

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK BIJI KLABET (*Trigonella foenum-graecum* L.) : PENGUKURAN KADAR GLUTATION TIKUS DIABETES

Lucie Widowati*, Moh. Sadikin**, B. Wahjoedi*

ABSTRAK

Uji aktivitas antioksidan dari ekstrak biji klabet (Trigonella foenum-graecum L.) dilakukan pada tikus putih hiperglikemia. Keadaan hiperglikemia adalah akibat induksi aloksan tetrahidrat 125 mg/kg bb. Pada keadaan hiperglikemia terjadi penurunan kadar antioksidan glutation (GSH) hampir 50 %. Kadar GSH plasma diukur dengan cara Ellman. Pemberian bahan uji ekstrak klabet dosis 140; 240 dan 560 mg/200g bb. menyebabkan kenaikan kadar GSH plasma setelah 3 hari pemberian bahan uji sebesar 35,77; 66,83; 31,26 % dari keadaan awal hiperglikemi dan kenaikan kadar GSH plasma setelah 7 hari pemberian bahan uji, sebesar 63,21; 90,67; 44,52 % dari keadaan awal hiperglikemi. Aktivitas antioksidan terlihat pada kelompok dosis 140 mg/200g bb. and 280 mg/200g bb ($p > 0.05$).

Kata kunci: Trigonella foenum-graecum L.; klabet; ekstrak etanol; antioksidan.

Pendahuluan

Diabetes melitus menurut WHO Expert Comitte on Diabetes mellitus, 1980, adalah keadaan hiperglikemi kronik yang disebabkan oleh kekurangan insulin yang dihasilkan sel β pankreas sehingga menimbulkan kelainan metabolisme karbohidrat, protein dan lemak, dan cenderung menimbulkan komplikasi. Komplikasi pada diabetes terlihat spesifik, yaitu adanya hiperlipidemia, dan diperkirakan kenaikan kadar lemak pada penderita kira-kira 40 – 90%. Akibatnya pasien diabetes mengalami kenaikan kematian 2-3 kali lipat akibat kelainan jantung dibandingkan pasien non diabetes (Sharma, 1987). Risiko komplikasi vaskular, 204 kali lebih tinggi pada pasien diabetes dibandingkan subyek yang tidak diabetes (Maryono, 1988). Menurut Sharma (1987), pemberian insulin konvensional atau obat diabetes oral dapat menormalkan kadar gula darah, tetapi pemberian tersebut masih belum mampu mencegah komplikasi mikrovaskular dan neurologik.

Diperkirakan superoksida dan peroksida berperan dalam pengembangan komplikasi diabetes dan aterosklerosis. Kadar superoksida dan peroksida akan meningkat sesuai dengan

meningkatnya stres oksidatif. Tikus yang hiperglikemi akibat induksi aloksan, aktivitas peroksidase di hati akan meningkat dan kadar glutation sebagai antioksidan endogen yang merupakan suatu senyawa dengan bentuk glutation tereduksi (GSH), turun.

Glutation merupakan salah satu antioksidan tubuh dan dapat berada dalam bentuk glutation tereduksi (GSH). Suatu senyawa yang mengandung gugus sulfhidril (-SH), pada dasarnya dibagi menjadi 2 kelompok yaitu senyawa gugus -SH protein dan kelompok -SH non protein. GSH, atau γ glutamilsisteinilglisina merupakan tripeptida yang mengandung sisteina dan menjadi sumber sulfhidril, yang berperan dalam detoksifikasi, transport, proses metabolisme dan sebagai antioksidan sel yang bekerja sinergis dengan antioksidan lemak dan memecahkan peroksidasi lemak.

Dalam hal ini GSH mengalami oksidasi, memungkinkan 2 molekul glutation dihubungkan dengan jembatan disulfida melalui reaksi yang dikatalisis oleh enzim glutation peroksidase menjadi glutation teroksidasi (GSSG). GSSG sendiri direduksi kembali oleh enzim glutation reduktase yang menggunakan NADPH yang dihasilkan pada jalur heksose monofosfat.³

* Puslitbang Farmasi dan Obat Tradisional

** Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran UI

Stress Oxidativ

Radikal bebas oksigen dibentuk sebagai suatu proses biokimiawi yang normal dan dihasilkan pada respirasi mitokondria, metabolisme arakidonat dan aktivasi fagosit. Sebagian radikal bebas oksigen memang dibutuhkan oleh tubuh sedangkan sebagian lain harus dikeluarkan atau efeknya diabaikan. Dalam keadaan tertentu radikal bebas oksigen dibentuk dalam jumlah yang sangat banyak sehingga tubuh tidak mampu lagi meniadakan efeknya dan timbul kerusakan jaringan.

Tikus yang diinduksi aloksan atau streptozotisin akan menyebabkan meningkatnya aktivitas peroksidase di hati, menurunkan aktivitas peroksidase dalam jantung, dan meningkatkan aktivitas katalase dalam hati, jantung dan ginjal. Lebih jauh, konsentrasi glutathion total turun pada hati tikus diabet, walaupun aktivitas glutathion reduktase tidak berubah. Kadar total GSH eritrosit penderita dengan diabetes yang tak diobati, lebih rendah dari normal.⁴

Dilaporkan bahwa beberapa obat tradisional Cina dianggap bekerja sebagai *superoksid scavengers* melalui metabolisme GSH dan dapat membuat perlindungan terhadap stres oksidatif.⁵ Pada penderita diabetes diperkirakan terjadi penurunan kadar glutathion dalam sel darah merah, dan dianggap bahwa glutathion mewakili sumber utama sel darah merah yang melawan stres oksidatif⁵

Mengingat banyaknya kelainan metabolik yang memicu dan memperberat perjalanan aterosklerosis, maka penurunan kadar gula darah, lipid darah dan adanya sifat antioksidan merupakan tiga pendekatan dalam pencegahan dan pengobatan penyakit diabetes.²

Klabet atau *Trigonella foenum-graecum* L. telah terbukti dapat menurunkan kadar glukosa plasma pada tikus diabetes. Dalam rangka pengembangan sediaan fitofarmaka antidiabetes, adanya sifat antioksidan merupakan kelebihan nilai tersendiri, karena sifat antioksidan dapat menghambat terjadinya aterosklerosis yang kemungkinan besar akan diderita pula oleh setiap penderita diabetes.

Bahan dan Cara Kerja

Bahan Siplisia

Biji klabet (*Trigonella foenum-graecum* L.) diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat Tawangmangu. Biji diperoleh dari buah yang dijemur sampai kering, ditumbuk untuk

mengeluarkan bijinya, kemudian biji dikeringkan dengan pemanasan sinar matahari. Setelah dibebaskan dari kotoran dan benda asing, biji kemudian digiling halus dengan blender dan disaring dengan ukuran Mesh 40.

Hewan Coba

Tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur Sprague Dawley diperoleh dari Badan Pemeriksaan Obat dan Makanan, umur sekitar 3 bulan dengan berat 200-300 gram.

Bahan Kimia

Air suling, etanol% (Merck), aloksan tetrahidrat (Merck), NaCl 0,9%, dinatrium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4) 0,1 M, kalium hidrogen fosfat (KH_2PO_4) 0,1 M, ditio bisnitro benzoat (DTNB) (Merck), glutathion (Merck), asam trikloroasetat (TCA) 5%.

Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Eksperimental, Puslitbang Farmasi dan Obat Tradisional, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Depkes dan di Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran UI.

Pembuatan Ekstrak Kental Biji Klabet Dengan Etanol 70% Secara Perkolasi

Dilakukan perkolasi menurut cara yang tertera pada Farmakope Indonesia III (1979). Perkolat diuapkan dalam vakum evaporator hingga kental dan masih bisa dituang. Ekstrak kental diuapkan di atas tangas air dengan suhu 50° C hingga sisa etanol menguap dan diperoleh ekstrak kering,

Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap yang terdiri dari 6 perlakuan dan 10 kali ulangan.

Pembagian Kelompok Hewan Coba

Dalam penelitian digunakan 60 ekor tikus putih. Sebelum dilakukan percobaan, semua tikus dipuaskan selama 18 jam, tetapi tetap diberi minum. Sepuluh ekor tikus mendapat suntikan NaCl fisiologis sebanyak 0,5 ml/200g bb, dan digunakan sebagai kelompok kontrol negatif, K(-).

Tikus lain sebanyak 50 ekor disuntik dengan ALX dalam NaCl fisiologis dalam dosis

Cara Kerja
Penyiapan reagen

- a. DTNB : 39,6 mg DTNB dilarutkan dalam 10 ml dapar fosfat 0,1 M pH 7,0
- b. TCA 5% : Larutan standar TCA 25 % diencerkan dengan air suling sampai didapat konsentrasi larutan TCA 5%.

Pembuatan Kurva Kalibrasi untuk GSH

Standar larutan glutation: 2 mg/ml dalam dapar fosfat 0,1 M pH 8,0. Dari larutan standar tersebut ambil 0,0 µl, 5,0 µl, 10,0 µl, 20,0 µl, 25,0 µl, dan 50,0 µl, masing-masing dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian larutan dapar fosfat 0,1 M pH 8,0 ditambahkan ke dalam masing-masing tabung sehingga volumenya menjadi 9 ml. Satu ml larutan TCA 5% ditambahkan ke dalam masing-masing tabung tersebut, dan kocok sampai homogen. Dari masing-masing tabung diambil 4,0 ml dan ditambahkan 0,05 ml reagen DTNB. Sisa larutan dari masing-masing tabung tersebut digunakan sebagai blanko. Selanjutnya diukur serapan absorbansi test dan absorbansi standar terhadap blanko dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 412 nm.

Dari data pengukuran tersebut dibuat kurva kalibrasi dengan menghubungkan nilai serapan sebagai ordinat (y) dan konsentrasi larutan standar sebagai absis (X).

Pengukuran Sampel Plasma

Ke dalam 0,250 ml plasma ditambahkan 8,90 ml dapar fosfat pH 8,0 dan 1,0 ml TCA 5%, kemudian dikocok hingga homogen. Kemudian larutan disentrifugasi pada 3000 rpm 5 menit. Dari larutan tersebut, diambil 4,0 ml

supernatan, tambahkan 0,05 ml DTNB, dan diamkan 1 jam. Sisa larutan supernatan digunakan sebagai blanko. Selanjutnya diukur serapan absorbansi sampel dan terhadap blanko dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 412 nm.

Hasil dan Pembahasan

Pengukuran kadar GSH diawali dengan pembuatan kurva kalibrasi. Dari nilai serapan 6 macam konsentrasi larutan standar ternyata berbanding lurus.

Dari hasil perhitungan diperoleh persamaan :

$$Y = 2,68 \cdot 10^{-4} + 9,938 \cdot 10^{-3} \cdot x$$

$$\text{Dengan } a = 2,68 \cdot 10^{-4};$$

$$b = 9,938 \cdot 10^{-3}$$

$$\text{Koefisien korelasi } (r) = 0,9899$$

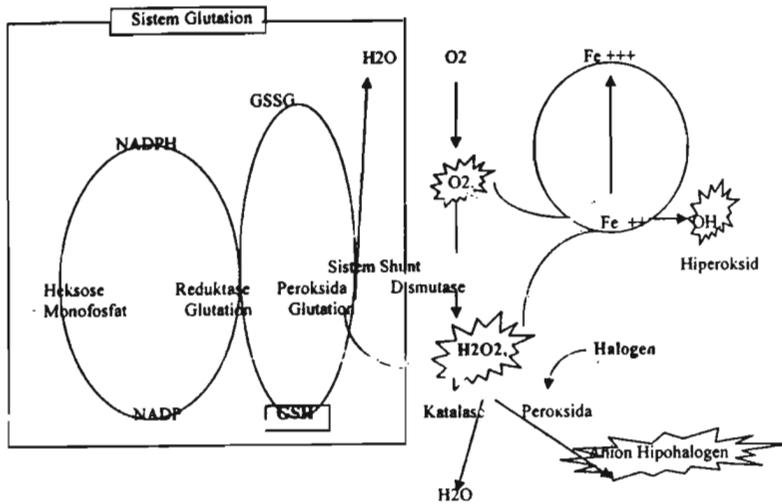
Rata-rata kadar GSH awal tanpa induksi ALX yang dikelompokkan dalam kelompok K(-) adalah 37,69 µM/ml. Setelah induksi ALX rata-rata kadar GSH tikus yang dikelompokkan dalam kelompok K (+) adalah 22,27 µM/ml; kelompok DI 21,94 µM/ml; kelompok DII 19,30 µM/ml dan kelompok DIII 21,33 µM/ml. Lihat tabel 1. Data terdistribusi normal dan homogen (p>0,05).

Kadar GSH kelompok tikus K (-) berbeda nyata dengan kelompok tikus K (+) (p< 0,05). Hal ini sesuai dengan yang ditemukan oleh Zaltberg, bahwa pada pasien diabetes, penurunan glutation dapat mencapai 50% (P<0,01).⁷ ALX digunakan untuk menurunkan kadar glutation dalam darah. Hal ini disebabkan oleh keadaan diabetes yang berakibat pula pada penurunan kadar antioksidan endogen tubuh.

Tabel 1. Rata-rata Kadar Glukosa (mg/dl) dan Kadar GSH (µM/ml) Plasma

Kelompok tikus	Kadar glukosa	Sd	Kadar GSH	Sd
K (-)	88,71	7,81	37,69	5,88
K (+)	202,51	29,93	22,27	2,04
DI	214,145	27,85	21,94	2,63
DII.	255,18	37,72	19,3	1,72
DIII	203,38	18,06	21,33	3,59

Bagan Mekanisme Antioksidan dari GSH Digambarkan sebagai berikut.(15):



Skema diambil dari Mansjoer H., 1991.⁸

Mekanisme kerja sitotoksik dari aloksan karena terbentuknya senyawa reaktif H_2O_2 yang dapat berubah menjadi radikal bebas OH^\bullet dalam sistem aerob bila bereaksi dengan ion Cu^+ dan Fe^{2+} .⁹ Radikal hidroksil (OH^\bullet) menyebabkan fragmentasi DNA nukleus, kemudian terjadi aktivasi poli (ADP-ribosa) sintetase, deplesi nikotinamid adenine dinukleotida (NAD^+) intrasel, dan menimbulkan kematian sel.¹⁰ Penelitian yang pernah dilakukan Yamamoto, menyatakan bahwa aloksan 0,1 mM dapat menurunkan NAD jaringan sebanyak 18%, dibandingkan dengan kelompok kontrol tanpa induksi aloksan, dan dapat menurunkan sintesis proinsulin sampai 9%.¹⁰

Penurunan kadar GSH pada keadaan diabetes berhubungan dengan keadaan stres oksidatif, yaitu keadaan dimana terjadi penurunan kapasitas anti oksidatif yang akan berkembang kearah pembentukan aterosklerosis.⁷ Diabetes mellitus juga merupakan penyakit yang disebabkan oleh kerusakan sel β pankreas karena adanya radikal bebas dalam tubuh. Glukosa dapat mengalami oksidasi dengan adanya ion Fe dan

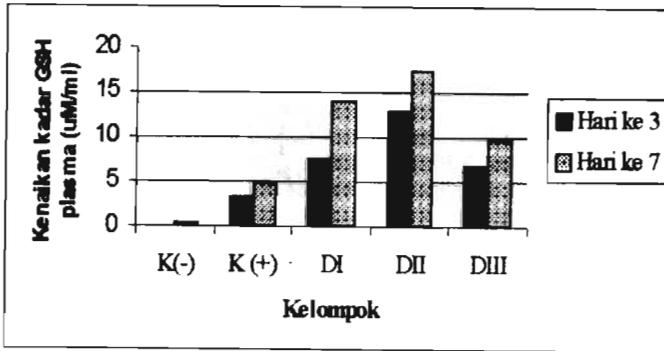
Cu, dan membentuk radikal hidroksil. Radikal hidroksil (OH^\bullet) adalah suatu molekul yang sangat reaktif dalam upaya mendapatkan pasangan elektronnya. Oksidasi glukosa juga dapat menstimulasi peroksidasi lipid secara in vitro, dan hal ini pula yang diklaim sebagai penyebab terjadinya peroksidasi lipid pada plasma penderita diabetes.⁸

Setelah pada masing-masing kelompok diberi perlakuan pemberian ekstrak klabet dengan dosis berbeda, rata-rata kadar GSH plasma setelah 3 hari pemberian menunjukkan peningkatan pada kelompok K (+), DI, DII dan DIII berturut-turut sebesar 3,26; 7,85; 12,90 dan 6,675 $\mu M/ml$. Terdapat perbedaan yang nyata antara kelompok K (+) dengan kelompok bahan uji ($p < 0,05$). Hasil pengukuran kadar GSH plasma rata-rata setelah 7 hari pemberian ekstrak klabet, menunjukkan peningkatan pada kelompok K (+), DI, DII dan DIII berturut-turut sebesar 4,83; 13,87; 17,50 dan 9,49 $\mu M/ml$. Perbedaan nyata terlihat antara kelompok K (+) dengan kelompok bahan uji ($p < 0,05$). (Tabel 2). Diagram perbedaan kenaikan kadar GSH plasma dapat dilihat pada Gambar 1.

Tabel 2. Rata-rata Kadar GSH Plasma Serta Perbedaan Kenaikannya (Δ) $\mu\text{M/ml}$

Kelompok tikus	Awal	3 hari	Sd	Δ	7 hari	Sd	Δ
K (-)	37,69	37,78	4,53	0,09	38,2	5,99	0,51
K (+)	22,27	25,53	2,58	3,26	27,1	1,96	4,83
DI	21,94	29,57	4,23	7,85	35,58	4,08	13,87
DII	19,3	32,2	4,37	12,9	36,79	3,07	17,5
DIII	21,33	27,99	3,29	6,675	30,63	4,42	9,49

Gambar 1. Diagram Perbedaan Kenaikan Kadar GSH Plasma $\mu\text{M/ml}$ setelah 3 hari dan 7 Hari Pemberian Ekstrak Klabet



Tabel 3. Persentase Kenaikan Kadar GSH terhadap Kadar GSH Plasma Awal

Kelompok	Kadar awal $\mu\text{M/ml}$	Kenaikan hari ke 3 $\mu\text{M/ml}$	Persentase (%)	Kenaikan hari ke 7 $\mu\text{M/ml}$	Persentase (%)
DI	21,94	7,85	35,77	13,87	63,21
DII	19,3	12,9	66,83	17,5	90,67
DIII	21,33	6,67	31,26	9,49	44,52

Dari hasil rata-rata penurunan kadar GSH plasma setelah induksi ALX (Kadar GSH awal), dapat dihitung persentase peningkatan kadar GSH plasma terhadap kadar GSH awal. (Tabel 3).

Meningkatnya kadar GSH akibat pemberian biji klabet, diduga karena biji klabet kaya akan asam amino. Dalam 1 sendok teh biji klabet terkandung 0,148 g asam glutamat, 0,014 g sistein dan 0,048 g glisina. Hal ini dapat dihubungkan dengan struktur dari GSH, glutamististeinil glisin yang juga merupakan senyawa yang terbentuk dari 3 komponen diatas. Diduga kandungan asam amino tersebut dapat menstimulasi pembentukan senyawa serupa GSH tubuh.

Dari hasil analisis statistik pemberian ekstrak klabet dosis 140 mg/200 g bb selama 3 hari dan 7 hari, dapat meningkatkan kadar GSH plasma ($p > 0,05$), dengan persentase kenaikan

35,77 % dan 63,88 %. Pemberian ekstrak klabet dosis 280 mg/200g bb. selama 3 dan 7 hari, dapat meningkatkan kadar GSH plasma ($p > 0,05$), dengan persentase kenaikan 66,83% dan 90,67 %. Pemberian dosis lebih besar (560 mg/200g bb) tidak meningkatkan persentase antioksidan ($p < 0,05$). Ekstrak biji klabet memberi perlindungan terhadap oksidasi, melalui mekanisme anti oksidan.

Kesimpulan

Pemberian ekstrak etanol 70% biji klabet dosis 140 dan 280 mg/200g bb selama 3 hari pada tikus dapat meningkatkan kadar GSH plasma ($p > 0,05$). Kesimpulan ini mendukung dugaan bahwa ekstrak etanol yang digunakan mempunyai aktivitas sebagai antioksidan. Aktivitas

antioksidan tertinggi pada dosis 280 mg/200 g bb.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Dr. Moh. Sadikin DSc. dari Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran UI. Ucapan terima kasih juga kami sampaikan kepada rekan di Laboratorium Biokimia FK UI yang telah banyak membantu dalam pengukuran kadar GSH plasma. Tidak lupa kami ucapkan terima kasih kepada rekan-rekan di Laboratorium Farmakologi Eksperimental Puslitbang Farmasi dan Obat Tradisional yang banyak membantu selama pelaksanaan penelitian.

Daftar Pustaka

1. Sharma R.D. Diabetes Mellitus and Fenugreek Seeds, Nutrition News 1997, 8 (3).
2. Maryono D. Aterosklerosis pada diabetes. Majalah Kesehatan Masyarakat Indonesia, Tahun XXVI, 1988. No. 5: 285-289.
3. Sadikin M. 2002. Biokimia enzim. Widya Medika: 87-88.
4. Loven D., Schedl H, Wilson H, et al. 1986. Effect of insulin and oral glutathione on glutathione levels and superoxide dismutase activities in organs of rats with streptozotocin-induced diabetes. Diabetes 35 (6) : 503 – 507.
5. Kunimatsu E., Hanaraka R., and Nakagawa S., 1988. Effect of Tokaku-joki-to on metabolism in non-obesediabetic mice, Departement of Biochemistry, Nihon University School of Medicine. Nihon University Journal Medicine 40: 159-168. Joslin's diabetes mellitus. 13 th ed. Philadelphia, Lea & Febiger: 508-521.
6. Ellman, G E. 1959. Tissue Sufhydryl Groups, Archives of Biochemistry and Biophysics, 82: 70 –77.
7. Zalltberg H., Kanter Y., Aviram M., Levy Y. 1999. Increase plasma oxidizability and decreased erythrocyte and plasma antioxidative capacity in patients with NIDDM. Isr Med Asscoc J, 4 (12): 228-231.
8. Mansjoer, H. Radikal Bebas, Proses Menua dan Gangguan Kardiovaskular, Simposium Radikal Bebas, Gizi dan Penyakit Degeneratif, Jakarta, 1991.
9. Halliwell B, Gutteridge JC. 1996. Free Radical in Biology and Medicine. Avon, Boockcraft (Bath) Ltd: 313 – 314.
10. Takasu N., Komiya I., Asawa T., Magasawa Y., Yamada T. 1991. Streptozocin-and Alloxan – Induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in Pancreatic islets. Diabetes. 40 (8): 1141- 1145.
11. Okamoto H, 1985. Molecular basic experimental diabetes : degeneration, oncogenesis and regeneration on pancreatic b-cells of islets of langerhane Bioassays 2 : 15-21.