

# Soybean Milk Reduces Insulin Resistant in *Rattus norvegicus* of Type 2 Model Diabetes Mellitus

## Susu Kedelai Menurunkan Resistensi Insulin pada *Rattus norvegicus* Model Diabetes Melitus Tipe 2

Wiwik Handayani\*, Ahmad Rudijanto\*\*, Mohammad Rasjad Indra\*\*\*

\*Program Studi Ilmu Keperawatan, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Kenedes Malang

\*\*Laboratorium Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

\*\*\*Laboratorium Ilmu Faal, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

### ABSTRACT

Type 2 Diabetes mellitus (T2DM) is characterized by hyperinsulinemia and hyperglycemia. Soy bean Milk is high nutrient drink, especially its protein contain. Several researches demonstrated that soy bean protein decrease plasma insulin and blood glucose level. The aim of this study is to investigate the effect of soy bean milk in reducing insulin resistance of rat T2DM Model. This experimental study used pre and post test control group design. Male *Rattus norvegicus* wistar strain 8 week old were used as animal model. T2DM rats were constructed by giving high fat diet and continue with injection of low dose of streptozotocin. Rats were divided into 7 groups (1) Negative control group (2) Positive control group (T2DM rat without soy bean milk) (3) T2DM rat that treated with genistein 15 g/kgBW (4) T2DM rat that treated with soy bean milk 10 ml/kgBW/day (5) DMT2 rat that treated with soy bean milk 30 ml/kgBW/day (6) T2DM rat that treated with soy bean milk 60 ml/kgBW/day and (7) T2DM rat that treated with soy bean milk 90 ml/kgBW/day. Soy bean milk was administrated for 15 days. Data were analyze using One way ANOVA, than continue with Tukey test by SPSS method 13 Version. The result showed that there were a significant effect of soy bean milk in decreasing glucose serum level ( $p=0.02$ ) and insulin plasma level ( $p=0.00$ ). A High increasing of glucose serum level and insulin plasma level occur when rat of DMT2 model was given soy bean milk 90 ml/kgBW/d.

**Keywords:** T2DM, Insulin resistant, soybean milk

### PENDAHULUAN

Diabetes tipe 2 merupakan penyakit yang heterogen dengan banyak faktor yang mempengaruhinya. Penyakit ini ditandai dengan adanya gangguan metabolik yaitu gangguan fungsi sel  $\beta 1$  dan resistensi insulin di jaringan perifer seperti jaringan otot dan jaringan lemak, serta resistensi insulin di hati. Hal ini mengakibatkan terjadinya hiperglikemia kronik dan dalam jangka panjang, dapat terjadi komplikasi yang serius (1). Resistensi insulin dianggap sebagai salah satu mekanisme yang mendasari terjadinya diabetes tipe 2. Resistensi insulin dapat disebabkan oleh gangguan pre reseptor, reseptor dan post reseptor (1). Daerah utama terjadinya resistensi insulin adalah pada postreseptor sel target di jaringan otot rangka dan sel hati. Kerusakan postreseptor ini menyebabkan kompensasi peningkatan sekresi insulin oleh sel beta, sehingga terjadi hiperinsulinemi pada keadaan puasa maupun postprandial (1). Penelitian biomolekuler menunjukkan bahwa terjadinya resistensi terhadap insulin berkaitan dengan adanya kondisi hiperinsulinemia. Hiperinsulinemia ditandai dengan adanya penurunan aktivitas enzim *tyrosine kinase* dan peningkatan aktivitas enzim *tyrosine phosphatase*. Kedua enzim ini berfungsi dalam mengatur sinyal insulin dimana enzim *tyrosine kinase* bertanggung jawab pada proses fosforilasi sedangkan enzim

*tyrosine phosphatase* bertanggung jawab pada proses defosforilasi dan inaktivasi reseptor insulin(2)

Pada keadaan resistensi insulin terjadi penurunan aktivasi pada *tyrosine kinase* yang menyebabkan penurunan fosforilasi IRS-1 (*insulin receptor substrate-1*) pada reseptor insulin. Fosforilasi IRS-1 diperlukan pada ekspresi gen, metabolisme lipid dan protein serta aktivitas PI-3K (*phosphatidylinositol-3 kinase*) dan MAPK (*mitogen activator protein kinase*). Hal ini akan menyebabkan terjadinya penurunan kemampuan IRS-1 untuk berikatan dengan PI3 Kinase (Ikatan dengan MYMX motifs pada IRS-1), sehingga menyebabkan penurunan aktivasi dari PI3 kinase dan juga akselerasi terjadinya degradasi protein IRS-1. Adanya penurunan aktivasi PI3-Kinase menyebabkan gangguan pada kaskade *downstream* PI3-Kinase yaitu fosforilasi dan aktivasi dari Akt (protein kinase B) sehingga menyebabkan gangguan pada transport glukosa dan sintesis protein. Penelitian Saad *et al*, (1993) melaporkan bahwa pada tikus model resisten insulin dan DM tipe 2 terjadi penurunan reseptor insulin, fosforilasi IRS-1 dan aktivitas PI3K pada hati dan otot setelah di stimulasi dengan insulin secara *in vivo* (1). Nadler *et al* 2001 juga melaporkan adanya penurunan aktivasi PI3K pada sel adiposit tikus dengan insulin resistant (2). Disamping itu pada kondisi resistensi insulin akan terjadi penurunan kemampuan IRS-1 untuk berikatan dengan *Ash/Grb*, sehingga menyebabkan penurunan aktivasi Kaskade MAPK khususnya p38 MAPK. Adanya penurunan kaskade p38 MAPK menyebabkan gangguan pada translokasi GLUT 4

*Jurnal Kedokteran Brawijaya*, Vol. XXV, No. 2, Agustus 2009; Korespondensi: Wiwik Handayani, Program Studi Ilmu Keperawatan, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Kenedes Malang, Jln Raya Arjosari 125 Malang, Tel. 081333906044

dan *uptake* glukosa pada otot skeletal dan adiposit. Penelitian Tardif *et al*, 2003 melaporkan bahwa pemberian inhibitor aktivitas p38 MAPK dengan *wortmannin* dan PD 169316 menyebabkan penurunan *up take* glukosa pada sel Kardiomiost (3). Penelitian Kumar dan Dey 2004 juga melaporkan bahwa diantara semua MAPKs ternyata p38 MAPK yang mengalami gangguan pada sel dengan resistensi insulin, selain itu penelitian tersebut juga melaporkan bahwa pemberian inhibitor p38 MAPK (SB203580) pada sel otot skeletal yang sensitif terhadap insulin menyebabkan blokade *up take* glukosa (4).

Susu kedelai adalah salah satu produk makanan yang dibuat dari olahan kedelai, yang tersedia dalam bentuk cair maupun bubuk. Susu kedelai mengandung berbagai macam kandungan gizi. Penelitian Leila dan Ahmad 2008 Menunjukkan bahwa kedelai dapat memperbaiki resistensi insulin dan lipid melalui *Peroxisome Proliferator Activator Receptor* (PPAR) (5). Disamping itu Beberapa penelitian pada manusia Bhatena & Velasquez 2002 menunjukkan bahwa polisakarida yang terkandung dalam kedelai mampu menekan kadar glukosa dan trigliserida postpandrial, serta menurunkan rasio insulin-glukosa postpandrial (6). Hal ini membuktikan bahwa kandungan polisakarida pada kedelai mampu mengendalikan kadar gula darah yang berlebih dalam tubuh. Berdasarkan data penelitian diatas maka kiranya perlu dilakukan penelitian untuk membuktikan apakah pemberian susu kedelai mampu menurunkan resistensi insulin melalui efek penurunan kadar glukosa darah dan penghambatan kanal kalsium yang nantinya akan berdampak pada peningkatan jalur aktivitas PI3K dan p38 MAPK terfosforilasi pada tikus model DM tipe 2.

## METODE

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental in vivo rancang acak lengkap, dengan pengambilan data kombinasi *pre post only control group design*. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang mulai bulan Maret-Mei 2009.

### Hewan Coba

Hewan coba pada penelitian ini adalah tikus *Rattus norvegicus* galur *wistar* jantan berusia 8 minggu dengan berat badan rata rata 152,368 gram dengan berat badan tertinggi yaitu 177,84 gram dan berat badan terendah 140,10 gram. Ada 7 kelompok perlakuan dalam penelitian ini yaitu (1) kontrol negatif (2) Kontrol Positif (Tikus DMT2 tanpa susu kedelai) (3) Tikus DMT2 dengan pemberian genistein 15 g/kgBB (4) Tikus DMT2 dengan pemberian susu kedelai 10 ml/kgBB (5) Tikus DMT2 dengan pemberian susu kedelai 30 ml/kgBB (6) Tikus DMT2 dengan pemberian susu kedelai 60 ml/kgBB dan (7) TiMT2 dengan pemberian susu kedelai 90 ml/kgBB. Setiap pengukuran diulang sebanyak 3 kali.

## Protokol Pembuatan Tikus Model DM tipe 2 dengan Resistensi insulin melalui induksi Diet tinggi lemak (HFD) dan injeksi STZ dosis rendah

Pembuatan tikus model diabetes tipe 2 merujuk pada Zhang *et al*, 2008 (7). Digunakan tikus *Rattus norvegicus* umur 8 minggu. Tikus ditempatkan dengan jumlah 5 ekor tiap kandang pada ruangan dengan suhu 22-25°C dan siklus terang gelap 12/12jam. Tikus diberi pakan normal yang terdiri dari (prosentase kcal total) 12% lemak, 60% karbohidrat, dan 28% protein selama 3 hari, kemudian diberi diet tinggi lemak / *high fat diet* (HFD) yang terdiri dari 41% lemak, 41% karbohidrat, dan 18% protein. Lima minggu setelah pemberian diet, tikus dipuasakan semalam, hewan kemudian diinjeksikan dengan *streptozotocin* dosis rendah (30mg/kg berat badan dalam 0.1 *citrate-buffered saline*, pH 4.5) secara intraperitoneal. Kemudian setelah 1 minggu diberikan lagi injeksi *streptozotocin* dosis rendah (30mg/kg berat badan dalam 0.1 *citrate-buffered saline* 4.5). Saat injeksi tikus diposisikan menghadap kearah *frontal* hingga terlihat bagian abdomennya. Pada bagian atas abdomen tikus disemprot dengan ethanol 70 %, kemudian kulit dicubit hingga terasa bagian ototnya, jarum dimasukkan pada bagian abdomen dan dicoba digerakkan, apabila terasa berat maka sudah masuk pada daerah intraperitoneal. Setelah yakin pada daerah intraperitoneal, maka STZ segera dimasukkan secara perlahan. Selanjutnya abdomen tikus disemprot dengan ethanol 70 % kembali. Kemudian ditunggu sampai 1 minggu. Setelah itu diukur *fasting blood glucoza* (FBG) dan *fasting blood insulin* (FINS) untuk mengkonfirmasi adanya keadaan diabetes mellitus tipe 2 dengan resistensi insulin. Hewan coba mendapatkan pakan normal dan susu kedelai setelah injeksi STZ selama 2 minggu.

### Pembuatan High Fat Diet (HFD)

Pembuatan HFD dengan komposisi BR1 =221.75 gram, Tepung terigu =123,25 gram, asam Cholat = 0.098 gram, kolesterol =7,105 gram, *pig oil* = 184,25 ml

### Pembuatan Larutan Streptozotocin (STZ)

*Streptozotocin* (STZ) 100 gram dilarutkan ke dalam 3 ml buffer sitrat pH 4,5, selanjutnya di *vortex* hingga homogen, sehingga dihasilkan larutan STZ stok. 3arutan STZ stok disimpan pada suhu 4°C

### Pengukuran Kadar Glukosa Darah

Tikus diukur kadar glukosa darahnya yang diperoleh dari darah ujung ekor (vena lateralis). Caranya tikus yang diambil darahnya ditempatkan pada tempat yang hanya muat 1 ekor tikus, dengan posisi ekor di luar. Kemudian ekor di basahi dengan air hangat dengan tujuan untuk vasodilatasi pembuluh darah, setelah itu baru diambil darah dengan menggunakan blood lancet. Pengukuran Glukosa darah menggunakan alat *Blood Glucose Test Meter GlucoDr* (All Medicus Co. Ltd. Korea). Alat diset kodenya sesuai dengan kode GlucoDr™ Test Strip yang digunakan, selanjutnya darah dari ekor tikus diteteskan pada strip yang terhubung dengan

*glucometer* kemudian dibiarkan selama 6 detik dan dibaca skala yang terlihat pada layar, dimana satuan skala pengukuran yang terbaca mg/dl. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan 2 kali yaitu sebelum diberikan susu kedelai untuk mengetahui adanya kondisi resistensi insulin dan sesudah diberikan susu kedelai untuk mengetahui adanya perbaikan kondisi resistensi insulin. Sebelum dilakukan pengambilan darah, tikus dipuaskan terlebih dahulu selama 2 jam, karena kadar glukosa darah yang diukur adalah kadar glukosa darah puasa. Kadar Glukosa darah puasa normal pada tikus adalah 100 mg/dl.

### Pengukuran Kadar Insulin

Kadar insulin plasma diukur menggunakan metode ELISA dari *Boehringer-Mannheim* kit. Pengukuran Kadar insulin plasma dilakukan 2 kali yaitu sebelum diberikan susu kedelai untuk mengetahui adanya kondisi resistensi insulin dan sesudah diberikan susu kedelai untuk mengetahui adanya perbaikan kondisi resistensi insulin. Sebelum dilakukan pengambilan darah, tikus dipuaskan terlebih dahulu selama 2 jam, karena kadar insulin plasma yang diukur adalah kadar insulin plasma puasa. Nilai Normal Insulin plasma: 5-10 IU/ml. Untuk pengukuran insulin sebelum diberikan susu kedelai, dilakukan dengan cara mengambil darah dari ekor sebanyak 3 ml sedangkan setelah pemberian susu kedelai darah diambil dari jantung. Darah yang sudah diambil diberi antikoagulan/EDTA lalu diputar menggunakan sentrifugator dengan kecepatan 3000 rpm selama 7 menit. Supernatan diambil dan disimpan pada suhu -20°C sampai akan digunakan. Pengukuran insulin menggunakan rat insulin ELISA kit. Prosedur pengukuran dengan rat insulin ELISA kit yaitu, tabung diisi plasma dari tiap kelompok perlakuan, lalu diberi reagen standar dengan pipet 25 L dan ditambah enzim *conjugated* dengan pipet 100 L. Tabung diinkubasi selama 30 menit dengan suhu 25 °C setelah itu dicuci dengan *washing buffer*. Kemudian tambahkan 100 L solution A (*buffer solution containing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*, kemudian solution B (*tetremethylbenzidine*) lalu inkubasi selama 15 menit. Setelah itu tambahkan 50 L stop solution (2N Hcl) dan baca pada 4450 nm.

### Pengukuran Resistensi Insulin

Resistensi insulin diukur dengan menghitung *insulin sensitivity index* (ISI), Rumus perhitungan<sup>42</sup>

$$ISI = Ln (FBG \times FINS)^{-1}$$

Keterangan

FBG : *Fasting blood glucose*

FINS : *Fasting blood insuline*

Dikatakan mengalami resistensi insulin apabila nilai ISI kurang dari sama dengan 1

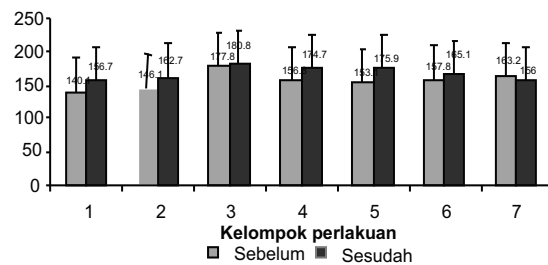
### Analisis Data

Analisis data menggunakan *one-way ANOVA* dilanjutkan Uji *Tukey* untuk melihat perbedaan masing-masing variabel. Hubungan antar variabe ldianalisis dengan *path analysis*. Analisa data dilakukan dengan komputerisasi menggunakan metode SPSS versi 13.

## HASIL

Karakteristik hewan coba penelitian berdasarkan berat badan ditampilkan pada tabel 1 dan gambar 1.

Berat Badan (g)



**Gambar 1. Karakteristik Hewan Coba Penelitian Berdasarkan Berat Badan pada Masing Masing Perlakuan.**

### Keterangan:

(1) Normal (2) Kontrol DMT2 (3) DMT2 Dengan Genistein (4) DMT2 dengan susu kedelai 10 ml/kgBB (5) DMT2 dengan susu kedelai 30 ml/kgBB (6) DMT2 dengan susu kedelai 60 ml/kgBB (7) DMT2 dengan susu kedelai 90 ml/kgBB.

Berdasarkan gambar 1 dapat diketahui bahwa terjadi peningkatan berat badan pada hampir semua kelompok perlakuan, kecuali pada kelompok 7 (pemberian susu kedelai 90ml/kgBB) terjadi penurunan berat badan. Rata rata berat badan tertinggi terjadi pada tikus yang diberikan *genestein*, sedangkan rata rata berat badan terendah terjadi pada tikus yang diberikan susu kedelai 90 ml/kgBB. Berdasarkan uji statistik menggunakan *Oneway ANOVA* ( $\leq 0,05$ ) diketahui ada pengaruh yang signifikan pemberian susu kedelai terhadap peningkatan berat badan ( $p=0.054$ ). Hasil pengujian berganda dengan uji *Tukey* didapatkan bahwa tidak ada perbedaan peningkatan berat badan yang signifikan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok 2 ( $p=0.667$ ), kelompok 3 ( $p=0.103$ ), kelompok 4 ( $p=0,218$ ), kelompok 5 ( $p=190$ ), kelompok 6 ( $p=559$ ).

### Karakteristik Asupan Pakan

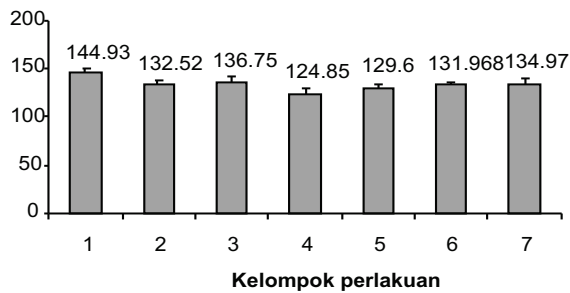
Karakteristik hewan coba pada penelitian berdasarkan Asupan pakan dapat dilihat pada tabel 2 dan gambar 2

Berdasarkan gambar 2 dapat diketahui bahwa rata-rata *intake* pakan tertinggi terjadi pada tikus normal, sedangkan rata rata *intake* pakan terendah terjadi pada tikus yang diberikan susu 10 ml/kgBB/hr.

### Insulin Sensitivity Index (ISI)

Hasil penghitungan rerata ISI pada masing masing perlakuan digambarkan pada tabel 3 dan gambar 3. Berdasarkan gambar 3 dapat diketahui bahwa pada pada kelompok 1 (kontrol negatif), kelompok 3 (*gensitein*) dan kelompok 4,5,6,7 (yang diberi susu kedelai 10,30,60,90 ml/kgBB) terjadi penurunan *Insulin Sensitivity Index* (ISI). Sedangkan pada kelompok 2 (kontrol positif) terjadi peningkatan *Insulin Sensitivity Index* (ISI). Beda rata-rata penurunan ISI tertinggi terjadi pada kelompok 7 (susu kedelai 90 ml/kgBB), sedangkan beda rata-rata penurunan ISI terendah pada kelompok 1 (kontrol negatif).

## Asupan pakan (g)

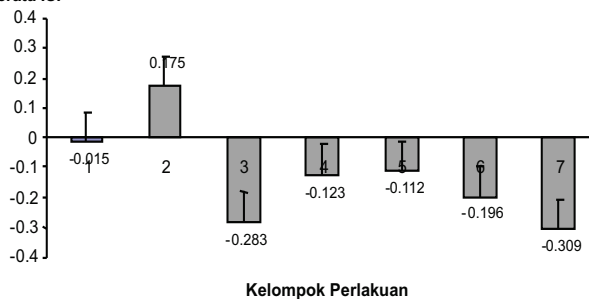


**Gambar 2. Karakteristik Hewan Coba Penelitian Berdasarkan Intake Pakan pada Masing Masing Perlakuan.**

Berdasarkan uji statistik menggunakan *Oneway ANOVA* ( $\leq 0,05$ ) diketahui ada pengaruh yang signifikan pemberian susu kedelai terhadap penurunan Indeks ISI ( $p=0.00$ ).

Hasil pengujian berganda dengan uji *Tukey* didapatkan bahwa bahwa ada perbedaan penurunan ISI yang signifikan antara kelompok 1(kontrol negatif) dengan kelompok 4 (susu kedelai 10 ml/kgBB)( $p=0.00$ ), Kelompok 5 (susu kedelai 30 ml/kgBB)( $p=0.00$ ) dan kelompok 6 (susu kedelai 60 ml/kgBB) ( $p=0.19$ ). Sedangkan Pada kelompok 3 (*genistein*) terjadi perbedaan penurunan ISI yang signifikan dengan kelompok 4 (susu kedelai 10 ml/kgBB) ( $p=0.01$ ) dan kelompok 5 (susu kedelai 30 ml/kgBB)( $p=0.00$ ). Pada kelompok yang diberikan susu kedelai terjadi perbedaan penurunan yang signifikan antara kelompok 4 (susu kedelai 10 ml/kgBB) dengan kelompok 5 (susu kedelai 30 ml/kgBB) ( $p=0.38$ ) dan kelompok 7 (susu kedelai 90 ml/kgBB) ( $p=0.00$ ). Pada kelompok 5 (susu kedelai 30 ml/kgBB) juga terjadi perbedaan penurunan yang signifikan dengan kelompok yang 6 (susu kedelai 60 ml/kgBB) ( $p=0.24$ ) dan kelompok 7 (susu kedelai 90 ml/kgBB)( $p=0.00$ ). Pada kelompok 6 (susu kedelai 60 ml/kgBB) terjadi perbedaan yang signifikan dengan kelompok 7 (susu kedelai 90 ml/kgBB)( $p=0.30$ ). Sedangkan pada kelompok 4 (susu kedelai 10 ml/kgBB) tidak ada perbedaan yang signifikan dengan kelompok 5 (susu kedelai 300 ml/kgBB) ( $p=0,837$ ).

## Rerata ISI



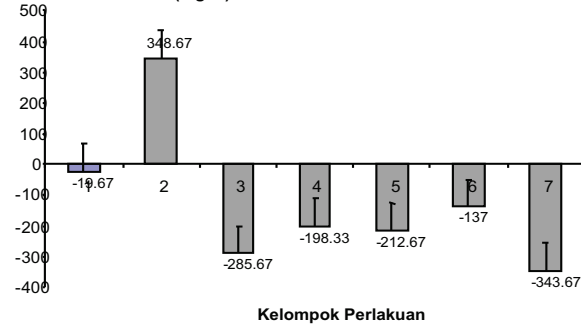
**Gambar 3. Hasil Pengukuran Insulin Sensitivity Index (ISI) pada Masing Masing Perlakuan.**

**Keterangan:** (1) Normal (2) Kontrol DMT2 (3) DMT2 Dengan Genistein (4) DMT2 dengan susu kedelai 10 ml/kgBB (5) DMT2 dengan susu kedelai 30 ml/kgBB (6) DMT2 dengan susu kedelai 60 ml/kgBB (7) DMT2 dengan susu kedelai 90 ml/kgBB .

## Kadar Glukosa Darah Puasa

Hasil pengukuran kadar glukosa darah berdasarkan interaksi antara masing-masing kelompok perlakuan digambarkan pada tabel 4 dan gambar 4.

## Kadar Glukosa serum (mg/dl)



**Gambar 4. Hasil Pengukuran Kadar Glukosa Darah Serum pada Masing Masing Kelompok Perlakuan.**

**Keterangan:** (1) Normal (2) Kontrol DMT2 (3) DMT2 Dengan Genistein (4) DMT2 dengan susu kedelai 10 ml/kgBB (5) DMT2 dengan susu kedelai 30 ml/kgBB (6) DMT2 dengan susu kedelai 60 ml/kgBB (7) DMT2 dengan susu kedelai 90 ml/kgBB .

Berdasarkan Gambar 4 dapat diketahui bahwa pada pada kelompok 1,3,4,5,6 dan 7 terjadi penurunan kadar insulin plasma puasa. Sedangkan pada kelompok 2 (kontrol positif) terjadi peningkatan kadar insulin plasma puasa. Beda rata-rata penurunan kadar insulin plasma tertinggi terjadi pada kelompok 3 (*genistein*), sedangkan beda rata-rata penurunan kadar insulin plasma terendah terjadi pada kelompok 5 (susu kedelai 30 ml/kgBB). Berdasarkan uji statistik menggunakan *Oneway ANOVA* ( $\leq 0,05$ ) diketahui bahwa ada pengaruh yang signifikan pemberian susu kedelai terhadap penurunan kadar insulin plasma tikus ( $p=0.00$ ). Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan kadar insulin pada masing masing kelompok dilakukan uji berganda *Tukey*. Hasil pengujian berganda dengan uji *Tukey* diketahui ada perbedaan penurunan kadar insulin plasma yang signifikan antara kelompok kontrol 1 (kontrol negatif) dengan kelompok 4 (susu kedelai 10 ml/kgBB)( $p=0.00$ ), kelompok 5 (susu kedelai 30 ml/kgBB)( $p=0.00$ ) dan kelompok 6 (susu kedelai 60 ml/kgBB)( $p=0.19$ ). Pada kelompok 1 (Kontrol negatif) tidak terjadi perbedaan yang signifikan dengan kelompok 3 (*genistein*)( $p=0.805$ ). Sedangkan pada kelompok 3 (*genistein*) terjadi perbedaan penurunan yang signifikan dengan kelompok 4 (susu kedelai 10 ml/kgBB)( $p=0.00$ ) dan kelompok 5 (susu kedelai 30 ml/kgBB)( $p=0.00$ ).

Pada kelompok pemberian susu kedelai terjadi perbedaan penurunan yang signifikan antara kelompok 4 (susu kedelai 10 ml/kgBB) dengan kelompok 6 (susu kedelai 60 ml/kgBB)( $p=0.01$ ) dan kelompok 7 (susu kedelai 90 ml/kgBB) ( $p=0.00$ ). Pada kelompok 5 (susu kedelai 30 ml/kgBB) juga terjadi perbedaan penurunan yang signifikan dengan  $p$ -value = 0.002

Penurunan kadar glukosa darah pada penelitian ini diduga karena kandungan polisakarida dalam susu

kedelai. Polisakarida yang terkandung dalam susu kedelai mampu menekan kadar glukosa dan trigliserida postpandrial, serta menurunkan rasio insulin glukosa postpandrial (setelah makan), sehingga mampu mengendalikan kadar gula darah yang berlebih dalam tubuh pada kelompok 6 (susu kedelai 60 ml/kgBB)( $p=0.03$ ) dan kelompok 7 (susu kedelai 90ml/kgBB)( $p=0.00$ ). Tidak ada perbedaan yang signifikan antara kelompok 4 (susu kedelai 10 ml/kgBB) dengan kelompok 5 (susu kedelai 30 ml/kgBB) ( $p=0,837$ ). Begitu juga antara kelompok 6 (susu kedelai 60 ml/kgBB) dengan kelompok 7 (susu kedelai 90 ml/kgBB)( $p=0,183$ ). Penurunan kadar insulin plasma tertinggi pada penelitian ini terjadi pada tikus model DM tipe 2 yang diberikan susu kedelai dosis paling tinggi yaitu 90 ml/kgBB/hari.

## DISKUSI

### Pengaruh Susu Kedelai terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah pada Tikus Model DM Tipe 2

Pada penelitian ini dapat diketahui ada pengaruh yang signifikan pemberian susu kedelai terhadap penurunan kadar glukosa darah tikus pada kelompok perlakuan. Penurunan kadar glukosa darah serum tertinggi pada penelitian ini terjadi pada kelompok 7 yaitu ketika tikus model DM tipe 2 diberikan susu kedelai dosis paling tinggi yaitu 90 ml/kgBB/hari. Hasil analisa *path* Menunjukkan ada Pengaruh langsung susu kedelai terhadap glukosa dengan koefisien *path*  $-0.780$ . Susu kedelai berpengaruh negatif secara nyata pada kadar glukosa.

Diabetes Mellitus muncul akibat dari kurang berfungsinya atau terganggunya fungsi insulin, sehingga kadar gula darah meningkat sampai jauh melebihi batas normal. Hal itu didasarkan pada penelitian Bhathena & Velasquez 2002, yang meneliti efek dari Polisakarida kedelai terhadap fungsi gastrointestinal, keseimbangan nutrisi, ekresi steroid, toleransi glukosa, lipid serum pada manusia. Ditunjukkan bahwa polisakarida kedelai dapat mengurangi glukosa postpandrial dan konsentrasi trigliserida serta mampu menurunkan rasio insulin-glukosa postpandrial akibat kandungan protein arginin dan glisin yang terlibat dalam sekresi insulin dan glukagon dari pankreas (6). Penelitian Lang et al 1999 melaporkan hasil penelitiannya tentang efek protein kedelai terhadap kadar glukosa plasma, insulin dan glukagon pada babi dengan gangguan toleransi glukosa, menunjukkan bahwa protein kedelai memberikan efek terhadap penurunan kadar glukosa plasma akibat kandungan polisakaridanya (8).

Disamping itu penurunan kadar glukosa darah pada pemberian susu kedelai diakibatkan oleh adanya kandungan asam lemak tak jenuh ganda (PUFAs) yang cukup tinggi dibandingkan dengan kacang-kacangan yang lain. Berdasarkan studi penelitian epidemiologi menunjukkan bahwa pemberian diet yang banyak mengandung PUFAs terutama *alfa linolenic acid* (n-3) dapat menurunkan resistensi insulin dan gangguan toleransi glukosa pada DM

tipe 2. *Alfa linolenic acid* (n-3) merupakan ligan untuk PPAR (*peroxisome proliferator activated receptor*), yang meregulasi ekspresi gen yang terlibat dalam homeostasis glukosa. Aktivasi PPAR menyebabkan peningkatan ekspresi gen yang mengkode GLUT 4, sehingga terjadi up regulasi GLUT 4. GLUT 4 diperlukan untuk menstanspor glukosa masuk ke dalam sel otot. Aktivasi PPAR juga menyebabkan peningkatan oksidasi FFA dan up take glukosa di sel otot skeletal. Hal itu Menurut Soeatmadji *et al*, 2005, pada individu dan hewan coba yang diabetes mellitus tipe 2, ligan spesifik PPAR merupakan komponen atidiabetik yang dapat menurunkan hiperglikemia dan hiperinsulinemia terutama di jaringan lemak.

Aktivasi PPAR akan meningkatkan masuknya (*Chanelling*) asam lemak ke dalam jaringan adiposa sehingga dapat menurunkan konsentrasi asam lemak di plasma yang menyebabkan respon TNF- $\alpha$  turun sehingga terjadi peningkatan transmisi sinyal insulin melalui peningkatan aktivitas tirosin kinase pada reseptor insulin dan aktivasi IRS (9). Berkurangnya ketersediaan asam lemak dapat mengurangi resistensi insulin. Disamping PUFAs, protein dan isoflavon genistein juga mampu menimbulkan efek up regulasi PPAR gamma dan alpha yang berperan pada regulasi ekspresi gen yang terlibat dalam homeostasis glukosa. Penelitian Wagner *et al* 2003 tentang efek *soy protein* dan isoflavone pada insulin resisten dan adiponektin pada monyet jantan menunjukkan bahwa isoflavon genestein mampu meningkatkan aktivasi PPAR gamma dan PPAR alpha pada otot skeletal monyet. Pada kelompok kontrol negatif tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok yang diberikan susu kedelai, sehingga bisa disimpulkan bahwa pada kelompok yang diberikan susu kedelai sudah terjadi penurunan resistensi insulin yang ditandai dengan penurunan kadar glukosa darah melalui mekanisme aktivasi PPAR (10).

Pada kelompok perlakuan yang diberikan susu kedelai juga menunjukkan tidak ada perbedaan penurunan kadar glukosa darah yang signifikan, hal itu mungkin disebabkan karena secara kualitatif kandungan protein dan isoflavon dari susu kedelai masing masing kelompok sama, sehingga mekanisme kerjanya juga sama, namun secara kuantitatif mungkin jumlah kandungan PUFAs, polisakarida, asam amino dan isoflavon genisteinnya yang berbeda. Semakin tinggi asupan susu kedelai, semakin tinggi kadar PUFAs, polisakarida, asam amino dan isoflavon genisteinnya. Penurunan kadar glukosa darah serum tertinggi pada penelitian ini terjadi ketika tikus model DM tipe 2 diberikan susu kedelai dosis paling tinggi yaitu 90 ml/kgBB/hari. Hal itu mungkin disebabkan karena pada dosis 90 ml/kgBB kandungan gizi yang diperlukan untuk penurunan kadar glukosa darah serum yaitu protein, PUFAs dan asam amino (glisin dan leusin) lebih tinggi dibandingkan dengan dosis 10, 30 dan 60 ml/kgBB. Penurunan kadar glukosa darah merupakan salah satu respon sistemik tubuh terhadap efek metabolik glukosa yang terjadi di hepar. Semakin tinggi asupan susu kedelai, semakin tinggi aktivasi PPAR.

Dengan makin tingginya aktivasi PPAR menyebabkan makin tingginya oksidasi FFA, sehingga produksi glukosa hepatik semakin turun. Penurunan produksi glukosa hepatik menyebabkan penurunan kadar glukosa darah serum.

Pada kelompok 3 (genistein) tidak ada perbedaan penurunan kadar glukosa darah yang signifikan dengan kelompok yang diberikan susu kedelai. Hal itu disebabkan karena kandungan isoflavon utama dari susu kedelai adalah genistein yang memiliki efek up regulasi PPAR gamma dan alpha yang berperan pada regulasi ekspresi gen yang terlibat dalam homeostasis glukosa.

Resistensi insulin adalah suatu kondisi yang mendasari terjadinya diabetes melitus tipe 2. Adanya resistensi insulin ditandai dengan kondisi hiperglikemia dan hiperinsulinemia. Kondisi hiperglikemia sendiri ditandai dengan adanya peningkatan kadar glukosa darah meskipun dalam kondisi puasa yang seharusnya menurun. Pada penelitian ini terbukti bahwa pemberian susu kedelai mampu menurunkan kadar glukosa darah puasa pada tikus dengan resistensi insulin, sehingga bisa disimpulkan bahwa pemberian susu kedelai mampu memperbaiki resistensi insulin.

#### **Pengaruh Susu Kedelai terhadap Penurunan Kadar Insulin Plasma**

Pada penelitian ini dapat diketahui bahwa ada pengaruh yang signifikan pemberian susu kedelai terhadap penurunan kadar insulin plasma tikus model DM tipe 2 ( $p=0.00$ ). Penurunan kadar insulin plasma tertinggi pada penelitian ini terjadi pada tikus model DM tipe 2 yang diberikan susu kedelai dosis paling tinggi yaitu 90 ml/kgBB/hari. Hasil analisa Path lebih lanjut menunjukkan adanya pengaruh langsung susu kedelai ke insulin dengan koefisien Path sebesar 0.832 ( $p=0.001$ )

Penurunan kadar insulin plasma pada pemberian susu kedelai diakibatkan oleh adanya kandungan asam lemak tak jenuh ganda (PUFAs) yang cukup tinggi dibandingkan dengan kacang-kacangan yang lain. Berdasarkan studi penelitian epidemiologi menunjukkan bahwa pemberian diet yang banyak mengandung PUFAs terutama alfa linolenic acid (n-3) dapat menurunkan resistensi insulin dan gangguan toleransi glukosa pada DM tipe 2. Mekanisme *alfa linolenic acid* (n-3) dalam menurunkan resistensi insulin adalah dengan merubah fluiditas membran dan fungsi reseptor pada membran sel, sehingga mengakibatkan terjadinya ikatan antara reseptor insulin dan insulin yang diperlukan untuk menstimulasi translokasi GLUT 4 dan *uptake* glukosa.

Penurunan kadar insulin plasma pada penelitian ini juga diakibatkan karena kandungan protein dan asam amino esensial kedelai yaitu glisin dan arginin yang mampu menjaga keseimbangan hormon insulin, menurunkan insulin darah yang diikuti penurunan sintesa kolesterol. Menurut Cnop *et al* 2005, Prentki and Nolan 2006, Ying Su 2008, bahwa soy protein yang terkandung dalam susu kedelai memiliki banyak manfaat pada subjek diabetes tipe 2 antara lain dapat menurunkan kadar glukosa darah, menurunkan kadar insulin dan menurunkan

aktivitas FASN (*fatty Acid Sythase*) (11-13). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Ascencio *et al* 2004 menyebutkan bahwa pemberian diet protein dapat menyebabkan rendahnya respon SREBP-1 mRNA dalam hati (14). SREBP-1 berfungsi untuk mengatur metabolisme lemak dalam hati sehingga dengan penurunan respon SREBP-1 dapat mencegah terjadinya penumpukan lemak di hati. Diet protein juga menyebabkan penurunan respon dari enzim lipogenic FAS Penurunan enzim lipogenic pada diet protein dapat menurunkan akumulasi lemak dihati, trigliserida dan kolesterol sehingga dapat menurunkan hiperinsulinemia.

Pada kelompok kontrol negatif menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dengan kelompok yang diberikan susu kedelai terutama kelompok yang diberikan susu kedelai 10,30 dan 60 ml/kgBB, sehingga bisa disimpulkan bahwa pada kelompok yang diberikan susu kedelai sudah terjadi penurunan resistensi insulin yang ditandai dengan penurunan kadar insulin plasma melalui mekanisme penurunan kadar insulin plasma akibat kandungan susu kedelai. Pada kondisi resistensi insulin terjadi hiperinsulinemia, dimana bila hiperinsulinemia diturunkan maka sekresi insulin juga mengalami penurunan mendekati dengan sekresi normal. Pada kelompok yang diberikan susu kedelai juga menunjukkan ada perbedaan penurunan kadar Insulin yang signifikan antara kelompok yang diberikan susu kedelai 10 ml/kgBB dengan kelompok yang diberikan susu kedelai 60 dan 90 ml/kgBB, hal itu mungkin disebabkan karena secara kualitatif kandungan isoflavon genistein dari susu kedelai masing masing kelompok sama, sehingga mekanisme kerjanya juga sama, namun secara kuantitatif mungkin jumlah kandungan kalsium dan isoflavonnya yang berbeda.

Penurunan kadar insulin plasma tertinggi pada penelitian ini terjadi ketika tikus model DM tipe 2 diberikan susu kedelai dosis paling tinggi yaitu 90 ml/kgBB/hari. Hal itu mungkin disebabkan karena pada dosis 90 ml/kgBB kandungan gizi yang diperlukan untuk penurunan kadar insulin plasma yaitu protein, PUFAs, asam amino (glisin dan leusin) dan genistein lebih tinggi dibandingkan dengan dosis 10, 30 dan 60 ml/kgBB. Penurunan kadar insulin plasma merupakan salah satu respon sistemik tubuh terhadap efek metabolik glukosa yang terjadi di hepar. Semakin tinggi asupan susu kedelai, semakin tinggi aktivasi PPAR gamma dan penurunan respon SREBP-1.

Pada kelompok pemberian genistein menunjukkan perbedaan penurunan kadar insulin yang signifikan dengan kelompok yang diberikan susu kedelai 10,30 ml/kgBB. Hal itu kemungkinan disebabkan karena susu kedelai tidak hanya mengandung isoflavon genistein saja, tetapi juga kandungan gizi lainnya seperti protein, PUFAs dan asam amino. Sehingga pada kelompok yang diberikan susu kedelai memiliki efek penurunan kadar insulin plasma yang lebih tinggi dibandingkan dengan pemberian genistein saja. Menurut Sofian 2008 menyatakan bahwa dalam 10 ml susu kedelai diperkirakan mengandung 21g genistein (15).

## KESIMPULAN

Pemberian susu kedelai pada dosis 90 ml/Kg BB mampu menurunkan kadar glukosa darah dan insulin plasma secara signifikan.

Perlu diukur ekspresi PPAR gamma akibat pemberian susu kedelai untuk mengetahui adanya hubungan antara susu kedelai dalam menurunkan kadar glukosa darah dan insulin plasma.

Perlu penelitian lebih lanjut tentang efek susu kedelai terhadap penurunan resistensi insulin terhadap sampel yang lebih nyata pada manusia dengan DM tipe 2, sehingga dapat diketahui secara langsung efek yang ditimbulkan pada pemberian susu kedelai.

## DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Merentek E. *Resistensi insulin pada diabetes Tipe 2*. Cermin Dunia Kedokteran. 2006; 150.
2. Perkeni. *Konsensus pengelolaan dan pencegahan diabetes mellitus tipe 2 di Indonesia 2006*. Cetakan Pertama ed; 2006.
3. Saad MJA, Folli F, Kahn JA, Kahn CR. *Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and Phosphatidylinositol 3 -kinase*. J. Clinical Invest. 1993; 92: 2065-2072.
4. Nadler ST, Stoehr JP, Rabaglia ME, et al. *Normal Akt/PKB with reduced PI3K activation in insulin resistant mice*. Am. J. Physiol Endocrinol Metab. 2001; 281: E1249-E1254.
5. Tardif A, Julien N, Chiasson J-L, et al. *Stimulation of glucose uptake by chronic vanadate pretreatment in cardiomyocytes requires PI-3 Kinase and p38 MAPK activation*. Am. J. Physiol Endocrinol Metab. 2003; 284: E1055-E1064.
6. Kumar S and O'Rahilly S. *Insulin resistance: Insulin action and its disturbances in disease*. John Wiley & Sons Ltd. England; 2004.
7. Azadbakth L, Esmailzadeh A. *Soy and cardiometabolic abnormalities: an Update*. Journal of Research in Medical Science. 2008; 13(2): 88-96.
8. Velasquez MT, Bhathena SJ. *Role of dietary soy protein in obesity*. International Journal of Medical Science. 2007; 4(2): 72-82.
9. Zhang M, Lu X-Y, Li J, et al. *The characterization of high fat Diet and multiple low dose streptozotocin induced Type 2 diabetes mellitus rat model*. Experimental Diabetes Research. 2008; 10.
10. Ali M, Muliarta IK, Muwarni. *Optimalisasi diet tinggi lemak pada tikus model atherogenik*. Jurnal Kedokteran Brawijaya. 2004; 3(2): 15-21.
11. Soeatmadji DW. *The role of PPARs in the homeostasis balance of energy*. Fourth Basic Molecular Biology Course In patophysiology of Obesity Brawijaya University; 2005.
12. Ascensio C, Torres N, Isoard-Acosta F, et al. *Soy protein pfect serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats*. The journal Of Nutrition. 2004; 134: 522-529.
13. Wagner JD, KL Jones, L Zhang. *High isoflavon soy diet increases insulin secretion without decreasing insulin sensitivity in premenopousalnon human primates*. The Journal of Nutrition. 2004; 279(34): 35298-35305.