berdasarkan Parameter *Hyaline Cast*

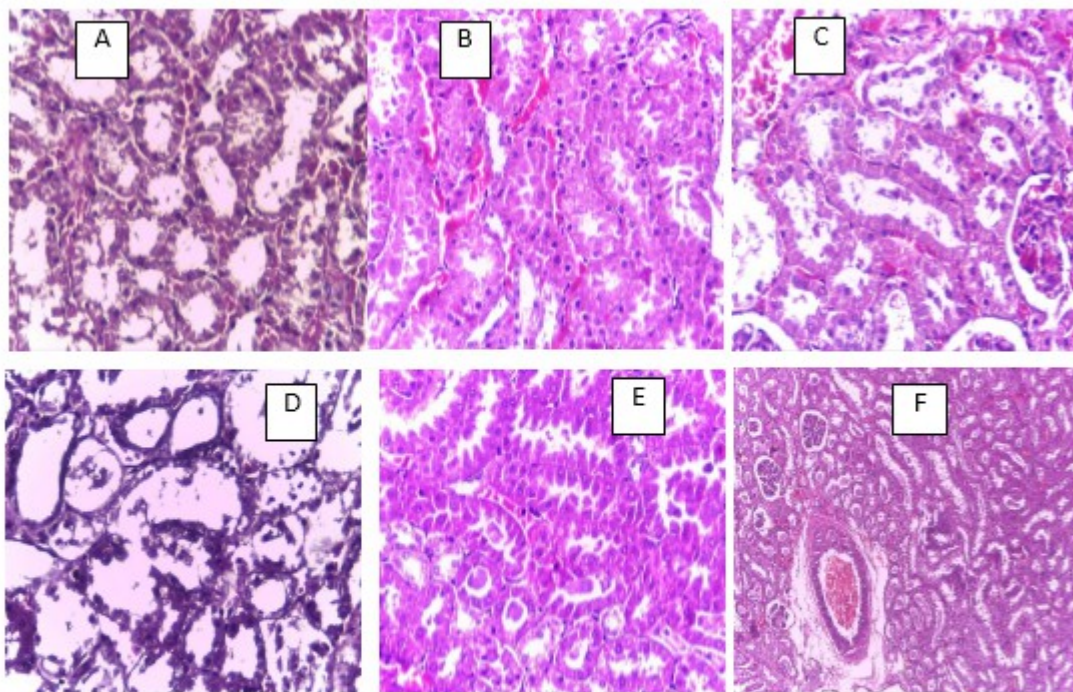
Tabel 5.6 Skor Median *Hyaline Cast*

Tikus	Perlakuan								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Tikus 1	1	1	0	0	2	0	2	2	2
Tikus 2	0	1	0	0	2	1	1	2	1
Tikus 3	1	0	0	0	2	1	1	1	2



Gambar 5.6. Hubungan antara Skor *Hyaline Cast* dengan Kelompok Perlakuan

Hyaline cast umum ditemukan pada kerusakan ginjal tahap lanjut atau kronis. *Hyaline cast* terbentuk merupakan pematatan mucoprotein Tamm-Horsfall yang disekresi oleh sel-sel tubulus renalis. Pembentukan *hyaline cast* ini dipengaruhi oleh keadaan lingkungan di mana terjadi proses denaturasi protein dan presipitasi (misalnya aliran urine yang lambat, kadar garam urine yang tinggi, atau pH yang rendah). Kelompok kontrol gentamicin menunjukkan banyak gambaran *hyaline cast*, sehingga diberi skor 2. Hasil analisis antara skor median *hyaline cast* kelompok 4 kontrol negatif dan kelompok 5 Gentamicin, kontrol positif menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ($p < 0,01$). Hal ini menunjukkan bahwa penelitian ini sah. Hasil analisis skor kelompok 3 tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol negatif ($p > 0,05$); hampir tidak terlihat gambaran *hyaline cast* pada kelompok ini. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian PHPHB dosis 200 mg/kgBB mempunyai efek memperbaiki sel epitel tubulus ginjal sehingga skor *hyaline cast* menurun. Hasil analisis skor kelompok 1, 2, dan 6 berbeda bermakna dengan kelompok kontrol Gentamicin ($p < 0,05$), akan tetapi nilai skor kelompok 1, 2, dan 6 lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Pemberian HPPHB dosis 200 mg/kgBB menunjukkan efek paling baik dalam menurunkan skor *hyaline cast*.



Gambar 5.7. Gambaran Sediaan Histopatologis Ginjal Berdasarkan 3 Parameter

- A. Skor Degenerasi Bengkang Keruh 1, Nekrosis inti 1 dan *Hyaline Cast* = 0,
 B. Degenerasi Bengkang Keruh = 1,
 C. Nekrosis inti = 1,
 D. Nekrosis inti = 2,
 E. *Hyaline Cast* = 1,
 F. *Hyaline Cast* = 2

5.5. Pengukuran kadar Ureum serum tikus Wistar jantan

Pengukuran kadar ureum serum tikus Wistar jantan yang diinduksi Gentamycin dilakukan 6 kali yaitu pada hari ke 0, ke 7, ke 14, ke 21, ke 28 dan ke 35. Serum tikus diperiksa menggunakan alat Cobas Roche 311 dengan prinsip spektrofotometri. Hasil pengukuran dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 5.7 Hasil Pengukuran Kadar Ureum

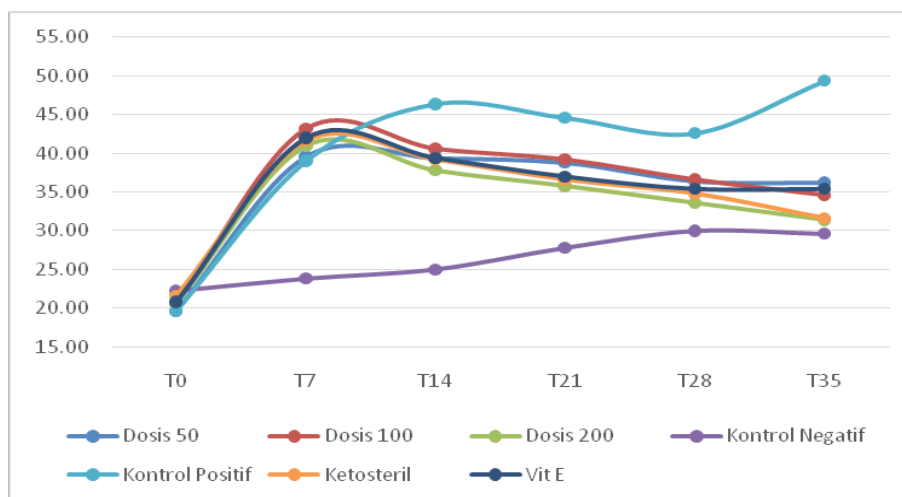
Kelompok	H0	H7	H14	H21	H28	H35
Dosis 50	19.6±1.67	39.6±1.82 ^a	39.4±2.88	38.8±3.63	36.4±2.70 ^b	36.2±2.05 ^b
Dosis 100	20.6±1.14	43.2±1.64 ^a	40.6±1.52 ^b	39.2±1.64 ^b	36.6±1.95 ^b	34.6±0.89 ^b
Dosis 200	20.6±1.14	41±1.58 ^a	37.8±1.30 ^b	35.8±1.79 ^b	33.6±1.14 ^b	31.4±0.55 ^b
Kontrol Negatif	22.2±1.10	23.8±3.27	25.0±1.87	27.8±2.39 ^b	30±2.24 ^b	29.6±1.34 ^b

Kontrol Positif	19.6±1.82	39±5.00 ^a	46.4±5.41 ^b	44.6±3.78 ^b	42.6±2.07	49.4±2.41 ^b
Ketosteril	21.6±0.55	41.6±2.07 ^a	39.2±2.49 ^b	36.6±2.41 ^b	34.8±1.30 ^b	31.6±1.14 ^b
Vit E	20.8±1.79	42±5.00 ^a	39.4±3.51 ^b	37.0±2.92 ^b	35.4±1.52 ^b	35.4±1.95 ^b

^a = berbeda bermakna terhadap H0 (p<0,01)

^b = berbeda bermakna terhadap H7 (p<0,05)

Hasil pengolahan data antara H0 dan H7 secara statistik dengan *pair t-test* menunjukkan bahwa setelah induksi dengan gentamisin 80 mg/kg BB selama 7 hari, terjadi peningkatan kadar ureum secara signifikan (p<0,01) kecuali pada kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa induksi gagal ginjal dengan gentamisin berhasil. Pada kelompok dosis 50, penurunan kadar ureum terjadi mulai hari ke-21 setelah pemberian zat uji sedangkan pada kelompok dosis 100 dan 200, penurunan yang signifikan terjadi mulai hari ke-7 setelah pemberian zat uji. Hasil yang serupa terjadi pada kelompok ketosteril dan vitamin E.



Tabel 5.8. Perubahan Kadar Ureum Serum

Kelompok	Δ 14-7	Δ 21-7	Δ 28-7	Δ 35-7
Dosis 50	-0.20 ± 1.30*	-0.80 ± 2.17*	-3.20 ± 1.64*	-3.40 ± 1.95*
Dosis 100	-2.60 ± 1.14*	-4.00 ± 1.00*	-6.60 ± 1.34*	-8.60 ± 1.14*
Dosis 200	-3.20 ± 0.84*	-5.20 ± 2.05*	-7.40 ± 1.95*	-9.60 ± 1.82*
Kontrol Negatif	1.20 ± 1.79*	4.00 ± 1.41	6.20 ± 2.17	5.80 ± 2.59*
Kontrol Positif	7.40 ± 1.52	5.60 ± 1.95	3.60 ± 4.28	10.40 ± 4.04
Ketosteril	-2.40 ± 0.55*	-5.00 ± 0.71*	-6.80 ± 1.48*	-10.00 ± 1.73*
Vit E	-2.60 ± 1.82*	-5.00 ± 2.74*	-6.60 ± 4.04*	-6.60 ± 3.78*

Ket: * Berbeda bermakna terhadap kelompok kontrol positif (p<0,01)
Tanda - (negatif) menunjukkan penurunan kadar ureum darah

5.6. Pengukuran kadar Kreatinin serum tikus Wistar jantan

Pengukuran kadar kreatinin serum tikus Wistar jantan yang diinduksi Gentamycin dilakukan 6 kali yaitu pada hari ke 0, ke 7, ke 14, ke 21, ke 28 dan ke 35. Serum tikus diperiksa menggunakan alat Cobas Roche 311 dengan prinsip spektrofotometri. Hasil pengukuran kreatinin dapat dilihat pada tabel 5.6 berikut.

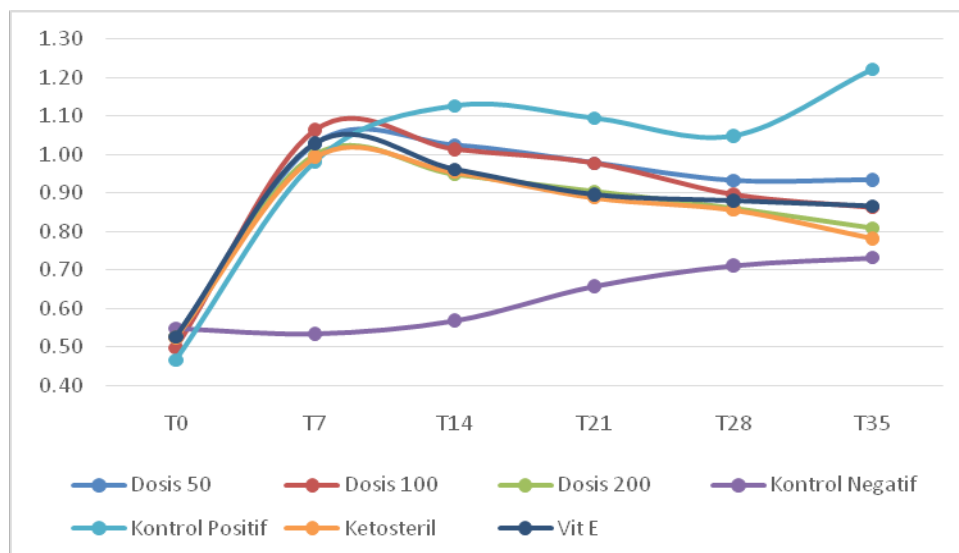
Tabel 5.9. Hasil Pengukuran Kadar Kreatinin Serum Tikus Wistar

Kelompok	H0	H7	H14	H21	H28	H35
Dosis 50	0.53±0.05	1.03±0.05 ^a	1.02±0.03	0.98±0.07	0.93±0.05 ^b	0.93±0.04 ^b
Dosis 100	0.50±0.03	1.06±0.07 ^a	1.01±0.06 ^b	0.98±0.06 ^b	0.90±0.03 ^b	0.86±0.02 ^b
Dosis 200	0.53±0.02	1.00±0.12 ^a	0.95±0.08	0.90±0.06 ^b	0.86±0.06 ^b	0.81±0.02 ^b
Kontrol Negatif	0.55±0.04	0.53±0.04	0.57±0.04 ^b	0.66±0.08 ^b	0.71±0.08 ^b	0.73±0.04 ^b
Kontrol Positif	0.47±0.05	0.98±0.17 ^a	1.13±0.14 ^b	1.09±0.12 ^b	1.05±0.06	1.22±0.04 ^b
Ketosteril	0.52±0.03	0.99±0.06 ^a	0.95±0.05 ^b	0.89±0.05 ^b	0.86±0.04 ^b	0.78±0.05 ^b
Vit E	0.53±0.04	1.03±0.07 ^a	0.96±0.07 ^b	0.90±0.06 ^b	0.88±0.02 ^b	0.87±0.05 ^b

^a = berbeda bermakna terhadap H0 ($p < 0,01$)

^b = berbeda bermakna terhadap H7 ($p < 0,05$)

Hasil pengolahan data antara H0 dan H7 secara statistik dengan pair t-test menunjukkan bahwa setelah induksi dengan gentamisin 80 mg/kg BB selama 7 hari, terjadi peningkatan kadar kreatinin secara signifikan ($p < 0,01$) kecuali pada kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa induksi gagal ginjal dengan gentamisin berhasil. Pada kelompok dosis 50, penurunan kadar ureum terjadi mulai hari ke-21 setelah pemberian zat uji sedangkan pada kelompok dosis 200, penurunan yang signifikan terjadi mulai hari ke-14 setelah pemberian zat uji. Penurunan yang signifikan pada kelompok dosis 100, ketostril dan vitamin E terjadi mulai hari ke-7 setelah pemberian zat uji.



Tabel 5.10 Perubahan Kadar Kreatinin Serum

Kelompok	Δ 14-7	Δ 21-7	Δ 28-7	Δ 35-7
Dosis 50	$0.004 \pm 0.03^*$	$-0.05 \pm 0.05^*$	$-0.10 \pm 0.04^*$	$-0.09 \pm 0.04^*$
Dosis 100	$-0.05 \pm 0.02^*$	$-0.09 \pm 0.02^*$	$-0.17 \pm 0.05^*$	$-0.20 \pm 0.05^*$
Dosis 200	$-0.05 \pm 0.05^*$	$-0.10 \pm 0.07^*$	$-0.14 \pm 0.08^*$	$-0.19 \pm 0.11^*$
Kontrol Negatif	$0.03 \pm 0.02^*$	0.12 ± 0.07	$0.18 \pm 0.08^*$	0.20 ± 0.05
Kontrol Positif	0.14 ± 0.03	0.11 ± 0.06	0.07 ± 0.12	0.24 ± 0.15
Ketosteril	$-0.04 \pm 0.02^*$	$-0.11 \pm 0.02^*$	$-0.14 \pm 0.04^*$	$-0.21 \pm 0.03^*$
Vit E	$-0.07 \pm 0.02^*$	$-0.13 \pm 0.04^*$	$-0.15 \pm 0.06^*$	$-0.16 \pm 0.07^*$

Ket: * Berbeda bermakna terhadap kelompok kontrol positif ($p < 0,01$)
Tanda - (negatif) menunjukkan penurunan kadar ureum darah

Hasil Pemeriksaan Profil Lipid

Pengukuran Kadar Lipid Total Serum

Pengukuran kadar lipid serum tikus Wistar jantan yang diinduksi Gentamycin dilakukan 3 kali yaitu pada hari ke 0, ke 7, dan ke 35. Serum tikus diperiksa menggunakan alat Cobas Roche 311 dengan prinsip spektrofotometri, dengan enzim kolesterol oxidase-phenol aminophenazone (CHOD-PAP). Hasil pemeriksaan dapat dilihat pada tabel berikut. Hasil analisis statistik (uji t-berpasangan) menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna pada hari ke-7 setelah induksi. Hal ini menunjukkan bahwa induksi dengan gentamisin 100 g/kg bb dapat meningkatkan kadar kolesterol total, LDL, dan trigliserida.

Hasil Analisis Data Profil Lipid

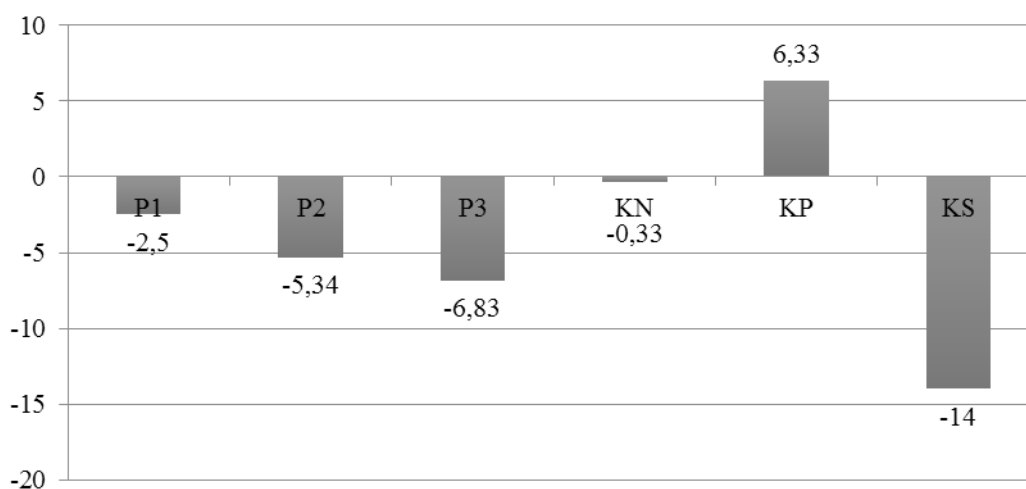
5.7. Pengukuran Kadar Kolesterol Total Serum

Tabel 5.11 Analisis Statistika Kadar Rerata Kolesterol Total Serum

Kelompok	Kadar Kolesterol Total Pada Hari Ke-		
	0	7	35
DOSIS 50	55,88 ± 2,90	60,25 ± 2,12a	60,34 ± 3,58
DOSIS 100	61,50 ± 3,63	66,00 ± 3,46a	62,57 ± 2,51b
DOSIS 200	60,13 ± 1,73	65,63 ± 3,74a	61,38 ± 2,62b
K negatif	61,83 ± 4,17	62,33 ± 6,56	62,00 ± 3,52
K positif	64,63 ± 4,53	68,50 ± 2,62a	74,25 ± 3,49
Simvastatin	65,75 ± 3,81	69,50 ± 3,74a	57,86 ± 3,83b
Fenofibrate	62,75 ± 2,61	67,50 ± 2,81a	
Ketosteril	62,13 ± 3,98	66,88 ± 3,44a	
Vitamin E	61,63 ± 3,11	65,13 ± 4,70a	

Ket: a = berbeda bermakna terhadap data hari ke-0

b = berbeda bermakna terhadap data hari ke-7



Gambar 5.8. Grafik Selisih Rerata Kadar Kolesterol Total H 35-H7 (mg/dL)

Berdasarkan parameter kolesterol total, pemberian PHPHB dosis 100 dan 200 mg/kgBB dapat menurunkan kadar kolesterol total secara signifikan ($p < 0,05$). Begitu pula halnya pada kelompok yang diberi simvastatin.

5.8. Pengukuran Kadar LDL Serum

Tabel 5.12 Analisis Statistika Kadar Rerata LDL Serum

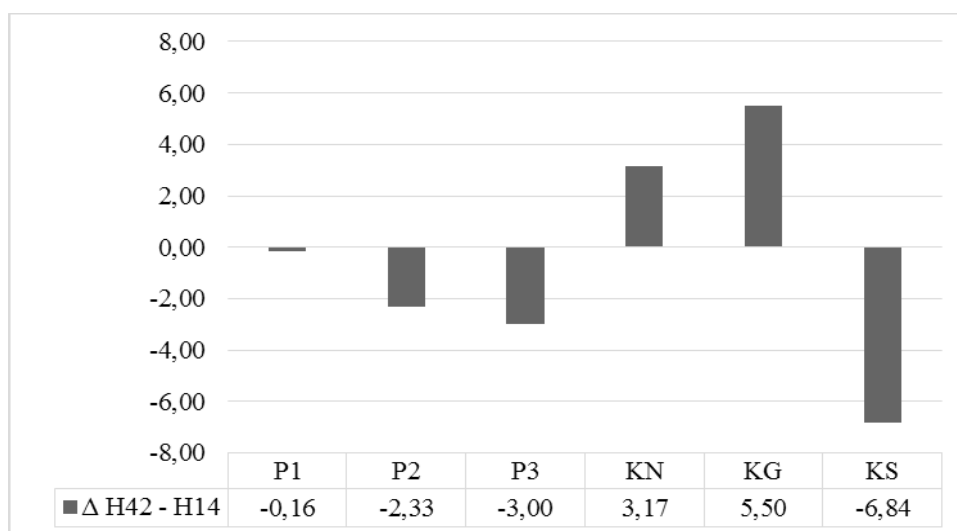
Kelompok	Kadar Kolesterol LDL Pada Hari Ke-		
	0	7	35
DOSIS 50	31,00 ± 1,07	36,5 ± 1,93a	38,38 ± 3,34
DOSIS 100	31,13 ± 0,99	36,63 ± 1,92a	35,57 ± 1,51b
DOSIS 200	32,13 ± 1,13	37,38 ± 1,69a	35,25 ± 1,04b
K negatif	32,17 ± 1,17	32,83 ± 0,75	36,00 ± 1,10
K positif	31,63 ± 1,06	36,50 ± 0,93a	42,13 ± 3,18
Simvastatin	31,50 ± 1,20	36,38 ± 1,85a	30,71 ± 1,38b
Fenofibrate	31,38 ± 1,81	31,38 ± 1,81	
Ketosteril	31,50 ± 1,20	31,50 ± 1,20	
Vitamin E	30,75 ± 1,75	30,75 ± 1,75	

Ket: a = berbeda bermakna terhadap data hari ke-0

b = berbeda bermakna terhadap data hari ke-7

Hasil yang serupa juga ditunjukkan pada pengolahan data kadar LDL. Pemberian zat uji dosis 100 dan 200 mg/kgBB serta simvastatin dapat menurunkan kadar LDL hewan uji. Pemberian zat uji dosis 50 mg/kg bb tidak menyebabkan penurunan kadar LDL

Berikut adalah gambar grafik selisih antara kadar rerata LDL pemeriksaan hari ke 35 dan hari ke 7



Gambar 5.9. Grafik Selisih Rerata Kadar LDL H 35-H7 (mg/dL)

5.9. Pengukuran Kadar Triglicerida Serum

Pengukuran kadar Triglicerida serum tikus Wistar jantan yang diinduksi Gentamycin dilakukan 3 kali yaitu pada hari ke 0, ke 7, dan ke 35. Serum tikus diperiksa menggunakan alat Cobas Roche 311 dengan prinsip spektrofotometri, dengan enzim Glycerol-3-phosphate oxidase-phenol aminophenazone (GPO-PAP).

Tabel 5.13 Analisis Statistika Kadar Rerata Triglicerida Serum

Kelompok	Kadar Triglicerida Pada Hari Ke-		
	0	7	35
DOSIS 50	44,25 ± 2,76	48,00 ± 2,67a	48,75 ± 3,37
DOSIS 100	48,38 ± 4,21	51,50 ± 3,42a	49,14 ± 3,29b
DOSIS 200	48,63 ± 4,10	52,50 ± 3,34a	48,63 ± 3,25b
K negatif	49,50 ± 2,43	49,67 ± 2,88	51,33 ± 2,50
K positif	53,00 ± 4,75	56,50 ± 3,93a	61,75 ± 4,27
Simvastatin	54,00 ± 4,28	36,38 ± 1,85a	
Fenofibrate	50,88 ± 2,91	54,88 ± 2,87a	46,75 ± 2,64b
Ketosteril	52,13 ± 3,64	56,13 ± 4,64a	
Vitamin E	51,00 ± 4,72	54,38 ± 5,71a	

Ket: a = berbeda bermakna terhadap data hari ke-0

b = berbeda bermakna terhadap data hari ke-7

Pada pengolahan data kadar triglicerida, terlihat penurunan yang signifikan ($p < 0,05$) pada kelompok PHPHB dosis 100 dan 200 mg/kgBB serta fenofibrate. Berikut adalah gambar grafik selisih antara rerata kadar Triglicerida H7 dan H35

Gambar 5.10 Grafik Selisih Rerata Kadar Triglicerida H 35-H7 (mg/dL)

Hasil uji t berpasangan antara H 7 dan H35 terhadap profil lipid menunjukkan, pemberian PHPHB dosis 100mg/KgBB/hari, dan 200mg/kgBB/hari menunjukkan penurunan yang signifikan terhadap kadar profil lipid (Kolesterol total, LDL dan Trigliserida) tikus Wistar ($p < 0,01$). Dapat dikatakan dosis PHPHB yang efektif untuk menurunkan kadar profil lipid tikus Wistar adalah dosis 100mg/KgBB/hari, dan 200mg/KgBB/hari. Efektivitas PHPHB meningkat sesuai dengan peningkatan dosis.

Pemberian PHPHB menurunkan kadar profil lipid tikus Wistar yang diinduksi gentamisin. Hal ini dikarenakan adanya kandungan tanin dan fenol dalam kacang polong hijau, serta manfaat kacang polong hijau sebagai antioksidan. Tanin dan fenol diduga dapat menghambat oksidasi lemak sampai 94,19%. Tanin dapat mengikat enzim asam amino dan protein lain dengan ikatan hidrogen sehingga terbentuk kompleks tannin-protein yang dapat memblokir resistensi asam amino terhadap enzim pencernaan (Sosulski, 1979). Hidrolisis protein makanan pada saluran pencernaan yang dibantu protease dapat melepaskan ikatan peptida yang memiliki aktivitas penurun kadar lemak.

Menurut penelitian Aluko dan Aukema, pemberian protein hidrolisat kacang polong terhadap tikus dengan penyakit ginjal polikistik dapat meningkatkan pengeluaran urine dan memperbaiki fungsi ginjal. Protein hidrolisat kacang polong juga meningkatkan produksi enzim siklooksigenase (COX-1) dalam ginjal, yang dapat menyebabkan dilatasi pembuluh darah dan memperbaiki kemampuan ginjal dalam memfiltrasi darah dan memproduksi urin. Menurut Hörl, peningkatan fungsi ginjal dapat mencegah kehilangan albumin dan penurunan produksi lipoprotein dan trigliserida. Enzim COX-1 mempunyai efek menurunkan tekanan darah yang dapat mempengaruhi aliran darah khususnya ke ginjal, dengan cara mencegah hipertrofi ginjal sehingga dapat mengurangi kerusakan dari nefron.

Menurut Pekkarinen et al. (1999), dalam kacang polong terdapat senyawa turunan fenol yang aktif sebagai senyawa antioksidan. Hasil penelitian Stanisavljević menunjukkan bahwa protein hidrolisat kacang polong dengan berat molekul $< 10\text{kDa}$ yang dapat diperoleh dari fermentasi kacang polong yang dimurnikan oleh *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 memiliki aktivitas antioksidan tertinggi (Stanisavljević, N.S., 2015). Semakin kecil berat molekul peptida, semakin mudah

untuk diserap oleh tubuh. PHPHB mengandung berat molekul yang cukup kecil, terlihat dari hasil pemeriksaan SDS PAGE. Pada pemeriksaan tersebut terlihat banyak pita yang terletak di sekitar dan di bawah 14,4 kDa. Protein yang memiliki berat molekul < 10 kDa terdapat 3 buah yaitu pada pita 9.625 kDa, 8.140 kDa, dan 6.156 kDa. Dapat dikatakan bahwa PHPHB mengandung antioksidan yang cukup baik.

5.10. Pengukuran Kadar SOD

Kadar SOD serum tikus diperiksa menggunakan metode ELISA dan dibaca dengan spektrofotometri.

Tabel 5.14 Hasil Pengukuran Kadar SOD dan Hasil Olah Data Statistik

Kelompok	D0	D7	p*	D35
			Analisis vs KN	
Dosis 50	88.48±3.13	82.34±3.28	0.000	87.84±3.87
Dosis 100	90.64±0.71	85.00±1.81	0.052	93.44±0.38
Dosis 200	91.48±1.17	86.98±1.45	0.684	93.84±0.54
Kontrol Negatif	90.22±1.13	87.48±1.39		87.98±1.13
Kontrol Positif/Sakit	90.50±1.60	84.76±1.33	0.034	80.98±0.51
Vit E	90.86±1.13	84.40±1.48	0.018	95.44±0.24

D0 = baseline, hasil pengukuran sebelum induksi

D7 = hasil pengukuran sesudah induksi

D14 = hasil pengukuran sesudah tujuh hari treatment

D21 = hasil pengukuran sesudah empat belas hari treatment

D28 = hasil pengukuran sesudah dua puluh satu hari treatment

D35 = hasil pengukuran sesudah dua puluh delapan hari treatment

Hasil analisis uji Levene untuk menentukan distribusi terhadap data kadar enzim SOD menunjukkan bahwa data *baseline* (D0) terdistribusi normal ($p > 0,05$). Dengan demikian, dapat dilakukan analisis statistik lebih lanjut. Hasil uji homogenitas Kolmogorov Smirnov pada data baseline menunjukkan bahwa data homogen ($p = 0,174$) sehingga dapat dilakukan pengolahan analisis data lebih lanjut dengan ANOVA.

Setelah tikus diinduksi dengan gentamisin 80 mg/kg BB selama 7 hari, pada D7 terjadi penurunan kadar SOD. Penurunan yang signifikan (berbeda bermakna terhadap kontrol negatif) terjadi pada kelompok kontrol positif, dosis 50, dan vit E. Setelah pemberian zat uji selama 28 hari, terjadi peningkatan kadar enzim SOD pada semua kelompok, termasuk

kelompok kontrol negatif. Setelah dibandingkan secara statistik, peningkatan yang signifikan terjadi pada kelompok **dosis 100, dosis 200, dan vit E**. Hasil pengujian dengan *Paired Samples T-Test* menunjukkan bahwa terjadi penurunan yang signifikan ($p < 0,01$) pada semua kelompok. Pemberian zat uji dosis 50, 100, 200, dan vit E dapat meningkatkan kadar enzim SOD secara signifikan ($p < 0,01$). Pada kelompok uji, peningkatan kadar terbesar ditunjukkan pada kelompok yang diberikan dosis 100mg/d. Pada kelompok kontrol positif, kadar enzim SOD terus menurun.

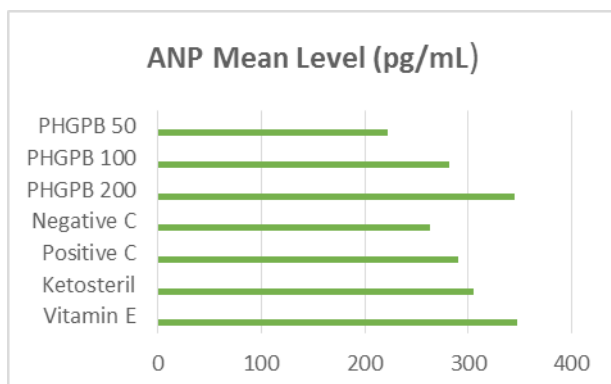
5.10. Hasil Pengukuran Kadar Peptida Terkait Ginjal.

Pengukuran kadar ANP, COX-1 dan renin dilakukan pada homogenat tikus ginjal kanan menggunakan ELISA dengan kit produksi Qayee-bio dengan tiga kali pengulangan (triplo). Karena keterbatasan alat yang digunakan dalam penelitian, homogenat jaringan ginjal dibuat per kelompok sehingga hanya didapat hasil pengukuran per kelompok yang diulang sebanyak tiga kali (triplo). Data ini tidak dapat dianalisis secara statistik, tetapi hanya dianalisis secara deskriptif (Tabel 7).

Tabel 5.15 Rerata Pengukuran Kadar ANP, COX-1 dan Renin

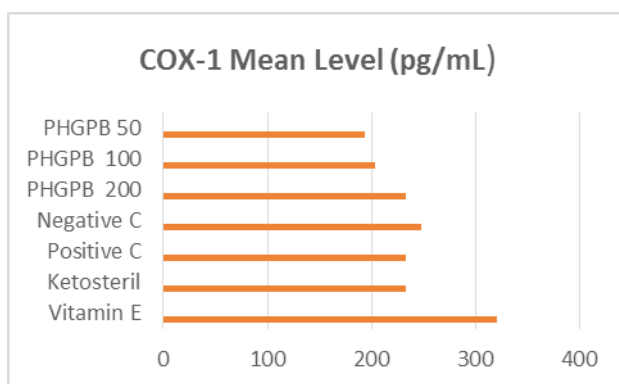
Kelompok	ANP (pg/mL)	COX-1 (pg/mL)	Renin (pg/mL)
1. PHPHB 50	222,10	193,10	241,23
2. PHPHB 100	281,30	202,97	362,80
3. PHPHB 200	345,26	211,77	405,17
4. K Neg	262,70	247,80	295,73
5. K Genta	290,47	232,80	354,93
6. Ketosteril	305,73	233,27	339,43
7. Vitamin E	346,83	320,90	419,60

Kadar ANP pada kelompok kontrol negatif dan gentamycin masing-masing adalah 262.70 dan 290.47 pg / mL. Kelompok 6 dan 7 menunjukkan kadar ANP yang baik, masing-masing dengan 305,73 dan 346,83 pg / mL. Kelompok perlakuan PHPHB menunjukkan hasil yang baik. Hasil kelompok 2 dan 3 meningkat sesuai dengan peningkatan dosis. Kelompok 3 menunjukkan rerata kadar ANP tertinggi di antara tiga kelompok perlakuan (345,26 pg / mL), tetapi sedikit lebih rendah daripada kelompok Vitamin E (346,83 pg / mL) (Tabel 5.12).



Gambar 5.11. Rerata Hasil Pemeriksaan ANP pada Hari ke 35 dari Homogenat Ginjal Tikus

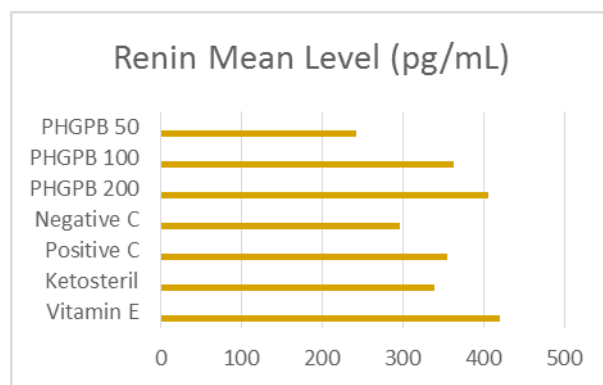
Kelompok kontrol negatif menunjukkan kadar COX-1 247,8 pg/mL, sedangkan kontrol gentamisin menunjukkan hasil yang lebih rendah yaitu 232,80 pg/ mL. Kelompok pembanding menunjukkan hasil yang baik, terutama kelompok Vitamin E (320,90 pg / mL), sedangkan kelompok Ketosteril hanya menunjukkan 233,27 pg/ml. Di antara kelompok perlakuan, kelompok PHPHB 200 menunjukkan hasil tertinggi (211,77 pg / mL) (Tabel 5.12).



Gambar 5.12. Rerata Hasil Pemeriksaan COX-1 pada Hari ke 35 dari Homogenat Ginjal Tikus

Rerata kadar renin pada kelompok kontrol negatif adalah 295,73 pg / mL sementara kelompok kontrol positif / gentamisin 354,93 pg / mL. Di antara tiga kelompok perlakuan, kelompok PHPHB 50 menunjukkan hasil yang baik (241,23 pg / mL), yang lebih rendah dibandingkan pada kontrol negatif dan positif. Kelompok PHPHB 200 menunjukkan kadar renin yang tinggi (405,17 pg / mL), sedangkan kelompok Ketosteril menunjukkan hasil yang

buruk (339,43 pg / mL) dan kelompok Vitamin E menunjukkan hasil yang lebih besar daripada kelompok kontrol positif (419,60 pg / mL) (Tabel 5.12).



Gambar 5.13. Rerata Hasil Pemeriksaan Renin pada Hari ke 35 dari Homogenat Ginjal Tikus

Terdapat hasil yang kontroversial dari hasil penelitian, yaitu kadar kontrol positif ANP lebih tinggi daripada kadar kontrol negatif. Mempertimbangkan keterbatasan penelitian kami, sulit menjelaskan hasil kontroversial tersebut. Hal ini mungkin disebabkan mekanisme kompensasi tubuh untuk mencapai homeostasis tekanan darah, sebagaimana yang dikemukakan oleh Ogawa et al. bahwa ANP meningkat pada pasien PGK yang rumit dengan fungsi ginjal yang memburuk. Hubungan antara kadar plasma ANP dengan kerusakan CKD masih perlu diselidiki. (17) Pemberian PHPHB meningkatkan kadar ANP sesuai peningkatan besar dosis. Kelompok PHPHB dosis 200 mg/kgBB menunjukkan kadar ANP sebesar 131,42% lebih besar dari kontrol negatif dan 118,86% kontrol positif.

Secara umum, pemeriksaan COX-1 menunjukkan hasil yang buruk, dan tiga kelompok perlakuan menunjukkan hasil yang lebih rendah daripada kelompok kontrol positif/gentamisin. Hasil ini mungkin karena waktu pemberian PHPHB kurang panjang atau berat molekul peptida yang terkandung dalam PHPHB lebih dari 3 kDa. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk menjelaskan hal ini.

Hasil pengukuran renin kelompok PHPHB menunjukkan hasil yang sedikit baik, lebih rendah dari kontrol negatif dan positif (81,57%) dibandingkan dengan kontrol negatif dan positif (67,96%). Namun apakah dosis PHPHB yang lebih tinggi meningkatkan kadar renin perlu diuji lebih lanjut. Hasil yang sama ditemukan pada kelompok pembandingan 6 dan 7.

Rerata kadar renin pada kelompok PHPHB 200 mg / hari (405,17 pg / dL) hampir sama dengan kontrol pembanding vitamin E (419,60 pg/ dL). Hal ini mungkin disebabkan waktu pemberian perlakuan kurang panjang sehingga tubuh masih dalam fase respon adaptasi terhadap kerusakan ginjal yang parah akibat induksi gentamisin.

Mekanisme peningkatan fungsi ginjal selain oleh aktivitas antioksidan juga oleh ANP dan kadar renin yang rendah namun tidak melalui mekanisme COX-1. ANP memiliki fungsi yang sangat penting dalam penghambatan renin dalam sistem RAS. (Kasama, 2008) (Gutkowska, 2014) Rerata kadar ANP yang tinggi dari kelompok gentamisin menandakan mekanisme kompensasi tubuh untuk mengembalikan tekanan darah. (Santos-Araújo, C., 2015) (Saito, 2010). Kadar ANP perlu diukur beberapa kali untuk mengevaluasi pola dan tren respon tubuh terhadap kondisi ginjal yang sehat dan cedera.

5.2. LUARAN YANG TELAH DICAPAI

1. Hak Cipta. Meilinah Hidayat. Pembuatan dan Pengujian Protein Hidrolisat Kacang Polong Hijau untuk Terapi Perbaikan Fungsi Ginjal. Hak Cipta. EC00201810615. Kementerian Hukum dan Hak Azasi Manusia. Direktorat Jendreal Kekayaan Intelektual Republik Indonesia. 1 Mei 2018.
2. Draft Submit ke Iranian Journal of Basic Medical Science. Scopus, Q3. Judul Kidney Therapeutic Potential of Peptides Derived from the Bromelain Hydrolysis of Green Peas Protein.

Manuscript Submission (Manuscript #IJBMS-1808-8075)

Yahoo/Inbox ★



Iranian Journal of Basic Medical Sciences <jbms@mums.ac.ir>
To: mellahidayat@yahoo.com



6 Aug. at 8:02 am ★

Manuscript ID: IJBMS-1808-8075

Manuscript Title: **Kidney Therapeutic Potential of Peptides Derived from the Bromelain Hydrolysis of Green Peas Protein**

Authors: Meilinah Hidayat, Sijani Prahastuti, Destiya Ulfah Riyani, Andreanus Andaja Soemardji, Nova Suliska, Afrilia Nuryanti Garmana, Bobby F Assiddiq, Khomaini Hassan

Dear Dr **Dr. Meilinah Hidayat**

I wish to acknowledge the receipt of the above mentioned manuscript.

Please be sure that the submitted manuscript has not been published previously and will not be submitted elsewhere prior to our decision. Accepted manuscripts cannot be withdrawn, once this decision has been reached.

Open access publishing is not without costs. IJBMS, therefore, levies an article-processing charge of 4.000.000 Rls. for each original and short communication article accepted for publication. Please note that these charges apply only to accepted articles of Iranian authors. All other articles are exempt from these

3. Draft Submit ke **Indian Journal of Pharmacology, SCOPUS Q3**

Draft Submit ke Indian Journal of Pharmacology, SCOPUS Q3

Evaluation of Antihyperlipidemia and Antinephrotoxicity Effects of Green Peas Protein Hydrolysate on Gentamicin-Induced Wistar Rats

Meilinah Hidayat, Sijani Prahastuti, Widya Arina, Ricky Febriansyah, Sylvia S. Somya, Audrey Aurelia, Andreanus Andaja Soemardji, Nova Suliska, Afrilia N.Garmana, Khomaini Hasan

ABSTRACT

Objective: The present study was undertaken to evaluate the effects of green peas protein hydrolysate as antihyperlipidemia and antinephrotoxicity on gentamicin-induced Wistar rats.

Materials and Methods: Nephrotoxicity was induced in Wistar rats by intraperitoneal administration of gentamicin 80 mg/kg/day for seven days. Effect of concurrent administration of green peas protein hydrolysate at dose of 50, 100 and 200 mg/kg/day given by oral route were determined using serum creatinine and blood urea nitrogen as indicators of kidney damage. The study groups contained six rats in each group. Nephrotoxicity of gentamicin is known to be involve hyperlipidemia activity, hematology and histopathological kidney changes, so the effects of this hydrolysate were need to be evaluated. The parameters for histopathological changes were cloudy swelling tubular degeneration, nuclear necrosis, and hyaline cast; for hyperlipidemia were choleterol total, LDL and Tryglyceride; and for hematology were hemoglobin and erythrocyte.

Result: It was observed that the green peas protein hydrolysate significantly protects rat kidneys from gentamicin-induced histopathological changes. The score of histopathological parameters showed to be reduced in the group receiving the green peas protein hydrolysate along with gentamicin. This hydrolysate also lowered the gentamicin-induced increases in Cholesterol total, LDL, Tryglyceride, but not in Hemoglobin and erythrocyte levels.

Conclusion: It is proposed that the green peas protein hydrolysate had antihyperlipidemia and antinephrotoxicity effects in gentamicin-induced nephrotoxicity Wistar rats.

Keywords: green peas protein hydrolysate, antihyperlipidemia, hematology

4. Buku Monograf. Hibah Pendampingan Buku Kemenristek Dikti 2018

MONOGRAF HIDROLISAT PROTEIN DARI KACANG POLONG (*Pisum sativum. L*) UNTUK TERAPI PENYAKIT GINJAL KRONIS. 260 halaman.
ISBN : 978-602-289-453-7 Penerbit Alfabeta- Bandung.



BAB 6. RENCANA TAHAPAN SELANJUTNYA

Pada tahun pertama penelitian ini telah dilakukan serangkaian percobaan dan pengukuran efektivitas protein hidrolisat kacang polong hijau yang dihidrolisis menggunakan bromelain dalam mencegah perburukan PGK, memelihara dan meningkatkan fungsi ginjal. Telah didapat hasil sesuai dengan tujuan penelitian yaitu dosis efektif PHPHB adalah 200mg/kgBB dan hipotesis mekanisme kerja PHPHB adalah karena efek antioksidan dan ANP. Hasil pemeriksaan dan analisis histopatologis ginjal saat ini sedang disiapkan. Penemuan ini akan dilanjutkan pada tahun berikutnya dengan menguji mekanisme kerja yang lain serta uji keamanan dari PHPHB. Rencana tahun selanjutnya adalah menguji mekanisme kerja melalui uji *in vitro* PHPHB pada sel glomerular mesangial yang induksi glukosa sebagai model PGK dengan parameter uji viabilitas, fibronektin, TGF- β dan ROS serta uji keamanan berupa uji toksisitas akut untuk menentukan nilai LD50, uji alergenik dari protein hidrolisat dan uji toksisitas subkronis.

.

BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Protein hidrolisat kacang polong hijau yang dihidrolisis menggunakan bromelain yang telah dikarakterisasi terbukti mempunyai efek mencegah perburukan PGK, memelihara dan meningkatkan fungsi ginjal berdasarkan parameter terhadap organ: Indeks Organ (IO) jantung dan ginjal; analisis sediaan histopatologis ginjal, parameter fungsi ginjal: Ureum, Kreatinin; Profil lipid: Kolesterol Total, LDL, Trigliserida; parameter uji mekanisme: SOD, ANP, COX-1 dan Renin; dan didapat bahwa dosis efektif PHPHB adalah 200 mg/kgBB dan hipotesis mekanisme kerjanya adalah melalui aktivitas antioksidan dan ANP.

Simpulan Tambahan:

- Karakteristik PHPHB adalah mengandung protein sebanyak 48,778 mg/mL, dengan pH 4,9 dan memiliki 3 buah protein dengan berat molekul yang lebih kecil dari 10 kDa, yaitu 9,625 kDa, 8,140 kDa dan 6,156 kDa.
- Berdasarkan indeks organ ginjal, pemberian PHPHB dosis 50 mg/kgBB menunjukkan hasil sama dengan kontrol negatif. PHPHB dosis 100 dan 200 mg/kgBB menunjukkan hasil tidak berbeda bermakna dengan hasil kelompok kontrol pembanding Ketosteril dan Vitamin E. Indeks organ jantung tidak menunjukkan adanya perubahan atau gangguan.
- Berdasarkan parameter hematologi, induksi gentamycin menyebabkan penurunan Hb, Ht dan eritrosit, karena fungsi ginjalnya terganggu. Pemberian PHPHB belum memberikan pengaruh terhadap gangguan sistim eritropoeitin, kemungkinan waktu pemberian perlakuan kurang lama. Hasil kelompok yang diberikan PHPHB tidak berbeda dengan hasil kelompok kontrol pembanding Ketosteril dan Vitamin E.
- Berdasarkan parameter Ureum dan Kreatinin, semua dosis PHPHB memberikan efek menurunkan kadar Ureum dan Kreatinin, namun kelompok yang menunjukkan penurunan paling baik adalah kelompok PHPHB dosis 200 mg/kgBB.

- Berdasarkan parameter profil lipid, baik kolesterol total, LDL maupun trigliserida, kelompok yang menunjukkan hasil paling baik adalah PHPHB dosis 200 mg/kgBB. Semakin besar dosis PHPHB penurunan profil lipid semakin besar.
- Berdasarkan parameter SOD, semua dosis PHPHB memberikan efek meningkatkan kadar SOD, namun kelompok yang menunjukkan peningkatan paling besar adalah kelompok PHPHB dosis 200 mg/kgBB, kadar SOD meningkat sesuai dengan peningkatan dosis. Hipotesis mekanisme perbaikan fungsi ginjal adalah karena efek antioksidan dalam PHPHB.
- Berdasarkan parameter ANP, COX-1 dan Renin, rerata hasil meningkat sesuai dengan peningkatan dosis. PHPHB dosis 200 mg/kgBB menunjukkan rerata kadar ANP, COX-1 dan Renin yang paling tinggi. Akan tetapi setelah dianalisis secara deskriptif, dengan dibandingkan dengan kontrol negatif, maupun kontrol positif, maka parameter ANP yang dinilai mempunyai efek baik untuk perbaikan fungsi ginjal. Mekanisme perbaikan fungsi ginjal kemungkinan disebabkan karena ANP.
- Analisis histopatologis ginjal setelah pemberian PHPHB akan dilaporkan pada laporan akhir penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Aluko RE. 2008. Determination of nutritional and bioactive properties of peptides in enzymatic pea, chickpea, and mung bean protein hydrolysates. *J AOAC Int.* 91(4): 947 – 956.
- Birben, E. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *WAO Journal* 5: 9 – 19
- Cayman Chemicals Inc, Ann Arbor, MI. 2010. Retrieved from Cayman's COX (ovine) Inhibitor Screening Assay Kit, Catalog No 560101: www.caymanchem.com
- Coruzzi G, Verturi N, Spaggiari S. 2007. Gastrointestinal Safety of Novel Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. Selective COX-2 inhibitor and beyond. *Acta Biomedica.* 78,96 – 110.
- Dalimartha S. 1999. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*. Trubus Agriwidya. Jakarta.
- Gault dan formula *modification of diet in renal disease*. *Jurnal Penyakit Dalam* (3): 198 – 204.
- Ha, H and Lee HB. 2000. Reactive oxygen species as glucose signaling molecules in mesangial cells cultured under high glucose. *Kidney International* 58 19 – 25
- Heyne K. 1916. De nuttige planten van Nederlandsch-Indie. [*Tumbuhan berguna dari Hindia Belanda*]. Ruyrok. Batavia.
- Hidayat M, Darsono L, Tjandra S. 2016. *Buku Nutrisi untuk Penderita Penyakit Ginjal*. Talenta Indonesia Mandiri. Jogjakarta.
- Hidayat M, Prahastuti S, Wargasetia TL. Laporan Penelitian LPPM 2017. Karakteristik dan Potensi Protein Hidrolisat dari Beberapa Kacang. 2017
- Hoskins I. 2009. Pea proteins may prevent kidney disease. *Search Nutrition and Food Science*
- ISPCP. 2016. *International Seminar on Pharmacology and Clinical Pharmacy*. Pidato Menteri Kesehatan Republik Indonesia. ITB 2016.
- Kompas. 2017. Kilasan IPTEK. Hari Ginjal Sedunia: Obesitas Bisa memicu Gagal Ginjal. DIM/ADH. 8 Maret 2017.
- Lee, HB. 2003. Reactive oxygen species- regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J AmSoc Nephrol* 14: 241 – 245
- Liu, C. 2012. Protective role of quercetin against lead-induced inflammatory response in rat kidney through the ROS-mediated MAPKs and NF- κ B pathway. *Biochimica et Biophysica Acta* 1820: 1693 – 1703
- Li H. 2011. Blood Pressure lowering effect of a Pea Protein hydrolysate in hypertensive rats and humans. *J Agric Food Chem* 59(18): 9854 – 9860.
- Gutkowska, J., Jankowski, M., & Antunes-Rodrigues, J. (2014). The role of oxytocin in cardiovascular regulation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20133309>
- Kasama, S., Furuya, M., Toyama, T., Ichikawa, S., & Kurabayashi, M. (2008). Effect of atrial natriuretic peptide on left ventricular remodelling in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. <https://doi.org/ehn206> [pii]r10.1093/eurheartj/ehn206
- Saito, Y. (2010). Roles of atrial natriuretic peptide and its therapeutic use. *Journal of Cardiology*. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2010.08.001>
- Santos-Araújo, C., Leite-Moreira, A., Pestana, M. (2015). Clinical value of natriuretic peptides in chronic kidney disease. *Nefrologia*, 35(3), 227–233. Retrieved from www.revistanefrologia.com

- Mas'ud S. 1998. Kajian perusak polong sebagai hama utama pada kacang gude di Sulawesi Selatan. *Prosiding Pekan Serealia Nasional* 373 – 379.
- Pernefri dalam KOMPAS HEALTH. Diabetes dan Hipertensi bisa sebabkan Cuci Darah. 26/6/13. Available at health.kompas.com
- Prodjosudjadi W dan A. Suhardjono. 2009. End-stage renal disease in Indonesia: treatment and development. *Ethnicity and Disease* 19: 33 – 36.
- Saxena KB, RV Kumar dan PV Rao. 2009. Pigeonpea nutrition and its improvement. *Journal of Crop Production* 5(2)
- Syarif A. 2007. Farmakologi dan Terapi Edisi 5. Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia: Jakarta. h 230- 242
- Widiana IGR. 2007. Distribusi geografis penyakit ginjal kronik di Bali: komparasi formula Cockcroft-

Lampiran 1


 REPUBLIK INDONESIA
 KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA

SURAT PENCATATAN CIPTAAN

Dalam rangka perlindungan ciptaan di bidang ilmu pengetahuan, seni dan sastra berdasarkan Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta, dengan ini menerangkan:

Nomor dan tanggal permohonan	: EC00201810615, 1 Mei 2018
Pencipta	
Nama	: Mellinah Hidayat
Alamat	: Jalan Terusan Prof Sutarni I No 19 RT 006 RW 003, Bandung, Jawa Barat, Bandung 40163
Kewarganegaraan	: Indonesia
Pemegang Hak Cipta	
Nama	: Mellinah Hidayat, UNIVERSITAS KRISTEN MARANATHA,
Alamat	: Jalan Terusan Prof Sutarni I No 19 RT 006 RW 003, Bandung, Jawa Barat, Bandung 40163
Kewarganegaraan	: Indonesia
Jenis Ciptaan	: Karya Ilmiah
Judul Ciptaan	: PEMBUATAN DAN PENGUJIAN PROTEIN HIDROLISAT KACANG POLONG HIJAU UNTUK TERAPI PERBAIKAN FUNGSI GINJAL
Tanggal dan tempat diumumkan untuk pertama kali di wilayah Indonesia atau di luar wilayah Indonesia	: 1 Mei 2018, di Bandung
Jangka waktu perlindungan	: Berlaku selama 50 (lima puluh) tahun sejak Ciptaan tersebut pertama kali dilakukan Pengumuman.
Nomor pencatatan	: 000107038

adalah benar berdasarkan keterangan yang diberikan oleh Pemohon.
Surat Pencatatan Hak Cipta atau produk Hak terkait ini sesuai dengan Pasal 72 Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta.



LAMPIRAN
PEMEGANG

a.n. MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL



Dr. Freddy Harris, S.H., LL.M., ACCS.
NIP. 196611181994031001

Lampiran 2.

Kidney Therapeutic Potential of Peptides Derived from the Bromelain Hydrolysis of Green Peas Protein

Abstract

The kidney therapeutic potential of peptides derived from the bromelain hydrolysis of green peas proteins (PHGPB) was examined based on protein characteristics, antioxidant activity, effective doses for kidney function, and kidney-related peptides in gentamycin-induced rat models of kidney disease. The aim of this study is to obtain effective dose of protein hydrolysate that exerts a therapeutic effect on Chronic Kidney Disease (CKD) base on reducing urea and creatinine levels and to elucidate its mechanism of action. The characteristics, proteomic profile, and SOD antioxidant activity and kidney-related peptides (ANP, COX-1, and renin) of PHGPB in the kidney of gentamycin-induced Wistar rats were examined. PHGPB showed three bands under 10 kDa using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE) and contained 10 identified proteins using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Significant differences in urea and creatinine levels were found between all PHGPB treatments and positive controls ($p < 0.01$). The lowest levels of urea and creatinine, which were validated by high super oxide dismutase (SOD) activity and atrial natriuretic peptide (ANP) level, were obtained in the 200 mg/day PHGPB treatment. However, the mean renin level was high and cyclooxygenase-1 (COX-1) level did not exceed the positive and negative control levels. The mean renin level in the 200 mg/day PHGPB treatment (405.17 pg/dL) was similar to that in the comparative control vitamin E (419.60 pg/dL). PHGPB dose 200mg/kgBW shows a potential CKD therapeutic effect that is dose dependent. Higher PHGPB dose corresponds to better effect on kidney function by increasing antioxidant activity and ANP levels in gentamycin-induced Wistar rats.

Keywords: protein hydrolysate of green peas, bromelain, SOD, renal function, ANP, COX-1, Renin

Introduction

Kidney disease is a global health problem with high health care costs. Basic Health Research Data (RISKESDAS, 2013) showed that 0.2% or 2 per 1000 Indonesians are suffering from kidney failure. The leading cause of chronic kidney disease (CKD) in Indonesia is diabetic nephropathy (52%), followed by hypertension (24%).(1)

A Canadian study stated that the hydrolysate protein of yellow peas (*Pisum sativum* L.) alleviates high blood pressure and CKD. Pea protein hydrolysate (PPH) was used as a potential modulator of the renin–angiotensin system (RAS). PPH reduces blood pressure by increasing the levels of cyclooxygenase-1 (COX-1) in renal tissues.(2) Hydrolysate proteins are amino acid mixtures obtained from the degradation of hydrolyzed proteins using acids, bases, or proteolytic enzymes to produce peptides and small molecules with high solubility.(3) Enzymatic protein hydrolysis improves the function and nutrients of protein sources; it can obtain large amounts of efficient peptides without toxic by-products or the destruction of amino acids.(4)(5)

Hydrolysis of green peas proteins produces antioxidant (AO), anti-inflammatory, and hypolipidemic peptides that can be used as supportive therapy in cardiovascular disease.(6) Such peptides also display antimicrobial, antihypertensive, immunomodulatory, and anticancer activities.(7,8) The bioactive peptides are released from the protein parent through hydrolysis by digestive enzymes.(3) Peptides are utilized as functional foods that demonstrate therapeutic effects and as nutraceuticals to prevent damage and various diseases caused by oxidative stress.(6) Several studies proved that PPH features antioxidant and antihypertensive properties.(9,10) Proteolytic enzymes from plants have been extensively studied because of their easy and simple production. Bromelain enzyme is more effective than papain in producing fish protein hydrolysates with desirable bioactivities (e.g., angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antioxidant activity) and functional properties (e.g., high degree of hydrolysis (DH)).(11)

The kidneys excrete urea and creatinine as waste products of protein metabolism. However, this function is impaired when the kidneys are injured. Creatinine is the waste product of the breakdown of creatinine protein phosphate, a compound found in skeletal muscle tissue. Creatinine levels in blood increase when the kidneys are impaired. Therefore, creatinine level is very useful in evaluating renal function. Increased creatinine levels indicate kidney damage characterized by decreased glomerular filtration rate.(12) Kidney damage is associated with many factors, including hyperactivity of ACE and renin in the RAS, calmodulin phosphodiesterase 1, and atrial natriuretic peptide (ANP). The main targets of antihypertensive peptides are renin and ACE.(13)(14)

ANP is related to hypertension and plasma volume expansion.(15) ANP is a major component in the cardiac–renal axis that participates in hemodynamic decline of the heart, increasing the excretion of sodium to improve blood pressure and vascular function. ANP increases in complicated CKD patients with deteriorating renal function, but the association of plasma ANP levels with CKD damage remains unclear.(13,16) ANP confers protection on the kidney by inhibiting the proliferation of mesangial cells and renal fibrosis.(17) However, the

predictive value of ANP as a CKD marker in cases of heart disease and blood vessels has not been standardized to date.(18)

In Indonesia, yellow peas are rare, and green peas are still not commonly consumed by the public. CKD cases continue to increase every year in this country. Thus, functional foods to prevent kidney damage in CKD patients are needed. In our previous study, we compared the effects of hydrolysate proteins from yellow beans (Canada), pea protein isolates (Canada), Indonesian green peas (*Pisum sativum*), and Gude seeds (*Cajanus cajan*) hydrolyzed by two enzymatic proteases (neutrase or bromelain) on the renal function of cisplatin-induced rats to produce a hydrolysate protein that can improve kidney function. Results showed that the peptide derived from the bromelain hydrolysis of Indonesian green peas proteins (PHGPB, 25.71% protein, 9.28% fat) showed the lowest levels of urea and creatinine in cisplatin-induced female Wistar rats.(19)

PPH contains natural antioxidants that alleviate CKD.(10)(20) However, the therapeutic effects and mechanisms of PHGPB for CKD remain to be investigated.

Therefore, the present study aimed to obtain a hydrolysate protein (i.e., PHGPB) that exerts a therapeutic effect on CKD by reducing urea and creatinine levels and to elucidate its mechanism of action. The characteristics, proteomic profile, and SOD antioxidant activity and kidney-related peptides (ANP, COX-1, and renin) of PHGPB in the kidney of gentamycin-induced Wistar rats were examined.

Materials and Methods

Green beans (*Pisum sativum* L.) were obtained from Maica leaf, Magelang Plantation, Central Java, Indonesia. Bromelain enzyme was obtained from pineapple stems (*Ananas sativus*) from Subang, North Bandung, Indonesia. Gentamycin (80 mg) for injection/intraperitoneal was purchased from a local drug store. SOD Activity Colorimetric Assay Kit (BioVision Incorporated, USA K335); ANP (QY-E11002), COX-1 (QY-E10736), and Renin (QY-11096) reagent kits from Qayee-bio for ELISA; 10× RIPA buffer (156034); and protease and phosphatase inhibitor cocktail (ab 201119) were used in the study.

Subject. Fifty-six healthy male Wistar rats (5–6 weeks) weighing 148–190 g were obtained from the School of Life Sciences and Technology, Bandung Institute of Technology, Indonesia.

Protease Preparation. For bromelain production, a solution obtained from pineapple stem (*Ananas sativus*) was filtered and centrifuged at 4000 rpm for 10 min. The protein concentration of bromelain was determined using Bradford method(21) with tryptophan as standard.(22) In addition, the total specific activity of the enzyme and the hydrolysate protein content were measured by Kunitz's method and the BSA curve. (20) The molecular weight of the hydrolysate protein was measured by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).(23)

Protein Hydrolysate Preparation. Protein hydrolysates were prepared as previously described with modification.(9,24) Dry seeds (500 g) of green peas were mashed, sieved through a 120-mesh sieve, and then dissolved in 2000 mL of water. Bromelain 10% (w/v) was added to each solution (25) and then left for 72 h (26) on a stirrer at room temperature (25–30 °C).(27) After 72 h, each solution was transferred to a tube and then centrifuged at 6000 g for 10 min. The supernatant was filtered using filter paper. SDS-PAGE was used to separate and determine the molecular weight of the protein hydrolysates. (23)

Identification and Characterization of Protein Hydrolysate of Green Peas by Bromelain using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)(28)

Green peas hydrolysate protein was identified and characterized using LC-MS/MS on a Q Exactive Orbitrap mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany) coupled with a Thermo RSLC nano Ultimate 3000 system (Thermo Scientific, USA). Peptides were analyzed by reversed-phase LC. The RP-LC system was equipped with a trap column (Thermo Scientific, P/N 164649) and an analytical column (75 cm × 15 cm, Easy Spray Column PepMap, Thermo Fisher Scientific). Furthermore, the peptides were sprayed using an emitter together with an analytical column fixed to a nanospray ionization source. The peptides were loaded on the pre-column and rinsed using 0.1% formic acid in water for 2 min. They were then resolved on the analytical column using a gradient starting from 5%–7% B for 5 min, 7%–18% B for 100 min, 28%–60% for 10 min, and 60%–95% for 5 min, for a total run of 143 min, which includes the washing step at a constant flow rate of 0.300 µl/min. Solvent A was composed of 0.1% formic acid in water, and Solvent B was composed of 98% acetonitrile and 0.1% formic acid. The Q Exactive was operated in the data-dependent mode with survey scans acquired at a resolution of 50,000 at m/z 400. The top 10 most abundant isotope patterns with charge ≥ 2 from the survey scan were selected with an isolation window of 1.6 and fragmented by higher with normalized collision energies of 35. The maximum ion injection times for the survey scan and the MS/MS scans were 20 and 60 ms, respectively. The ion target value for both scan modes was set to 1E6. Dynamic exclusion of the sequenced peptides was set to 30 s.

LCMS/MS data were searched using the Sequest search algorithm on Proteome Discoverer (version 2.1, Thermo Scientific) against the protein database of *Pisum sativum* ID 3888 downloaded from SwissProt (updated 31 July 2017). The search parameters were as follows: a) precursor mass range within 350–8000 Da; b) minimum peak count of 5; c) signal-to-noise threshold of 1.5; d) bromelain as a proteolytic enzyme allowing up to one missed cleavage; e) precursor mass tolerance of 20 ppm and fragment tolerance of 0.1 Da; f) oxidation of methionine as variable modification and carbamidomethylation of cysteine as fixed modification; and g) 0.1% false discovery rate. Ten proteins were identified from this sample, as seen in Table 1.

In vivo test in gentamycin-induced Wistar Rats

The 56 male Wistar rats were divided into seven treatment groups: Group 1, 50 mg/day PHGPB; Group 2, 100 mg/day PHGPB; Group 3, 200 mg/day PHGPB; Group 4, negative control; Group 5, gentamycin/positive control; Group 6, comparison control (630 mg/day Ketosteril); and Group 7, vitamin E (200 IU d- α -tocopherol). Except for those in the negative control group, all rats were induced with 80 mg gentamycin for 7 days. This experiment has been approved for the ethical clearance from the Ethical Committee of Maranatha Christian University (185/KEP FK UKM-RSI /III/2018).

Sample Collection. SOD activity was measured three times (D0, D7, and D35) spectrophotometrically using COBAS ROCHE 311. Urea and creatinine levels were measured six times (D0, D7, D14, D21, D28, and D35). The normal levels of urea and creatinine for 8–16-week-old male rats are 12.3–24.6 and 0.2–0.5 mg/dL, respectively (Giknis, 2008). The right kidneys of all rats were prepared to obtain kidney homogenates for the measurement of ANP, COX 1, and renin levels.

Kidney Homogenate Making Procedure. RIPA buffer (containing 100 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, and 0.5% sodium deoxycholate) was diluted in 1:9, followed by the dilution of the 1:9 cocktail protease inhibitors. Furthermore, were prepared a mixed buffer, i.e., RIPA buffer ratio: aquabidest: inhibitor = 1: 8: 1. The kidneys of the rats were cut into small pieces above an ice bath, and then chunks of the kidneys were placed in a homogenate mincer equipment (2 mL of mixed solution for each gram of kidney). The slurry obtained was centrifuged twice at 4000 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant was taken to measure the levels of ANP, COX 1, and renin using ELISA. For the final measurement, the supernatant was read by an ELISA reader at 450 nm wavelength.

Statistical Analysis. Values were presented as mean \pm SD. Data obtained were analyzed by ANOVA followed by post-hoc LSD test for multiple comparisons. Differences were considered statistically significant ($p \leq 0.05$) and highly significant ($p \leq 0.01$). The mean levels of ANP, COX 1, and renin were interpreted descriptively.

Results

Results of Bromelain Enzyme Measurement. The activity and amount of proteins in bromelain were 51.185.22 MW and 0.3670 mg/mL, respectively. The total specific activity of bromelain was 556.94 U/ mg. The protein concentration of PHGPB was calculated by dividing the absorbance of the hydrolysate sample at a 50 \times dilution (0.02 sample + 0.98 distilled water at A280 wavelength with BSA equation. The result was 48.778 mg/mL, and the pH of PHGPB was 4.9.

Separation and Measurement of PHGPB Molecular Weight. SDS-PAGE (SpectraMulticolor Low Range Protein Ladder paints. No 26628) patterns showed many

bands at and below 14.4 kDa. PHGPB proteins with a molecular weight smaller than 10 kDa had three bands at 9.625, 8140, and 6156 kD (Figure 1).

Results of Proteomic Examination. Ten proteins were identified from PHGPB: vicilin (14 and 52.2 kDa), albumin-2, lectin, legumin B, legumin K, legume A2, convicilin (46.4 and 66.9 kDa), and provicilin (Table 1). Proteomic analysis of PHGPB using LC-MS/MS identified 10 proteins.

In vivo Test Results

The SOD levels of rat blood serum were measured by spectrophotometry using COBAS ROCHE 311 with the following results (Table 2). Levenne test analysis to determine the distribution of SOD enzyme data showed that the baseline (D0) data are normally distributed ($p > 0.05$). Kolmogorov Smirnov homogeneity test results showed that the baseline data are homogeneous ($p = 0.174$). Thus, ANOVA can be performed.

After rats were induced with gentamicin 80 mg/kg BW for 7 days, the mean SOD level in all groups, especially in the positive control group, decreased on D7 (Table 2). However, administration of PHGPB for 28 days increased SOD enzyme levels in all groups.

Results of Urea Measurements.

Normal levels of urea for male rats aged 8–16 weeks are 12.3–24.6 mg / dL (Giknis). All groups on D0 showed normal urea levels. On D7, only the negative control group showed normal urea level. On D14, D21, D28, and D35, all groups (including negative control groups) showed increased urea levels. On D35, the negative control group showed higher urea levels than normal. Group 3 also showed higher urea levels than normal but were lower (31.4 mg/dL) compared with other doses of groups 6 and 7 (Table 3).

Results of data processing between D0 and D7 with paired t-test showed that induction with 80 mg/kg BW gentamicin for 7 days significantly increased urea level ($p < 0.01$) in all groups, except in the negative control group. This result suggests that kidney damage induced by gentamycin was successful. In group 1, urea levels decreased on D21 after the administration of PHGPB. In groups 2 and 3, urea levels significantly decreased on D7. Similar results were observed in groups 6 and 7 (Table 3).

Test results of paired t-samples showed a significant decrease on D7 ($p < 0.01$) in all groups. Urea levels significantly decreased in groups 1, 2, 3, and 7 ($p < 0.01$). Among the treatment groups, group 3 showed the largest decrease in levels. In the positive control group, urea levels continued to increase (Table 4, Figure 2 and 3).

Results of Creatinine Measurement.

At the end of the treatment period (D35), the serum creatinine level in the positive control group was 167% and 150.6% higher than those in the negative control group and group 3, respectively (Table 5). On the other hand, the mean serum creatinine levels between negative

control and PHGPB were not significantly different ($p < 0.01$). Normal creatinine levels for rats aged 8–16 weeks are 0.2–0.6 mg / dL. On D0, all groups showed normal creatinine levels. Only the negative groups showed normal levels of creatinine on D7 and D14 (Table 5).

On D21, D28, and D35, all groups (including the negative control group) showed elevated creatinine levels. On D35, the negative control group showed higher levels of creatinine than normal, whereas group 3 showed the lowest creatinine levels (0.81 mg/dL) among all groups, although the levels were not yet normal. The graph in Figure 4 and 5 shows that creatinine levels continued to decline over time. Thus, we assumed that prolonging the treatment can yield better results.

Pair t-test analysis of data processing between D0 and D7 showed induction with 80 mg/kg BW gentamicin for 7 days significantly increased creatinine levels in all groups, except in the negative control group ($p < 0.01$) (Table 6). This result suggests that kidney damage induced by gentamycin was successful. In group 1, the creatinine levels decreased from D21 after the administration of PHGPB. In group 3, the urea levels significantly decreased from D14 after the administration of the test substance. Significant reduction in groups 2, 5, and 7 occurred from D7 after the administration of PHGPB (Table 6).

Results Measurement of Kidney-Related Peptide Levels.

Measurements of ANP, COX-1 and renin levels were performed on right renal mouse homogenates using ELISA with the Qayee-bio production kit in triplicates. Because of the limited tools used in our study, the kidney tissue was measured per group so that the average results of data can only be calculated per group as much as three times. These data could not be statistically analyzed, but could be analyzed descriptively (Table 7).

The ANP levels in the negative and gentamycin control groups were 262.70 and 290.47 pg/mL, respectively. The Groups 6 and 7 showed good ANP levels, with 305.73 and 346.83 pg/mL, respectively. The treatment groups showed good results. Results of groups 2 and 3 increased with dose. Group 3 showed the highest mean ANP levels among the three treatment groups (345.26 pg/mL), but they were slightly lower than those in group 7 (346.83 pg/mL) (Table 7).

The negative control group showed a COX-1 level of 247.8 pg/mL, whereas the gentamycin control showed a lower yield of 232.80 pg/mL. Comparison group showed good results, especially group 7 (320.90 pg/mL), whereas group 6 showed only 233.27 pg/mL. Among the treatment groups, group 3 exhibited the highest result (211.77 pg/mL) (Table 7).

Renin level was 295.73 pg/mL in the negative control group while 354.93 pg/mL in the positive control/gentamycin group. Among the three treatment groups, group 1 showed good results (241.23 pg/mL), which was lower than those in the negative and positive controls. Group 3 showed a high rate of renin (405.17 pg/mL), whereas group 6 showed poor results

(339.43 pg/mL) and group 7 showed greater results than the positive control group (419.60 pg/mL) (Table 7).

Discussion

We prepared PHGPB using enzymatic hydrolysis with a readily available enzyme, bromelain. Bromelain shows stronger inhibitory effects on ACE, antioxidant properties, and Degree of Hydrolysis (DH) than papain.(11) The process of hydrolysis in this study was simple and followed the procedures described by Restriani, who found that the bromelain enzyme concentration of 10% yields the highest DH in Nyamplung seed protein (*Calophyllum inophyllum*). (25)

The hydrolysis process was left for 72 h, and the proteolytic activity of the bromelain solution remained relatively stable at room temperature.(26) The enzymatic activity of bromelian began to decrease gradually from 25 °C to 95 °C but remained stable at room temperature. (26,30) This simple method of enzymatic hydrolysis by bromelain aims to produce PHGPB for CKD therapy.

Peel-Protein-Permeate hydrolysate containing a small-molecular-weight peptide (<10 kDa) with 2–6 amino acids exerts a strong inhibitory effect on renin and angiotensin. This antihypertensive potential is due to the easy absorption of hydrophilic peptides with small molecules.(31) The smaller molecular weight of the peptide, the easier it will be to be absorbed by the body. Protein hydrolysate fraction composed mainly of low-molecular-weight peptides (generally < 3 kDa) is more effective as a renin and ACE inhibitor than larger peptides. In general, proline-containing peptides, branch-chain amino acids, and aromatic amino acids have strong inhibitory activity against renin and ACE.(14) In the present study, the types of amino acids and peptides from PHGPB were not been examined.

The PHGPB is suggested to contribute to glomerular cell injury by nephrotoxic substances because gentamycin is mostly excreted through glomerular filtration.(37) Results showed a decrease in creatinine levels due to improvement of glomerular filtration; glomerular cell damage caused by gentamycin can be mitigated by the antioxidant activity of PHGPB. A clear difference in outcome was observed between the three doses of PHGPB groups (levels of SOD activity continued to increase) and the positive control group (levels of SOD activity continued to decline) (Table 2). Pea hydrolysate protein and their fractions have therapeutic potential for CKD preceded by oxidative damage.(10) The hydrolysate protein of molecular weight < 10kDa obtained from fermented peas purified by *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 had the highest antioxidant activity.(38)

The highest average SOD activity and the lowest urea and creatinine levels were obtained by group 3 (PHGPB 200 mg/day). Higher dose possibly corresponds to better kidney protection and antioxidant activity. Comparative analysis revealed significant increases in PHGPB groups 1, 2, and 7 (doses of 100, 200, and vitamin E), respectively (Table 2). Antioxidants from natural sources have been widely used as a therapy for many diseases because they are safe, effective, and include the most common adjuvants used to treat several diseases. For example, Camel whey protein (CWP) is proven to be a powerful natural antioxidant because it

can reduce oxidative stress, improve the function of the immune system, and increase glutathione levels.(39)

Proteomic analysis of PHGPB using LC-MS/MS identified 10 proteins. Common types of specific proteins found in hydrolysate proteins of peas include vicilin, convicilin, provicilin, and legume. Vicilin and convicilin are major allergens of nuts.(32) Legumin or vegetable casein is commonly found in peas, lentils, vetches, and other legumes; it is soluble in water, dissolves in very weak acids and alkalis, and is not coagulated by heat.(33) This fact shows that peas possess a good nutritional content for a balanced diet and may even prevent degenerative diseases, such as type II diabetes and cardiovascular disease.(34) Chemical substances that are responsible for the renal-protective effects, mechanisms, and nutritional properties of the constituent elements (proteins, carbohydrates, ether extracts, and fibers) of green peas remain unclear and need further investigation.(35)

Protein in legume seeds represents about 200 g/kg (dry weight) in peas.(35) Proximate analysis showed that the crude protein content in PHGPB was 25.71%. Peas are a gluten-free, easy-to-obtain, and cheap protein source that is high in antioxidants and energy, micronutrients, antidiabetic and anticancer properties, and fiber and low in cholesterol, fat, and glycemic index.(36) Globulin 7S and 11S from peas and legumes are named vicilin and legumin, respectively. Vicilin fraction contains small amounts of soluble and high soluble non-starch polysaccharides of isoleucine, leucine, phenylalanine, and lysine. Measurement in vitro showed that the protein digestibility values for peas are the same or even higher than that for control protein (Lactalbumins and Casein).(35)

Increased creatinine levels indicate a decrease in glomerular filtration rate.(12) However, the levels of urea and creatinine can only detect the occurrence of CKD when the decline in kidney function expressed in glomerular filtration rate (GFR) is less than 50%. The Cockcroft–Gault formula for human GFR, which is calculated based on blood creatinine levels, is widely used for calculating GFR for humans.(40) However, the formula for calculating GFR in experimental animals is not yet standardized. On the last day of treatment in this study, (D35), all treatment groups (including negative control, ketosteril, and vitamin E groups) showed higher mean creatinine levels compared with the normal creatinine level. This result was probably due to the fact that the induction of gentamycin caused severe renal impairment, but treatment for 28 days showed an improvement (pair t test results, all treatments showed a significant difference from the positive control ($p < 0.01$), although the levels had not reached normal creatinine levels. These results could be achieved by extending treatment time. Regression analysis of creatinine, coefficient of determination R^2 which more than 0.9 was shown by groups 1, 2, 3, 4, 6, and 7. Groups 7 and 3 even showed an R^2 value almost 1.0, indicating that the effect of treatment on outcomes was very strong (Figure 3 and 5).

Although there was some limitations of the study, we try to explain our findings, results of ANP, COX-1 and Renin measurements. Due to limitations of data, mean level of ANP, COX-1 and renin results were interpreted descriptively. However, a controversial result was that the ANP positive control level was higher than the negative control level. Considering the limitations of our study, we cannot explain the said controversial result. Compensatory

mechanisms are possibly present in the body to reach blood pressure homeostasis, which agrees with the findings of Ogawa et al. that ANP increases in complicated CKD patients with deteriorating renal function. However, the association of plasma ANP levels with CKD damage still needs to be investigated.(17) Treatment with PHGPB increased ANP levels in a dose-dependent manner. Group 3 showed ANP levels of 131.42% greater than negative control and 118.86% positive control. However, a controversial result was that the ANP positive control level was higher than the negative control level. Considering the limitations of our study, we cannot explain the said controversial result. Compensatory mechanisms are possibly present in the body to reach blood pressure homeostasis, which agrees with the findings of Ogawa et al. that ANP increases in complicated CKD patients with deteriorating renal function.

In general, COX-1 examination showed poor results, and three treatment groups showed lower results than the positive control/gentamycin group. This result may be due to the short duration of PHGPB administration or to the greater than 3 kDa molecular weight of the peptide contained in PHGPB. Further research is needed for clarification.

Renin result measurement of group 1 showed slight good results, lower than negative and positive control (81.57%) compared with the negative and positive control (67.96%). Nevertheless, whether higher PHGPB dose increases the renin level needs further verification. The same results were found in comparison groups 6 and 7. The mean renin level in the 200 mg/day PHGPB treatment (405.17 pg/dL) was similar to that in the comparative control vitamin E (419.60 pg/dL). This is probably due to the short time of treatment. By the end of the treatment time, the body was still in the phase of adaptation response against kidney damage as a result of gentamicin induction.

Mechanism of improved renal function by antioxidant activity is also due to ANP and low renin level but not through the COX-1 mechanism. ANP has a very important function in the inhibition of renin in the RAS system. (41,42) The high mean ANP level in the gentamycin group signifies a compensatory mechanism of the body to restore blood pressure.(13,16) ANP levels need to be measured several times to evaluate the patterns and trends in the body's response to healthy kidney and injury states.

Conclusion

PHGPB dose 200mg/kgBW shows a potential CKD therapeutic effect that is dose dependent. In specific, higher PHGPB dose corresponds to better kidney protection and antioxidant activity through the mechanistic action of antioxidant activity and ANP levels in gentamycin-induced Wistar rats.

Acknowledgement

We are gratefully acknowledge the financial support of The Directorate General of Research and Development Reinforcement, Ministry of Research, Technology and Higher Education of Indonesia for research grant 2018, SP DIPA-042.06.1.401516/2018.

Conflict of Interest

All contributing authors declare no conflicts of interest.

References

1. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) 2013. Lap Nas 2013. 2013;1–384.
2. Hoskins I. Pea protein may prevent kidney disease [Internet]. www.cabi.org. 2017. Available from: <http://www.cabi.org/nutrition/news/19303>
3. Korhonen H, Pihlanto a. Food-derived bioactive peptides--opportunities for designing future foods. *Curr Pharm Des.* 2003;
4. Malomo SA, Aluko RE. A comparative study of the structural and functional properties of isolated hemp seed (*Cannabis sativa L.*) albumin and globulin fractions. *Food Hydrocoll.* 2015;
5. Tavano OL. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 2013.
6. Pownall TL, Udenigwe CC, Aluko RE. Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum L.*) enzymatic protein hydrolysate fractions. *J Agric Food Chem.* 2010;
7. Shahidi F, Zhong Y. Bioactive peptides. *J AOAC Int.* 2008;91:914–31.
8. Kim SK, Wijesekera I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods.* 2010.
9. Li H, Aluko RE. Identification and inhibitory properties of multifunctional peptides from pea protein hydrolysate. *J Agric Food Chem.* 2010;58(21):11471–6.
10. Pownall TL, Udenigwe CC, Aluko RE. Effects of cationic property on the in vitro antioxidant activities of pea protein hydrolysate fractions. *Food Res Int.* 2011;44(4):1069–74.
11. Gajanan PG, Elavarasan K, Shamasundar BA. Bioactive and functional properties of protein hydrolysates from fish frame processing waste using plant proteases. *Environ Sci Pollut Res.* 2016;
12. Sherwood L. *Human Physiology: From Cells to Systems* [Internet]. 7th ed. Vol. 7th editio, Human Physiology. Yolanda Cossio; 2010. 766 p. Available from: <http://books.google.com/books?id=gOmpysGBC90C&pgis=1>
13. Santos-Araújo, C., Leite-Moreirab,A., Pestana M. Clinical value of natriuretic peptides in chronic kidney disease. *nefrologia* [Internet]. 2015;35(3):227–233. Available from: www.revistanefrologia.com
14. Aluko RE. Structure and function of plant protein-derived antihypertensive peptides. *Current Opinion in Food Science.* 2015.
15. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med.* 1998;
16. Saito Y. Roles of atrial natriuretic peptide and its therapeutic use. *Journal of Cardiology.* 2010.

17. Ogawa N, Komura H, Kuwasako K, Kitamura K, Kato J. Plasma levels of natriuretic peptides and development of chronic kidney disease. *BMC Nephrol*. 2015;
18. de Chatel R, Mako J, Toth M, Barna I, Lang RE. Atrial natriuretic peptide (ANP) in patients with chronic renal failure on maintenance haemodialysis. *Int Urol Nephrol* [Internet]. 1991;23(2):177–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1830872>
19. Hidayat M. Preparation and Examination of Hydrolysate Protein of Green Peas by bromelain for Improvement Kidney Function. Indonesia; EC00201810615, 2018.
20. M K. Crystalline Deoxyribonuclease I. Isolation and general properties spectrophotometric method fo the measurement of desoxyribonuclease activity. *J Genet Physiol*. 1950;33:349–62.
21. Harlow E, Lane D. Bradford Assay. *Cold Spring Harb Protoc* [Internet]. 2006;2006(6):pdb.prot4644-pdb.prot4644. Available from: <http://www.cshprotocols.org/cgi/doi/10.1101/pdb.prot4644>
22. Alu'datt MH, Rababah T, Alhamad MN, Alodat M, Al-Mahasneh MA GS. Molecular characterization and bio-functional property determination using SDS-PAGE and RP-HPLC of protein fractions from two *Nigella* species. *Food Chem*. 2017;230:125–34.
23. UK L. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680–5.
24. Li H, Prairie N, Udenigwe CC, Adebisi AP, Tappia PS, Aukema HM, et al. Blood Pressure Lowering Effect of a Pea Protein Hydrolysate in Hypertensive Rats and Humans. *J Agric Food Chem*. 2011;
25. Restriani R. Hidrolisis secara Enzimatis protein Bungkil Biji Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) menggunakan Bromelain. *Biota*. 2015;1(3):86–91.
26. Hale LP, Greer PK, Trinh CT JC. Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. *Int Immunopharmacol*. 2005;5(4):783–93.
27. Poh S.S and Abdul Majid F. Thermal stability of free bromelain and bromelain-plyphenol complex in pineapple juice. *Int Food Res J*. 2011;18(3):1051–60.
28. Carrillo E, Rubiales D, Castillejo MA. Proteomic Analysis of Pea (*Pisum sativum* L.) Response During Compatible and Incompatible Interactions with the Pea Aphid (*Acyrtosiphon pisum* H.). *Plant Mol Biol Report*. 2014;
29. Giknis MLA CC. *Clinical Laboratory Parameters for Crl: WI (Han)*. Montreal: Charles River Accelerating drug development; 2008. 9 p.
30. Pavan R, Jain S, Shraddha, Kumar A. Properties and Therapeutic Application of Bromelain: A Review. *Biotechnol Res Int*. 2012;
31. Girgih AT, Nwachukwu ID, Onuh JO, Malomo SA, Aluko RE. Antihypertensive Properties of a Pea Protein Hydrolysate during Short- and Long-Term Oral Administration to Spontaneously Hypertensive Rats. *J Food Sci*. 2016;
32. Sanchmonge R, Lopez-Torrejón G, Pascual CY, Varela J, Martín-Esteban M SG. Vicilin and Convicilin are Potential major Allergens from Pea. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:1747–83.
33. Gilman DC, Peck HT CF. Legumin. In: Rines GE, editor. *The Encyclopedia Americana* [Internet]. New York: Dodd, Mead; 1920. Available from: onlinebooks.library.upenn.edu

34. Leterme P. Recommendations by health organizations for legume consumption. *Br J Nutr.* 2002;88:239–42.
35. Rubio LA, Pérez A, Ruiz R, Guzmán MÁ, Aranda-Olmedo I, Clemente A. Characterization of pea (*Pisum sativum*) seed protein fractions. *J Sci Food Agric.* 2014;94(2):280–7.
36. Maphosa, Y., Jideani V. The Role of Legumes in Human Nutrition. In 2017.
37. Lopez-Novoa JM, Quiros Y, Vicente L, Morales AI, Lopez-Hernandez FJ. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: An integrative point of view. *Kidney International.* 2011.
38. Stanisavljević NS, Goran N, Vukotić GN, Pasto FT3, Sužnjević D JZ. Antioxidant Activity Of Pea Protein Hydrolysates Produced By Batch Fermentation With Lactic Acid Bacteria. *Arch Biol Sci.* 2015;67(3):1033–42.
39. Badr G, Ramadan NK, Sayed LH, Badr BM, Omar HM, Selamoglu Z. Why whey? Camel whey protein as a new dietary approach to the management of free radicals and for the treatment of different health disorders. *Iran J Basic Med Sci.* 2017; 20:338-349; 10.22038/IJBMS.2017.8573
40. Douglas C. Eaton JPP. *Vanders Renal Physiology* [Internet]. 8ed ed. Lange -Mc Graw Hill; Available from: <https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2173§ionid=163663040>
41. Kasama S, Furuya M, Toyama T, Ichikawa S, Kurabayashi M. Effect of atrial natriuretic peptide on left ventricular remodelling in patients with acute myocardial infarction. *Eur Hear J.* 2008;
42. Gutkowska J, Jankowski M, Antunes-Rodrigues J. The role of oxytocin in cardiovascular regulation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2014.