

Pengaruh Variasi Campuran Ekstrak Tempe Kedelai Hitam dan Ubi Jalar Ungu terhadap Aktivitas *Lipid Peroxidation* dan *Reactive Oxygen Species* (ROS) Total pada Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2

Eka Pratama Putri^{1*}, Abdul Gofur¹, Sri Rahayu Lestari¹

¹Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Malang

E-mail: ekapratamaput@gmail.com

Abstrak. Diabetes melitus merupakan penyakit yang ditandai dengan kondisi hiperglikemik kronis. Penyakit diabetes dibagi menjadi dua yakni diabetes tipe 1 dan diabetes tipe 2. Hiperglikemik dapat meningkatkan radikal bebas dalam tubuh. Radikal bebas yang berlebihan akan bersifat toksik dan menyebabkan stress oksidatif. Kondisi stress oksidatif dapat ditandai dengan tingginya aktivitas peroksidasi lipid dan reactive oxygen species (ROS). Aktivitas radikal bebas dapat dicegah dengan antioksidan, bahan yang mengandung antioksidan kuat adalah kedelai hitam dan ubi jalar ungu. Tujuan penelitian untuk mengetahui pengaruh variasi campuran ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar ungu terhadap aktivitas peroksidasi lipid dan reactive oxygen species (ROS) total hepar tikus model DMT2. Pada penelitian ini, mencit dibuat diabetes dengan diet tinggi lemak berupa minuman sukrosa 10% dan disuntik streptozotisin dosis rendah sebanyak dua kali. Hewan coba dibagi menjadi 7 kelompok perlakuan. Pengukuran aktivitas peroksidasi lipid menggunakan metode Thiobarbituric Acid (TBA) dan pengukuran ROS menggunakan metode ELISA. Data peroksidasi lipid berupa kadar MDA, data aktivitas ROS berupa kadar ROS. Data dianalisis dengan One way Anova dengan taraf signifikan 5%. Kandungan antioksidan pada ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar ungu dapat menurunkan kadar glukosa darah tikus, berpengaruh terhadap aktivitas ROS akan tetapi tidak berpengaruh pada aktivitas peroksidase lipid.

Kata kunci : Diabetes melitus tipe 2; Peroksidasi lipid; *Reactive oxygen species* (ROS)

Abstract. Diabetes mellitus is a disease characterized by chronic hyperglycemic conditions. Diabetes Disease is divided into two types namely type 1 diabetes and type 2 diabetes. Hyperglycemia can increase free radicals in the body. Excessive free radicals will be toxic and cause oxidative stress. The condition of oxidative stress can be characterized by high lipid peroxidation activity and reactive oxygen species (ROS). Free radical activity can be prevented with antioxidants, materials containing strong antioxidants are black soybeans and purple sweet potatoes are isoflavones and anthocyanins. this study aimed to determine the effect of black soybean tempe and purple sweet potato extract on lipid peroxidation and reactive oxygen species (ROS) activity in total liver DMT2 mode. In this study, mice were made diabetic with high-fat diet, 10% sucrose drink and injected with low-dose streptozotisin twice. The animals experiment were divided into 7 treatment groups. Measurement of lipid peroxidation activity using Thiobarbituric Acid (TBA) method and ROS measurement using ELISA method. Data on lipid peroxidation activity in the form of MDA levels, data on ROS activity in the form of ROS level. The content of antioxidants in extracts of black soybean tempe and purple sweet potato can lower blood glucose levels, has an effect on ROS activity but it does not affect lipid peroxidase activity.

Keywords: Type 2 diabetic mellitus; Lipid peroxidation; Reactive oxygen species (ROS)

PENDAHULUAN

Penyakit diabetes melitus ditandai dengan kondisi hiperglikemik kronis. Diabetes melitus terdapat dua jenis yakni diabetes tipe 1 yang diakibatkan oleh kurangnya sekresi insulin oleh sel beta pancreas. Diabetes tipe dua yang diakibatkan oleh penurunan sensitivitas jaringan target insulin (Ozougwu et al., 2012). Prevalensi diabetes melitus terus meningkat secara global seiring dengan pertumbuhan penduduk dan gaya hidup yang tidak sehat. Penderita penyakit diabetes melitus mencapai 21.3 juta orang di Indonesia (RISKESDAS, 2014) . Hiperglikemik merupakan salah satu penanda terjadinya kelainan metabolisme karbohidrat, lipid dan protein. Hiperglikemik dapat memicu peningkatan radikal bebas didalam sel. Radikal bebas yang berlebihan dapat bersifat toksik dan mendorong terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif meningkatkan autooksidasi glukosa, asam amino dan lipid yang ditandai dengan peningkatan produksi *Malondialdehyde* (MDA) serta *Reactive oxygen species* (ROS) yang memicu kerusakan DNA (Sakuraba, 2012)

Kerusakan oksidatif dapat dicegah oleh senyawa antioksidan. Senyawa antioksidan bekerja dengan cara menjadi scavenger radikal bebas sehingga dampak negatif radikal bebas dapat dikurangi. Bahan yang banyak mengandung senyawa antioksidan adalah kedelai hitam dan ubi jalar ungu. Kandungan antioksidan tempe kedelai hitam adalah isoflavon (daidzein dan genistein) dan pada ubi jalar ungu adalah antosianin. Kandungan antosianin pada ubi jalar ungu diduga mampu menurunkan kadar glukosa darah. Antosianin bekerja dengan cara meningkatkan kerja reseptor insulin, memperbaiki status antioksidan dengan cara menekan produksi MDA serta memperbaiki level *Superoxide Dismutase* (SOD). Malondialdehid merupakan salah satu penanda stress oksidatif.

Pada penelitian ini digunakan variasi campuran ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar ungu. Tempe mempunyai keterserapan yang baik didalam tubuh sehingga jika dijadikan campuran akan memperbaiki kinerja antioksidan. Hingga saat ini, belum ada penelitian tentang variasi ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar ungu dalam mengatasi Diabetes Melitus (DM) tipe 2. Berdasarkan uraian diatas, dikaji tentang pengaruh variasi campuran ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar ungu terhadap aktivitas peroksidasi lipid dan ROS total pada tikus model DM tipe 2.

MATERIAL DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan penelitian yakni Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 7 perlakuan. Hewan coba yang digunakan adalah 28 tikus jantan galur wistar dengan berat badan 185 ± 15 g.

Pembuatan Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2

Hewan coba diberi pakan tinggi lemak dan diberi minum sukrosa 10%. Komposisi sebagai berikut: pakan *Hi – Go 551* merk Pokpand 300g, jagung 200g, minyak curah 300g, kuning telur bebek

sebanyak 100g, tepung terigu 50g dan asam folat 1% untuk satu resep. Kemudian adonan dikepal hingga berbentuk lonjong dengan berat 15g. Perlakuan ini diberikan selama 30 hari. Hewan kemudian diinjeksi Streptozotocin (STZ) dengan dosis rendah (30mg/kg berat badan dalam 0.1 *citrate-buffered saline*, pH 4,5) sebanyak 2 kali secara intraperitoneal untuk menginduksi DM tipe 2. Kadar glukosa darah tikus dicek 3 hari sesudah penginjeksian. Tikus dikatakan diabetes apabila kadar glukosa darah tikus melebihi 200mg/dl.

Pembuatan Ekstrak Tempe Kedelai Hitam dan Ubi Jalar Ungu

Tempe kedelai hitam dan ubi jalar ungu yang sudah ditepungkan kemudian dibuat ekstrak. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara menimbang tepung ubi jalar ungu sebanyak 10g, kemudian dilarutkan dengan aquadest sampai 100ml, larutan dituang ke dalam beaker glass dan distirer selama 30 menit, setelah 30 menit dituang ke dalam tabung sentrifuge, disentrifuge 2500rpm selama 20 menit. Diambil supernatant dituang dalam botol gelap kemudian botol diberi label, tanggal, dan konsentrasi kombinasi ekstrak. Ekstrak disimpan ke dalam tempat yang dingin. Pembuatan ekstrak tempe kedelai hitam dengan cara yang sama.

Perlakuan Hewan Coba

Perlakuan menggunakan ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar ungu. Hewan coba dibagi dalam 7 kelompok perlakuan yakni Kontrol negatif (K-) tikus DMT2, Kontrol Positif (K+) tikus DMT2 diberi obat glibenklamid, Perlakuan 1 (P1) tikus DMT2 diberi ekstrak kedelai hitam saja, Perlakuan 2 (P2) tikus DMT2 diberi ekstrak ubi jalar ungu saja, Perlakuan 3 (P3) tikus DMT2 diberi campuran ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar perbandingan 1:3, Perlakuan 4 (P4) tikus DM2 diberi campuran ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar perbandingan 2:2, Perlakuan 5 (P5) tikus DM2 diberi campuran ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar perbandingan 3:1. Perlakuan dilakukan selama 30 hari.

Pengambilan Organ Hepar Hewan Coba

Setelah 30 hari perlakuan dengan pemberian variasi campuran ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar ungu tikus dieutanasi dan dibedah kemudian diambil hepar untuk dilakukan pengukuran aktivitas peroksidasi lipid dan ROS (*Reactive Oxygen Species*).

Pengukuran Aktivitas Peroksidase Lipid

Aktivitas peroksidasi lipid diukur dengan metode *Thiobarbituric Acid* (TBA). Organ hepar ditimbang sebanyak 0,1g digerus di dalam mortal dan ditambahkan 1ml aquades. Hasil gerusan hepar yang sudah ditambahkan aquades dimasukkan ke dalam *mikrotube* ditambahkan 100µL TCA, 250µL HCL dan 100µl Na-Thio. *Mikrotube* ditutup dengan *parafilm* dan dipanaskan dalam *water bath* dengan suhu 100 °C selama 20 menit. Setelah dingin disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit

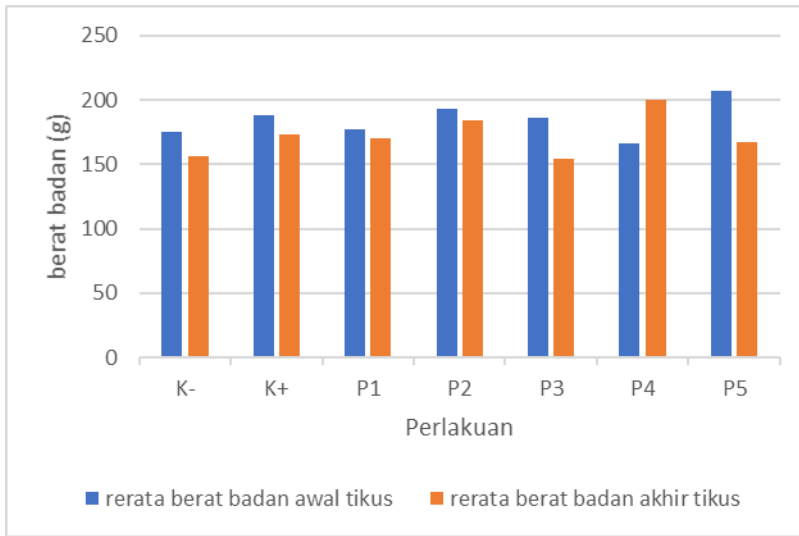
dan supernatan dipindah ke dalam *microtube*. Selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 532nm (Sholikhatin dkk, 2012)

Pengukuran Aktivitas ROS

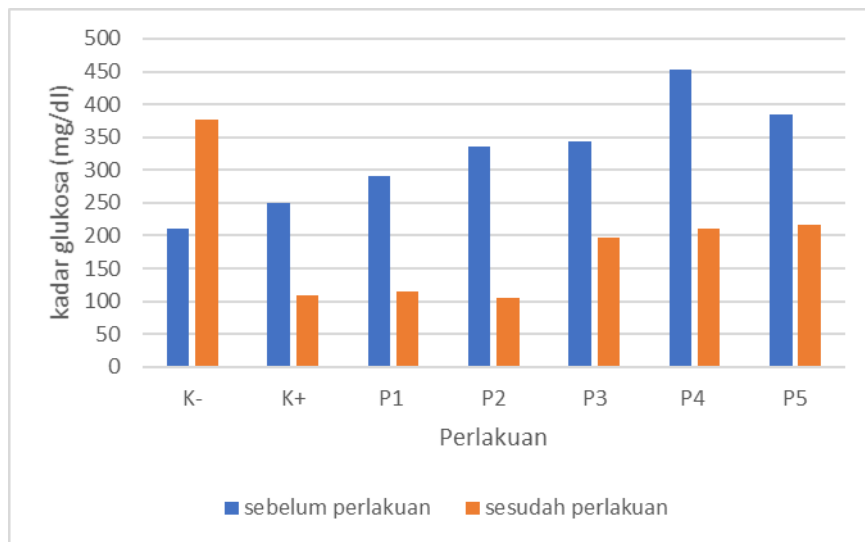
Aktivitas ROS pada hepar tikus diukur dengan metode ELISA. Potongan hepar 0,1g ditambahkan dengan 1ml PBS pH 7,2 digerus didalam mortal dan disentrifugasi dengan kecepatan 5000rpm selama 5 menit. Supernatant kemudian dipisahkan dengan endapannya. Disiapkan plate ELISA dan plate layout. selanjutnya coating antigen, Antigen dilarutkan dalam coating buffer (coating Ag 1:50 μ L). Plate ELISA dibungkus dengan alumunium foil dan diberi label, kemudian diinkubasi pada suhu 4°C 1 x 24 jam. Selanjutnya dicuci dalam PBS;tween 3x, @ 3 menit. Coating Ab primer dalam BSA 1% (50 μ L/ well) diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang, dan dicuci dengan PBS-tween 3x, @3 menit. Kemudian coating Ab sekunder (1:2500) dalam TBS. Ab sekunder yang digunakan adalah : Anti rabbit igG AP conjugated, diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang dan dicuci dalam PBS-tween 3x @3menit. Ditambahkan substrat pNPP dalam dietanolamin 10% (50 μ L/well), Diinkubasi pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan NaOH 3M (50 μ L/well) sebagai *stop reaction*. Setelah 10 menit dan 15 menit dibaca pada elisa reader pada λ 450.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Data yang dikoleksi dalam penelitian ini adalah data berat badan sebelum dan sesudah perlakuan, data kadar glukosa darah tikus sebelum dan sesudah perlakuan, data aktivitas peroksidasi lipid berupa kadar MDA dan data aktivitas ROS berupa kadar ROS. Berat badan tikus ditimbang sebelum dan sesudah perlakuan. Berdasarkan data yang diperoleh ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar ungu dapat menurunkan berat badan dan kadar glukosa darah tikus. Penurunan berat badan yang paling tinggi terdapat pada kelompok perlakuan P5 sedangkan penurunan berat badan paling rendah terdapat pada kelompok K+. Penurunan kadar glukosa yang paling tinggi terjadi pada kelompok P4 dan penurunan kadar glukosa yang paling rendah pada kelompok K+. Pada kelompok K- terjadi peningkatan berat badan dan kadar glukosa darah dikarenakan kelompok K- terus diberi makanan tinggi lemak (Gambar 1 dan 2). Pemberian pakan tinggi lemak dapat memediasi terjadinya resistensi insulin akibatnya glukosa meningkat. Jaringan adiposa pada individu yang obesitas akan lebih banyak melepaskan non-esterified fatty acids (NEFA), gliserol, dan sitokin pro inflamasi (Mukherjee et al., 2013).



Gambar 1. Rerata berat badan tikus (g). K- (DMT2), K+ (DMT2 + glibenklamid), P1 (DMT2 + ekstrak tempe kedelai hitam), P2 (DMT2 + ekstrak ubi jalar ungu), P3 (DMT2 + campuran ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar ungu dengan perbandingan 3:1), P4 (DMT2 + campuran ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar ungu dengan perbandingan 2:2), P5 (DMT2 + campuran ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar ungu dengan perbandingan 1:3)

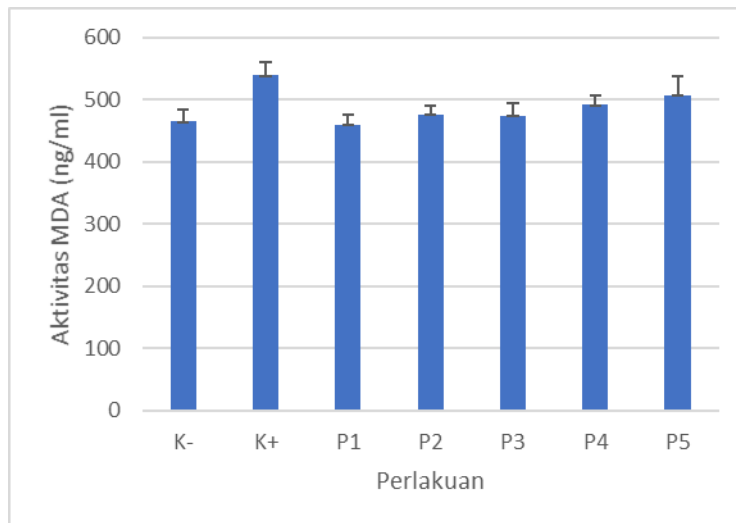


Gambar 2. Rerata kadar glukosa darah tikus DMT2 (mg/dl). K- (DMT2) K+ (DMT2 + glibenklamid), P1 (DMT2 + ekstrak tempe kedelai hitam), P2 (DMT2 + ekstrak ubi jalar ungu), P3 (DMT2 + campuran ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar ungu dengan perbandingan 3:1), P4 (DMT2 + campuran ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar

ungu dengan perbandingan 2:2), P5 (DMT2 + campuran ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar ungu dengan perbandingan 1:3

Penurunan kadar glukosa tikus pada kelompok perlakuan disebabkan flavonoid mampu menurunkan kadar glukosa darah dengan memperbaiki sensitivitas insulin. Peningkatan sensitivitas insulin melalui aktivasi *activated protein kinase* (AMPK) menstimulasi serapan glukosa dan sekresi insulin oleh sel β pankreas. Aktivasi AMPK juga bekerja dalam upregulasi GLUT4 dalam jaringan adiposa dan otot rangka, menghambat glukoneogenesis dan menstimulasi sintesis glikogen (Choi *et al*, 2016).

Aktivitas peroksidasi lipid pada kelompok perlakuan P2, P3, P4, dan P5 menunjukkan aktivitas peroksidasi lipid yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Aktivitas peroksidasi lipid pada kelompok K+ dan K- masing-masing sebesar 465.63 ng/ml dan 539.38 ng/ml. Kelompok perlakuan P1 memiliki aktivitas peroksidasi lipid yang paling rendah yakni sebesar 457.75 ng/ml, jika dihubungkan dengan data berat badan dan kadar glukosa darah tikus kelompok perlakuan P1 terjadi penurunan yang cukup tinggi sebelum dan sesudah perlakuan (Gambar 3). Variasi campuran ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar ungu secara statistik tidak berpengaruh terhadap aktivitas peroksidasi lipid, namun kelompok perlakuan P1 menunjukkan aktivitas peroksidasi lipid yang lebih rendah jika dibandingkan dengan normal. Aktivitas peroksidasi lipid pada kelompok normal adalah 450.00 ng/ml.



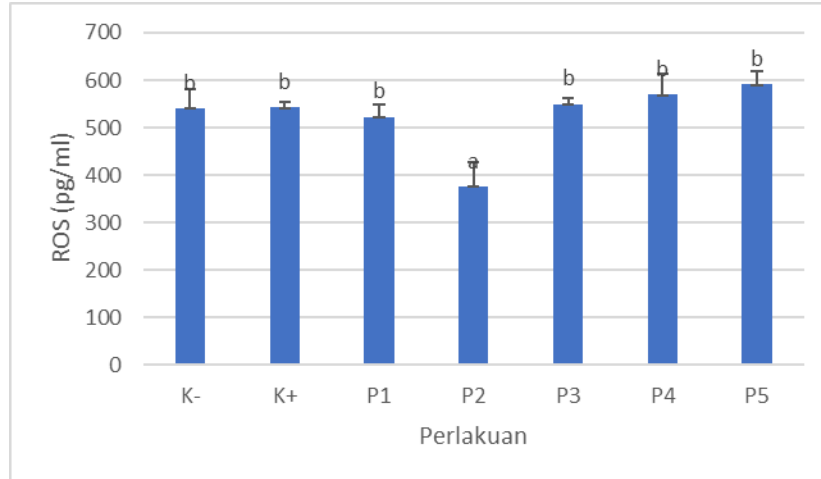
Gambar 6. Aktivitas *peroksidasi lipid* berupa kadar MDA hepar tikus model DMT2. K- (tanpa obat), K+ (glibenklamid), P1 (ekstrak tempe kedelai hitam), P2 (ekstrak ubi jalar ungu), P3 (campuran ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar ungu dengan perbandingan 3:1), P4 (campuran ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar ungu dengan

perbandingan 2:2), P5 (campuran ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar ungu dengan perbandingan 1:3)

Aktivitas peroksidasi lipid yang tinggi diduga karena hal sebagai berikut. Variasi campuran ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar ungu belum menurunkan aktivitas peroksidase lipid. Tingginya aktivitas peroksidasi lipid hepar tikus diduga dikarenakan beberapa hal sebagai berikut. Tikus diduga sudah menderita diabetes kronis, sehingga kadar MDA pada hepar sudah cukup tinggi. Penelitian ini menggunakan tikus yang diinduksi STZ dengan *multiple low dosis* (30 mg/ kgBB), Menurut Kakkar et al. (1998), Peningkatan peroksidasi lipid di hati sudah terjadi setelah satu minggu induksi STZ dosis rendah. Dosis rendah STZ yang digunakan sudah dapat menimbulkan diabetes dengan kerusakan pada organ walaupun sedikit (Koulmanda et al., 2003). Kedua, terjadi auto-oksidasi glukosa. ketiga produksi ROS yang berlebih pada mitokondria, keempat adalah glikasi nonenzimatik dan yang terakhir adalah jalur poliol (Lemos et al., 2012).

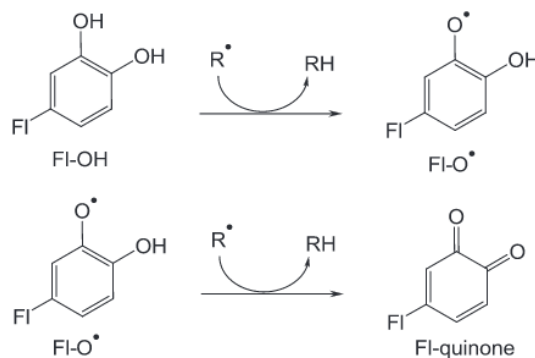
Terdapat pengaruh variasi campuran ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar ungu terhadap aktivitas *reactive oxygen species* (ROS) total pada tikus model diabetes melitus tipe 2 karena nilai sig. $0.006 < 0.005$. Aktivitas ROS dapat dilihat pada ringkasan gambar 3. Kelompok P2 berbeda nyata dengan kelompok lainnya (K-, K+, P1, P3, P4, P5). Kelompok P2 menunjukkan aktivitas ROS yang rendah jika dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Kelompok P1 tidak berbeda nyata tetapi menunjukkan penurunan aktivitas ROS jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar ungu berpotensi untuk menurunkan aktivitas ROS hepar tikus model DMT2 tetapi tidak pada perlakuan kombinasi.

Reactive Oxygen Species merupakan oksidan yang reaktif. Keberadaan ROS dalam jumlah tinggi dalam tubuh akan menyebabkan stress oksidatif. Setiap ROS yang terbentuk dapat memulai suatu reaksi berantai yang terus berlanjut sampai ROS itu dihilangkan dengan antioksidan (Wijaya, 1996). Antioksidan yang terkandung dalam ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar ungu adalah isoflavon (daidzein dan genistein) dan antosianin. Kedua senyawa tersebut merupakan senyawa flavonoid yang bisa bertindak menjadi *scavenger* radikal bebas (Procházková et al., 2011)

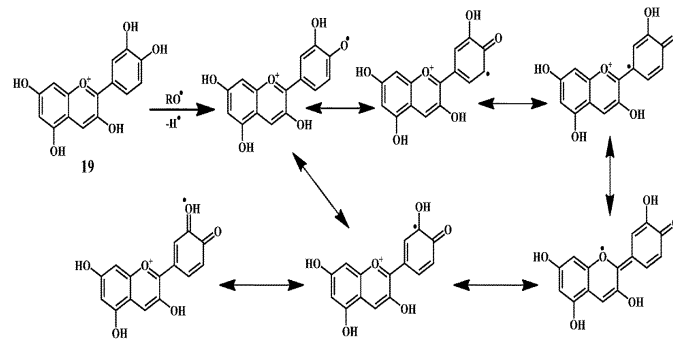


Gambar 3. Rerata Aktivitas ROS total Hepar Tikus. K- (DMT2), K+ (DMT2+glibenklamid), P1 (DMT2+ekstrak tempe kedelai hitam), P2 (DMT2+ekstrak ubi jalar ungu), P3 (DMT2+campuran ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar ungu dengan perbandingan 3:1), P4 (DMT2+campuran ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar ungu dengan perbandingan 2:2), P5 (DMT2+campuran ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar ungu dengan perbandingan 1:3)

Flavonoid dapat segera mengkelat radikal bebas dengan cara menyumbangkan atom hidrogen (Gambar 4). Antosianin dapat menurunkan aktivitas ROS dengan cara menyumbangkan elektron ke radikal bebas dari gugus hidroksil (-OH) yang terikat pada cincin fenolik (Gambar 5). Elektron tersebut akan menstabilkan dan menginaktivasi radikal bebas. Dalam proses ini, zat pereduksi polifenolik berubah menjadi radikal aroksil, yang relatif lebih stabil karena resonansi dari pada radikal bebas yang telah berkurang. Hasil keseluruhan adalah penghentian reaksi berantai oksidatif yang merusak (Nimse & pal, 2014)



Gambar 4. Flavonoid bertindak sebagai scavenger. FI-O mungkin akan bereaksi dengan radikal bebas kedua dan membentuk quinone yang stabil. (Sumber : Procházková et al., 2011)



Gambar 5. Antosianin menyumbangkan elektron ke radikal bebas (Nimse & pal, 2014)

KESIMPULAN

Penelitian ini mengindikasikan adanya pengaruh yang signifikan dari kandungan antioksidan pada ekstrak tempe kedelai hitam dan ubi jalar ungu dapat menurunkan kadar glukosa darah tikus, berpengaruh terhadap aktivitas ROS akan tetapi tidak berpengaruh pada aktivitas peroksidase lipid.

DAFTAR RUJUKAN

- Choi, K. H., Lee, H. A., Park, M. H. Han, J. S. (2016). Mulberry (*Morus alba* L.) fruit extract containing anthocyanins improves glycemic control and insulin sensitivity via activation of AMP activated protein kinase in diabetic mice. *J. Med. Food.* 19 :737–745.
- Kakkar, R., Jawahar K., Subrahmanyam V. M., dan Kailash. (1995). Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 151:113-119
- Koulmanda, A. Qipo, H. A. Jr & Smith, R. N. (2003). Effects of streptozotocin on autoimmune diabetes in NOD mice. *Clin Exp Immunol.* 134 :210–216
- Lemos, E., Jorge, O., Jo˜ao P. P., dan Fl ´avio Reis. (2012). Regular Physical Exercise as a Strategy to Improve Antioxidant and Anti-Inflammatory Status: Benefits in Type 2 Diabetes Mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 3 : 15-17
- Mukherjee B., Chowdhury M. H., Laboni M., Paramita P., and Miltu K. G. (2013). Obesity and Insulin Resistance: An Abridged Molecular Correlation. *publisher and licensee Libertas Academica Ltd.*6: 1–11

- Nimse, S. dan Pal, D. (2015). Free Radical, Natural Antioxidant, and their Reaction Mechanism. *The Royal Society of Chemistry*. 5: 279-280.
- Ozougwu, J. C., Obimba, K. C., Belonwu, C. D., dan Unakalamba, C. B. (2013). The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Physiology and Pathophysiology*. 4: 46-57
- Procházková D., Bousová I., Wilhelmová N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. 82:513-523
- Sakuraba, H., Mizukami, H., Yagihashi, N., Wada, R., Hanyu, C., Yagihashi, S. (2002). Reduced beta cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islets of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia*; 45: 85-96