

Pengaruh Pemberian Isoflavon terhadap Peroksidasi Lipid pada Hati Tikus Normal

TYAS RETNO¹,
SRI KAYATI WIDYASTUTI², NYOMAN SUARSANA¹

¹Lab Biokimia Veteriner, ¹Lab Penyakit Dalam Hewan Kecil,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana
Jl.P.B.Sudirman Denpasar Bali tlp. 0361-223791
Email: tyasretnowidyawati@yahoo.com

ABSTRAK

Pengaruh pemberian isoflavon terhadap peroksidasi lipid pada hati tikus normal bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian isoflavon terhadap peroksidasi lipid pada hati tikus normal, Dengan adanya asupan antioksidan ini diharapkan dapat menurunkan hasil akhir MDA yang dihasilkan oleh reaksi peroksidasi lipid dari radikal bebas, sehingga dapat digunakan untuk acuan bagi pencegahan pada penyakit degeneratif khususnya pada organ hati serta dapat menghambat terjadinya penuaan dini pada sel atau organ.

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan masing-masing terdiri dari 3 ulangan. Variabel yang diamati yaitu perubahan peroksidasi lipid pada masing-masing perlakuan. Data dari hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan sidik ragam (ANOVA). Jika hasil analisis berbeda nyata ($P < 0,05$) akan dilanjutkan dengan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan, bahwa isoflavon pada dosis 1,3 mg isoflavon mempunyai aktivitas antioksidan sebesar 32,59 % 2,6 mg isoflavon sebesar 52,37% , 3,9 mg isoflavon sebesar 68,21 % , 5,2 mg isoflavon sebesar 82,32% dan 6,5 mg isoflavon sebesar 92,74%. Hasil analisis kadar MDA hati menunjukkan bahwa isoflavon dapat menurunkan kadar MDA pada hati tikus normal. Kadar MDA pada hati tikus yang diberi isoflavon dosis 1,2,4 dan 6 mg/200/BB/hari/oral masing masing (44.75 picomol/g), (42.81 picomol/g), (40.95 picomol/g), (40.75 picomol/g), sedangkan pada tikus normal kadar MDA sebesar (44.57 picomol/g). Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa isoflavon mempunyai aktivitas antioksidan IC50 pada konsentrasi 2,45 mg isoflavon sehingga pemberian isoflavon dapat menurunkan kadar Malonaldehida (MDA) pada kelompok tikus normal. Kadar

isoflavon terbaik yang dapat menurunkan kadar MDA adalah pada pemberian dosis 6 mg/200/BB/hari/oral.

Kata kunci : Isoflavon, peroksidasi lipid, kadar Malonaldehida (MDA), hati tikus normal.

PENDAHULUAN

Perkembangan teknologi yang makin maju di bidang nutrisi telah membuktikan bahwa zat gizi beserta komponen aktifnya berperan dalam kesehatan. Salah satu komponen aktif tersebut adalah isoflavon. Isoflavon adalah salah satu senyawa kimia yang masuk dalam senyawa metabolit sekunder yang banyak terdapat pada tumbuh-tumbuhan. Senyawa-senyawa tersebut pada umumnya dalam keadaan terikat/konjugasi dengan senyawa gula atau senyawa kimia lainnya. Isoflavon terdapat dalam 2 bentuk, yaitu bentuk aglikon (bebas) dan bentuk konjugasi (terikat). Isoflavon dapat bekerja lebih efektif jika terdapat dalam bentuk bebas, dan sangat bermanfaat bagi manusia. Isoflavon hanya terdapat dalam tumbuh-tumbuhan, terutama jenis *Leguminoceae* (misal: kedelai, kacang-kacangan) dan tersebar diseluruh bagian (akar, batang, daun, buah). Salah satu tanaman yang kaya akan isoflavon adalah kedelai, dan paling banyak terdapat di bagian endosperma (germ) serta kotiledon (bakal daun yang pertama). Kandungan isoflavon pada kedelai berkisar 2–4 mg/g kedelai. (Koswara, 2006).

Senyawa isoflavon pada umumnya berupa senyawa kompleks atau berikatan dengan senyawa gula melalui ikatan glukosida. Salah satu produk kedelai yang kaya akan isoflavon adalah tempe. Tempe merupakan makanan tradisional yang banyak digemari masyarakat di Indonesia. Hal ini karena tempe adalah makanan sehat dengan harga yang merakyat. Selain dari segi harga, faktor lain yang menjadikan tempe menjadi primadona dari produk olahan kedelai lainnya adalah kandungan nutrisinya yang tinggi, baik protein maupun komponen senyawa kimia aktif lainnya, diantaranya adalah isoflavon. Tingginya kandungan isoflavon pada tempe disebabkan oleh proses pembuatan tempe yang menggunakan fermentasi kapang (*Rhizopus sp.*).

Selama proses fermentasi, struktur kimia dalam isoflavon terhidrolisa, sehingga senyawa gula dibebaskan dari bentuk glikosida menjadi bentuk aglikon (bebas)(Sucipto, 2008).

Hasil akhir dari sederetan reaksi-reaksi kimia tersebut akan menghasilkan senyawa-

senyawa isoflavon bebas yang mempunyai aktivitas biologi lebih tinggi. Senyawa isoflavon diketahui mempunyai aktivitas antioksidan yang berperan dalam menghambat penyakit degeneratif terutama yang disebabkan oleh radikal bebas. Radikal bebas merupakan molekul atau atom yang tidak stabil karena memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Sumber radikal bebas bisa dari sumber endogen ataupun dari sumber eksogen. Sumber endogen berasal dari hasil metabolisme normal tubuh dan proses fagositosis sedangkan secara eksogen radikal bebas berasal dari lingkungan, polusi, asap rokok, obat-obatan, aktivitas pembakaran bahan, bakar pada mesin, dan kendaraan bermotor.

Peroksidasi lipid merupakan proses yang bersifat kompleks akibat reaksi asam lemak tak jenuh jamak, berkemampuan sebagai penyusun fosfolipid membran sel dengan senyawa oksigen reaktif (ROS), kemudian membentuk hidroperoksida. Pertama, ROS ialah senyawa turunan oksigen yang lebih reaktif dibandingkan oksigen pada kondisi dasar (ground state). Kedua, ROS tidak hanya terdiri atas molekul oksigen tanpa pasangan elektron seperti radikal hidroksil ($\cdot\text{OH}$), radikal superoksida ($\cdot\text{O}_2^-$), dan nitrit oksida ($\text{NO}\cdot$), tetapi juga molekul reaktif yang memiliki elektron berpasangan. Molekul oksigen yang memiliki elektron berpasangan tersebut diantaranya, hidrogen peroksida (H_2O_2), asam hipoklorous (HOCl), dan anion peroksinitrit (ONOO^-).³ Target utama peroksidasi oleh ROS adalah asam lemak tak jenuh majemuk (PUFA) dalam lipid membran. PUFA didegradasi oleh radikal-radikal bebas sehingga menghasilkan produk akhir yang disebut dengan Malonaldehida (MDA). Menurut Prangdimurdi (2011), MDA sebagai produk akhir dapat digunakan untuk mengetahui derajat kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid hasil dari radikal bebas ini akan selalu membentuk reaksi berantai yang terus berlanjut sampai radikal bebas ini dihilangkan oleh radikal bebas lain dan oleh sistem antioksidan dari tubuh. Antioksidan bereaksi dengan antioksidan sehingga mengurangi kapasitas untuk menimbulkan kerusakan. Upaya untuk meninggikan antioksidan dalam tubuh dapat dilakukan dengan cara mengonsumsi bahan pangan yang mengandung zat-zat gizi antioksidan maupun zat gizi non antioksidan (komponen bioaktif). Kedelai merupakan bahan penghasil antioksidan alami, salah satu komponen terpenting dalam kedelai dan bertindak sebagai antioksidan adalah isoflavon. Isoflavon mampu merangsang ekspresi Cu-Zn Sod yang dapat melindungi sel dari serangan stress oksidatif sehingga tidak terbentuk produk peroksidasi lipid yang berkepanjangan.

MATERI DAN METODE

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 25 ekor tikus putih betina strain spraque dawly (SD) umur 3 bulan dengan berat badan rata-rata 200 g.

Bahan- bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi tempe rendah lemak hasil purifikasi oleh Dr.drh. Nyoman Suarsana, Buffer Tris –HCL, Methanol, Etanol dan DPPH(1,1 diphenyl -2 pycryl hydrazyl), larutan NaCl Fisiologis, HCL 0,25 N yang mengandung 15% TCA (Trichloro acetic acid) dan 0,38% TBA (Triobarbiturat acid) dan 0,5% BHT (Butylated hydroxytouene) obat bius dan TEP (1.1.3.3- tetraethoxypropane).

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kandang tikus berupa kotak plastik dan tutup kandang yang terbuat dari anyaman kawat, botol tempat minum tikus, spuit 3 ml, sekam, alat bedah, sentrifugase, mikropipet, vortek,kuvet, labu ukur, pipet,pipet ukur,plat tetes, aluminium foil, lemari pendingin, spektrofometer, sonde lambung, mortar dan incubator.

Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari 5 perlakuan dan masing – masing perlakuan terdiri dari 3 ulangan .

Kelompok kontrol : Hewan percobaan placebo diberi aquades 0,5 cc.

Kelompok perlakuan I : Hewan percobaan diberi isoflavon dengan dosis isoflavon 1mg /200 g BB/hari/oral.

Kelompok perlakuan II : Hewan percobaan diberi isoflavon dengan dosis isoflavon 2 mg /200 g BB/hari/oral.

Kelompok perlakuan III : Hewan percobaan diberi isoflavon dengan dosis isoflavon 4 mg/200 g BB/hari/oral.

Kelompok perlakuan IV : Hewan percobaan diberi isoflavon dengan dosis isoflavon 6 mg/200 g BB/hari/oral.

Pembuatan Isoflavon Tepung Tempe Rendah Lemak

Pembuatan isoflavon tepung tempe rendah lemak adalah sebagai berikut :

Tempe dicacah, kemudian dimasukkan kedalam incubator selama 2 hari. Setelah kering dilakukan penggerusan dengan menggunakan mortar, kemudian setelah itu dilakukan pengayakan dengan menggunakan ayakan 60 smas, setelah itu kemudian dilakukan penimbangan kemudian diambil ekstrak sebanyak 100 gram, lalu ditambah dengan menggunakan heksan dengan tujuan untuk menghilangkan lemak. Kemudian dilakukan pengeringan dengan menggunakan evaporator hingga kering dan tinggal intisari tepung. Kemudian tepung dimasukkan incubator dan selanjutnya dimasukkan kedalam destilator.

Uji Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas Antioksidan bertujuan untuk mengetahui parameter konsentrasi yang ekuivalen dari antioksidan tersebut. Pada uji ini menggunakan metode DPPH (mimura, 2003) dengan cara mengambil etanol 99% dengan konsentrasi (0) (0,1).(0,2)(0,3)(0,4) dan (0,5) lalu ditambahkan kedalam 1,5 ul larutan sampel,ditambahkan 3,5 ml larutan mM DPPH (1,1-diphenyl -2 – pycryl hydrazyl) dan divortek, dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas whatman, kemudian divortek kembali setelah itu diinkubasi pada suhu 20° C dalam ruang gelap selama 20 menit Absorbansi diukur pada 517 nm.

Pengolahan Data

Aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan persentase inhibisi serapan DPPH dengan menggunakan rumus :

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{\text{Abs. control} - \text{Abs sample}}{\text{Abs.kontrol}} \times 100 \%$$

Ket :

Abs kontrol : Serapan radikal DPPH pada panjang gelombang 517 nm.

Abs. sample: Serapan sample radikal DPPH pada panjang gelombang 517 nm.

Pemeliharaan Hewan Percobaan

Tikus percobaan diadaptasi dengan situasi dan kondisi lingkungan laboratorium dengan pemberian pakan dan air minum *ad libitum* selama 2 minggu. Kemudian ditimbang dan dibagi secara acak menjadi 5 perlakuan . Setiap perlakuan terdiri dari 3 ekor tikus.

Perlakuan kelompok kontrol (I) hanya diberi aquades 0,5 cc/oral /hari, sedangkan perlakuan kelompok II- IV diberi isoflavon dengan dosis isoflavon masing- masing 1 mg/200 g BB, 2 mg /200 g BB, 4 mg/200 g BB dan 6 mg/200g BB/hari. Pelaksanaan diberikan secara oral menggunakan (sonde lambung) selama 1 bulan. Selanjutnya tikus dibius dengan menggunakan ketamin Hcl 0,2 cc/gram. Kemudian dilakukan pengambilan darah melalui jantung, setelah hewan mati dilakukan pengambilan organ hati guna untuk pemeriksaan Malonaldehida (MDA).

Analisis Kadar Malonaldehida (MDA)

Kadar peroksidasi lipid (MDA) dianalisis menggunakan metode Capeyron *et al* (2002) dengan prosedur sebagai berikut :

Sebanyak 1 g hati digerus dalam kondisi dingin dan ditambahkan 1 cc NaCl fisiologis. Homogenat disentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit. Kemudian sebanyak 0,5 ml homogenate atau standart ditambahkan dengan 2 ml campuran HCL 0,25 N dingin yang mengandung 15 % TCA(tricholoro acetic acid),0,38% TBA (thiobarbiturat acid),dan 0,5 BHT. Campuran larutan dan standart disentrifugasi 3500 rpm selama 10 menit. Absorbansi supernatan diukur pada 532 nm. Sebagai larutan standar digunakan TEP (1,1,3,3-tetraeoksiprona).

Analisis Data

Data yang diperoleh dicatat dan dianalisis secara statistik dengan analisis ragam Anova. Jika perlakuan memberikan pengaruh yang nyata, maka pengujian dilanjutkan dengan analisis beda Duncan. (Steel dan Torrie, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Data hasil uji aktivitas antioksidan isoflavon seperti yang terlihat pada table 4.1 menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi isoflavon *presentase* aktivitas antioksidan juga meningkat.

Tabel .1. Analisis aktivitas antioksidan isoflavon menggunakan metode DPPH .

Konsentrasi isoflavon (mg)	<i>Presentase</i> aktivitas antioksidan
0	0
1,3 mg isoflavon	32,59
2,6 mg isoflavon	52,37
3,9 mg isoflavon	68,21
5,2 mg isoflavon	82,32
6,5 mg isoflavon	92,74

Hasil analisis kadar peroksidasi lipid,yaitu maloldehida pada hati tikus yang diberi isoflavon .
Disajikan pada tabel .1. .

Tabel.2. Kadar malonaldehida (MDA) hati tikus percobaan dengan berbagai perlakuan.

Perlakuan	Kadar MDA (picomol/g)
Kontrol	44,57 ± 3,99 α
Isoflavon 1 mg	44,48 ± 2,90 α
Isoflavon 2 mg	42,81 ± 2,79 α
Isoflavon 4 mg	40,95 ± 2,20 α
Isoflavon 6 mg	40,75 ± 2,66 α

Keterangan ;

Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan hasil uji tidak berbeda nyata ($P > 0,05$).

Analisis dan pengujian statistic dilakukan dengan menggunakan sidik ragam, hasil pengujian statistic menunjukkan bahwa pemberian isoflavon tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) terhadap kadar MDA . Hal ini ditunjukkan dari signikansi 0,00 ($P > 0,05$). Aktivitas antioksidan isoflavon dianalisis menggunakan metode DPPH, yaitu berdasarkan transfer electron dengan mengukur kapasitas antioksidan dalam mereduksi oksidasi (radikal bebas DPPH). Pada reaksi tersebut akan terjadi perubahan warna berhubungan dengan meningkatnya konsentrasi isoflavon. Oleh karena itu semakin pudar warna ungu hasil reaksi menunjukkan semakin besar aktivitas antioksidan isoflavon. Aktivitas antioksidan isoflavon semakin meningkat dengan meningkatnya konsentrasi isoflavon yang digunakan. Aktivitas antioksidan isoflavon dosis 1,3 mg/ml sebesar 32,59 % , 2,6 mg/ml sebesar 52,37% , 3,9 mg/ml sebesar 68,21% , 5,2 mg/ml sebesar 82,32% dan 6,5 mg/ml sebesar 92,74 % . Berdasarkan data pada tabel 4.1 konsentrasi isoflavon yang diperlukan untuk menghambat 50 % radikal bebas atau minimum *inhibition concentration* 50 % (IC 50%) sebesar 2,45 mg/ml. Aktiedangkan menurut Rimbach (2003), sedangkan struktur kimia cincin fenolik dan gugus hidroksil tersebut, isoflavon mempunyai kemampuan untuk berperan sebagai donor ion hydrogen dan memiliki potensi sebagai antioksidan. Pada penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan tikus yaitu kelompok (Kontrol) I tikus yang tidak diberi perlakuan , kelompok II hewan coba diberi isoflavon 1 mg/200g/BB/hari/oral, kelompok III hewan coba diberi isofalvon 2 mg/200g/BB/hari/oral, kelompok IV hewan coba diberi isofalvon 4 mg/200g/BB/hari/oral, dan kelompok V hewan coba diberi isofalvon 6 mg/200g/BB/hari/oral.

Kelima kelompok tikus tersebut ternyata menghasilkan kadar MDA yang bervariasi antar kelompok. Perbandingan dilakukan terhadap 2 kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok II, III, IV dan V. Pengamatan dan perbandingan dilakukan terhadap nilai rerata kadar MDA hati tiap kelompok tikus. Peroksidasi lebih lanjut dan dengan demikian dapat mencegah pembentukan MDA. Terjadinya penurunan kadar MDA pada tikus yang mendapat perlakuan isoflavon menunjukkan bahwa isoflavon dapat mencegah dan melindungi sel sel hati dari kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas sehingga peroksidasi lipid dapat dihambat dan dicegah.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa pemberian isoflavon dapat menurunkan kadar MDA pada tikus normal. Pemberian isoflavon dosis 6 mg/200/BB/hari/oral. Selama 1 bulan memberikan hasil lebih baik dibandingkan kelompok perlakuan lain, sehingga menurunkan kadar MDA pada tikus normal dibandingkan tikus normal yang tanpa pemberian isoflavon.

SARAN

Makanan yang mengandung isoflavon tinggi bisa dipertimbangkan untuk dijadikan sebagai bahan pangan yang berkhasiat menurunkan kadar MDA. Diharapkan dengan pemberian isoflavon dapat mencegah terjadinya kerusakan sel jaringan hati, sehingga sel hati dapat dilindungi dari kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dilakukan dalam rangka penulisan skripsi untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan Universitas Udayana. Penulis juga menyampaikan terimakasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi tingginya kepada : Dr. drh. I Nyoman Suarsana , drh. Sri kayati, Prof. Dr. drh. Iwan Harjono Utama, M.S, drh. Siswanto dan drh. Desak Ny dewi Indira Laksmi, M. Biomed.

DAFTAR PUSTAKA

- Capeyron MFM Julie , C, Eric B, Jean P, MR, Piere B Claude LL, Benard D (2002) A diet cholesterol and deficient in vit e incudes Lipid Peroxidation but does not enhance antioxidant enzyme expression in rat liver *J Nutr Biochem* 13 : 296 -301.
- Koswara,S.(2006). Isoflavon SenyawaMullti-Manfaat dalam kedelai.www.ebookpangan.com diakses pada tanggal 1 april 2011.
- Mimura, A . (2003). Possibility of microbial production of anti –oxidative healy foods. Dalam Abstrak Pertemuan Ilmiah Tahunan Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia Bandung 29 -30 Agustus 2003.
- Sucipto,A.(2008). Kedelai dan Kesehatan .Direktorat Teknologi Bioindustri .www.aboutfile-health.com. Diakses pada tanggal 31 maret 2011.
- Steel ,R.G.D. dan J,H.Torrie.(1993). Prinsip dan Prosedur Statistika ,suatu pendekatanbiometric.Terjemahan: Ir. Bambang Sumiatri .PT. Gramedia Pustaka Utama.Jakarta.