

KAJIAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN KACANG GUDE (*Cajanus cajan*) DAN PENGARUHNYA TERHADAP AKTIVITAS ENZIM HATI TIKUS YANG DIINDUKSI KARBON TETRAKLORIDA

Roosmarinto, Muji Rahayu

Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Yogyakarta
Email : hayuningpuji@gmail.com

ABSTRACT

*Legumes bean is a plant that is rich in compounds called polyphenols, especially flavonoids. Pigeon pea is a legume species that has purple-black skin, contains various compounds, among others, polyphenols, anthocyanins, and flavonoids. Polyphenol, anthocyanins, and flavonoids compounds have antioxidant activity of endogenous antioxidants which can help to fend off free radicals that occur in the body. The antioxidant activity of pigeon pea (*Cajanus cajan*) in vitro has measured using DPPH method and obtained results of IC50 value of 70.32 mg / ml. Pigeon pea beans contain anthocyanin compounds of 208.307 mg / 100 g. Measurement of antioxidant activity pigeon pea in vivo was performed by animal model white rats Wistar male as many as 25 animals that were divided into 5 groups. Each experimental group consisted of 5 mice, the group N as a normal control group, the group S as a pain control, the group G1, G2 and G4 were given bean powder pigeon pea respectively 100, 200 and 400 mg / bwt with sonde, for 14 days, S group, G1, G2 and G4 induced by carbontetrachloride with intraperitoneal administration. After 24 hours, the bloods of all rats were taken through vena orbitalis and then the activity of AST, ALT and GGT enzymes and levels of malondialdehyde (MDA) were determined. Result of this study showed inhibition of the increase in the activity of AST, ALT and GGT enzymes and MDA levels in rats fed with powdered pigeon pea. From these results it can be concluded that pigeon pea beans have antioxidant activity which is capable of preventing damage to liver cells and lipid peroxidation. Result of this study showed inhibition of the increase in the activity of enzymes AST, ALT and GGT and MDA levels in rats fed powdered pigeon pea. From these results it can be concluded that pigeonpea beans have antioxidant activity which*

Keywords: *Cajanus cajan*, antioxidants, AST, ALT, GGT

ABSTRAK

Kacang polong-polongan (Legume) merupakan tanaman yang kaya kandungan senyawa polifenol terutama flavonoid. Kacang gude adalah satu jenis kacang-kacangan yang mempunyai kulit berwarna ungu kehitaman, mengandung berbagai senyawa antara lain polifenol, antosianin, dan flavonoid. Senyawa polifenol, antosianin, dan flavonoid mempunyai aktivitas antioksidan yang dapat membantu antioksidan endogen untuk menangkis radikal bebas yang terjadi di dalam tubuh. Telah dilakukan pengujian aktivitas antioksidan kacang gude (*Cajanus cajan*) secara in vitro menggunakan metode DPPH dan didapatkan hasil nilai IC50 sebesar 70,32 mg/ml. Kacang gude mengandung senyawa antosianin sebesar 208,307 mg/100 gram. Pengujian aktivitas antioksidan kacang gude secara in vivo dilakukan menggunakan hewan coba tikus putih jantan galur Wistar sebanyak 25 ekor yang dibagi menjadi 5 kelompok. Tiap kelompok percobaan terdiri dari 5 ekor tikus, kelompok N sebagai kelompok control normal, kelompok S sebagai control sakit, kelompok G1, G2 dan G4 diberi bubuk kacang gude berturut-turut 100, 200 dan 400 mg/kg BB secara sonde, selama 14 hari. Kelompok S, G1, G2 dan G4 diinduksi agar terjadi kondisi stress oksidatif dengan pemberian karbontetradoklorida secara intraperitoneal. Setelah 24 jam, semua tikus diambil darahnya melalui vena orbitalis kemudian dibuat serum dan ditetapkan aktivitas enzim AST, ALT dan GGT serta kadar malondialdehid (MDA). Hasil penelitian menunjukkan penghambatan kenaikan aktivitas enzim AST, ALT dan GGT maupun kadar MDA pada tikus yang diberi bubuk kacang gude. Dari hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa kacang gude mempunyai aktivitas antioksidan yang mampu mencegah kerusakan sel hepar dan peroksidasi lipid.

Kata kunci: *Cajanus cajan*, antioksidan, AST, ALT, GGT

PENDAHULUAN

Senyawa radikal bebas seperti spesies oksigen reaktif dan senyawa antaranya seperti radikal superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), radikal hidroksil (OH) dan oksigen singlet (O_1), adalah produk yang dihasilkan oleh metabolisme sel normal.¹ Selain itu radikal bebas juga dapat timbul dari paparan asap rokok, polusi udara, radiasi, iskemia, dan respon inflamasi. Senyawa radikal bebas ini tidak stabil, bersifat reaktif, dan termasuk senyawa prooksidan.²

Stres oksidatif adalah keadaan ketidakseimbangan antara prooksidan dan antioksidan. Hal ini terjadi karena kurangnya antioksidan dan kelebihan produksi radikal bebas. Dalam keadaan stress oksidatif, ROS (*reactive oxygen species*) dapat menginduksi peroksidasi lipid, akibatnya menyebabkan kerusakan membran sel, protein sel dan asam nukleat, sehingga dapat memicu beberapa penyakit seperti kanker, katarak, atherosclerosis, penyakit jantung, dan penurunan imunitas.³ Konsumsi makanan yang mengandung antioksidan meningkatkan status antioksidan di dalam tubuh. Senyawa polifenol dalam makanan menunjukkan efek anti-inflamasi dan antioksidan yang secara spesifik mengatasi stress oksidatif. Senyawa polifenol terutama flavonoid secara alami terdapat dalam tanaman pangan. Flavonoid dalam makanan telah banyak dibuktikan dalam berbagai penelitian memiliki potensi menurunkan stress oksidatif.⁴

Kacang polong-polongan (*Legume*) merupakan tanaman yang kaya kandungan senyawa polifenol terutama flavonoid. Kacang gude adalah satu jenis kacang-kacangan yang mempunyai kulit berwarna ungu kehitaman, mengandung berbagai senyawa antara lain polifenol, antosianin, dan flavonoid³. Hasil penelitian terhadap kandungan antosianin kulit kacang gude yang telah dilakukan oleh Al-Lawi (2011)⁵ menunjukkan bahwa ekstrak pigmen antosianin kulit kacang gude hitam berpotensi dijadikan pewarna alami pada pengolahan pangan sekaligus sebagai antioksidan.

BAHAN DAN METODE

1. Bahan :

- a. Kacang gude diperoleh dari perkebunan di daerah Giri Sekar, Gunung Kidul, Yogyakarta. Penelusuran spesies dilakukan di Fakultas Farmasi, UGM, Yogyakarta.

- b. Tikus putih jantan galur Wistar diperoleh di laboratorium PAU UGM, Yogyakarta.
- c. Pereaksi : Kit AST, ALT, GGT dari Diasys dan pereaksi MDA dari Sigma

2. Metode

- a. Pembuatan serbuk kacang gude
Kacang gude direndam dalam air selama 24 jam, diblender kasar, dipanaskan dengan oven dengan suhu $60^\circ C$ selama 24 jam kemudian dihaluskan dengan blender, diayak sampai didapatkan bubuk halus.
- b. Pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode DPPH
- c. Pengujian aktivitas antioksidan kacang gude secara *in vivo* dilakukan menggunakan hewan coba tikus putih jantan galur Wistar sebanyak 25 ekor yang dibagi menjadi 5 kelompok. Tiap kelompok percobaan terdiri dari 5 ekor tikus, kelompok N sebagai kelompok control normal, kelompok S sebagai control sakit, kelompok G1, G2 dan G4 diberi bubuk kacang gude berturut-turut 100, 200 dan 400 mg/kg BB secara sonde, selama 14 hari. Kelompok S, G1, G2 dan G4 diinduksi agar terjadi kondisi stress oksidatif dengan pemberian karbontetraklorida dengan dosis 0,2 ml/ kg BB secara intraperitoneal. Setelah 24 jam, semua tikus diambil darahnya melalui vera orbitalis, kemudian dibuat serum dan ditetapkan aktivitas enzim AST, ALT dan GGT serta kadar malondialdehid (MDA).
- d. Pengukuran aktivitas enzim AST, ALT dan GGT dilakukan sesuai dengan prosedur kit DiaSys.
- e. Pengukuran kadar malondialdehid (MDA) dilakukan dengan metode TBARS (Thiobarbituric acid reactive substance) :
Ke dalam 3 tabung polipropilen dimasukkan masing-masing 750 μl asam fosfat, ditambahkan 50 μl akuadest untuk tabung blanko, 50 μl TEP untuk tabung standard, dan 50 μl serum pada tabung sampel. Kemudian ditambahkan 250 μl TBA dan 450 μl akuades. Dicampur homogen, tabung ditutup rapat kemudian dididihkan selama 1 jam, didinginkan dalam ice bath.
Setelah dingin, dimasukkan ke dalam Column Sep-Pack C18 yang sebelumnya telah di cuci dengan methanol, kemudian akuades. Dilakukan elusi dengan 4 ml

methanol, ekstrak ditampung. Diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada 532 nm Kadar malondialdehid dihitung dengan rumus berikut:

$$= \frac{A \text{ sampel}}{A \text{ standar}} \times \text{konsentrasi standar nmol/ml}$$

- f. Pembuatan sediaan jaringan hepar diwarnai dengan Hematoksin Eosin (HE)

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Hasil Penelitian

a. Klasifikasi Ilmiah

Determinasi tanaman kacang gude dilakukan di Bagian Biologi Fakultas Farmasi UGM Yogyakarta, didapatkan hasil sebagai berikut:

Klasifikasi ilmiah kacang gude termasuk dalam Suku: Papilionaceae, Genus: *Cajanus* dan Spesies: *Cajanus cajan* (L.) Huth.

b. Kadar antosianin total kacang gude

Kandungan senyawa antioksidan total dalam kacang gude ditetapkan dengan penetapan kadar antosianin total. Rerata hasil penetapan kadar antosianin total bubuk kacang gude adalah: 208,307 mg/100 gram.

c. Aktivitas Antioksidan Kacang Gude secara In Vitro

Aktivitas antioksidan kacang gude secara in vitro yang diukur dengan metode DPPH (2,2 diphenyl, 1-picryl hydrazyl) ditunjukkan pada tabel 1.

Tabel 1. Aktivitas Antioksidan Bubuk Kacang Gude dengan Metode DPPH

Konsentrasi (mg/ml)	% Redaman DPPH		
	1	2	Rerata
5	3.571	3.571	3.571
10	14.285	13.571	13.928
20	28.571	28.214	28.393
40	57.142	57.857	57.500

Dari data tersebut dibuat kurva untuk mendapatkan nilai IC50, dengan cara interpolasi menggunakan persamaan garis lurus $y = 1.5115x - 2.4927$, diperoleh nilai IC50 sebesar 70.08 mg/ml.

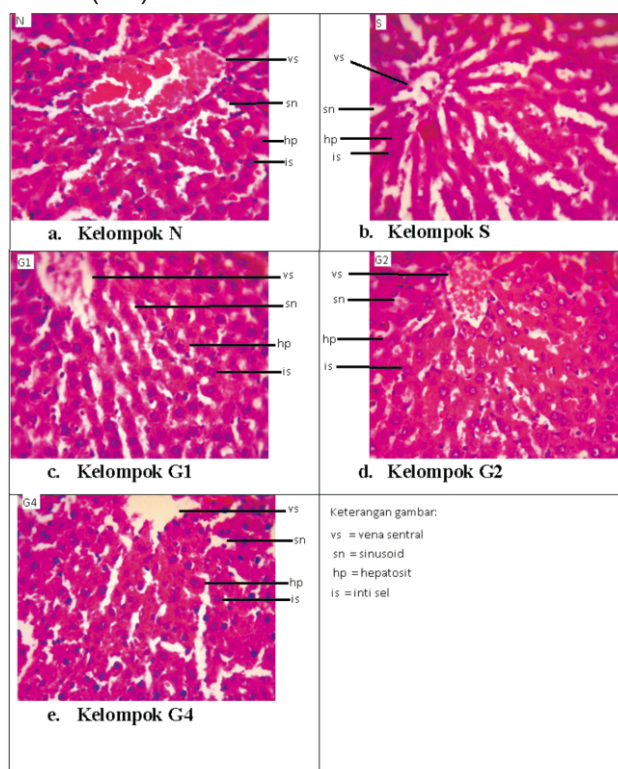
d. Aktivitas Antioksidan Kacang Gude secara In Vivo

Aktivitas antioksidan kacang gude pada tikus percobaan yang diinduksi karbon-tetraklorida ditunjukkan pada tabel 2.

Tabel 2. Aktivitas Enzim Hepar dan Kadar MDA pada Tikus Percobaan

Kelp	GGT (U/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	MDA nmol/ml
N	11.79 ± 0.81a	18.74 ± 0.55d	39.23 ± 2.98i	0.95 ± 0.07n
S	21.32 ± 1.12b	38.26 ± 0.41e	77.19 ± 2.35j	5.37 ± 0.28o
G1	17.90 ± 0.59c	27.58 ± 0.93f	63.89 ± 2.49k	3.69 ± 0.17p
G2	13.07 ± 0.81d	23.11 ± 0.55g	52.43 ± 1.42l	2.42 ± 0.11q
G4	11.08 ± 0.39a	20.39 ± 0.41h	47.68 ± 1.16m	1.64 ± 0.11r

a. Gambaran Histologi Jaringan Hepar dengan Pewarnaan Hematoksin Eosin (HE)



Gambar 1. Gambaran Histologi Jaringan Hepar Tikus percobaan

2. Pembahasan

a. Aktivitas antioksidan secara in vitro

Pengukuran aktivitas antioksidan secara in vitro dengan metode DPPH didasarkan pada radikal scavenger activity yaitu kemampuan senyawa antioksidan untuk meredam radikal bebas 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, dan dinyatakan dengan satuan prosentase (%). Dengan membuat variasi konsentrasi senyawa antioksidan, kemudian dibuat kurva persamaan garis, maka dapat dihitung nilai IC50 (Inhibition concentration) yang didefinisikan sebagai konsentrasi antioksidan yang mampu menunjukkan redaman 50% radikal bebas. Semakin kecil angka IC50 menunjukkan semakin besar aktivitas

antioksidan suatu senyawa. Dalam penelitian ini didapatkan nilai IC50 bubuk kacang gude sebesar 70,08 mg/ml, angka ini jauh lebih besar dibandingkan IC50 vitamin E sebesar ug/ml. Hal ini disebabkan dalam penelitian ini menggunakan bubuk kacang gude, bukan ekstraknya.

Penelitian oleh Pal et al (2011) telah mengisolasi empat komponen utama dari ekstrak ethanolyaitu cajanin stilbeneacid (3-hydroxy-4-prenylmethoxystilbene-2-carboxylicacid), pinostrobin, vitexin dan orientin dan dibuktikan aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH. Selain itu, senyawa lain yang bersifat antioksidan terkandung dalam kacang gude adalah antosianin.⁶ Penelitian oleh Al Lawi (2011)⁵ menunjukkan aktivitas penangkapan radikal DPPH ekstrak pigmen kulit kacang gude hitam memiliki nilai korelasi yang lebih tinggi terhadap kadar total antosianin dibandingkan dengan kadar total fenol. Penelitian oleh Aja et al (2015) menunjukkan kadar anthocyanins pada daun dan kacang gude sebesar 8.35 ± 0.172 dan 4.75 ± 0.174 mg/100g. Dalam penelitian ini ditemukan kadar antosianin pada bubuk kacang gude sebesar 208,307 mg/100 gram (mg%). Antosianin mempunyai struktur kimia dengan ikatan rangkap terkonjugasi yang mampu menjadikan antosianin sebagai antioksidan dengan mekanisme penangkapan radikal bebas.

b. Aktivitas Antioksidan secara In Vivo

Penelitian ini menggunakan hewan percobaan tikus putih jantan galur Wistar yang diinduksi dengan karbontetraklorida (CCl₄). Toksisitas CCl₄ merupakan proses multifaktor yang melibatkan derivat radikal bebas CCl₄, peroksidasi lipid, terjadinya ikatan kovalen dengan makromolekul, hilangnya homeostasis kalsium, hipometilasi asam nukleat dan inflamasi sitokin. Sebagian besar penelitian menunjukkan reaksi dari toksisitas CCl₄ menunjukkan temuan awal seperti pembengkakan hepatosit, disorganisasi retikulum endoplasma, cedera morfologi mitokondria dan peningkatan kadar calcium bebas dalam sitoplasma. Telah terbukti pada sebuah model fibrosis hati bahwa pemberian kronis CCl₄ selama 6 minggu menyebabkan perubahan mitokondria DNA (mtDNA), deplesi glutation tereduksi (GSH) dan penurunan

aktivitas aconitase. Karbontetraklorida diaktifkan oleh sitokrom P450 membentuk radikal bebas trichloromethyl (CCl₃^{*}), yang dapat bereaksi dengan oksigen untuk menghasilkan trichloromethyl peroksi radikal (CCl₃OO^{*}). Kedua radikal tersebut adalah spesies yang sangat reaktif yang dapat membentuk ikatan kovalen dengan makromolekul asam nukleat, protein dan lipid.⁷

Mekanisme kerja CCl₄ yaitu membentuk radikal karbon tetraklorida (molekul dengan electron yang tidak berpasangan sehingga reaktif) di dalam hati, kemudian menyebabkan peroksidasi lipida dalam membran sel. Di sini mitokondria terserang dan melepaskan ribosom dari retikulum endoplasma. Proses fosforilasi pernapasan oksidatif di dalam membran mitokondria terganggu sehingga pemasokan energi yang diperlukan untuk memelihara fungsi dan struktur retikulum endoplasma macet, sintesis protein menurun drastis, sel kehilangan daya untuk mengeluarkan trigliserida dan mengakibatkan degenerasi lemak sel hati, dan dapat mengakibatkan gangguan fungsi hati.

Gangguan fungsi hati dideteksi dengan tes fungsi hati yang terdiri dari pengukuran aktivitas enzim AST (aspartate transaminase), dan ALT (alanine transaminase). Peningkatan AST dan ALT terjadi jika ada kerusakan atau radang pada jaringan hati. Enzim ALT lebih spesifik untuk kerusakan hati. ALT adalah enzim yang dibuat dalam sel hati (hepatosit), jadi lebih spesifik untuk penyakit hati dibandingkan dengan enzim lain. Setiap jenis peradangan hati dapat menyebabkan peningkatan ALT.

Asam lemak tak jenuh (Polyunsaturated Fatty Acid) merupakan bagian penting struktur sel terutama membrane sel, retikulum endoplasma, dan mitokondria. Kerusakan pada struktur tersebut berakibat pada gangguan sampai kerusakan fungsi sel. Peroksidasi lipid adalah perusakan oksidatif terhadap asam lemak tak jenuh oleh radikal bebas. Oleh karena itu pengukuran kerusakan akibat radikal bebas dilakukan dengan mengukur hasil reaksi radikal bebas dengan lipid.⁸

Malondialdehid (MDA) merupakan salah satu senyawa produk dari reaksi

peroksidasi lipid yang digunakan sebagai marker (petanda) terjadinya stress oksidatif. Pada keadaan stress oksidatif yang tinggi, terjadi peningkatan kadar MDA serum secara signifikan. Bila keadaan stress oksidatif teratasi, kadar MDA kembali menurun.

Malondialdehid telah banyak digunakan selama bertahun-tahun sebagai biomarker yang sesuai untuk peroksidasi lipid asam lemak omega-3 dan omega-6. Malondialdehid adalah salah satu penanda yang paling populer dan dapat diandalkan yang menentukan stress oksidatif dalam situasi klinis.

Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa karbontetraklorida menyebabkan kerusakan sel hepar yang ditandai dengan peningkatan aktivitas enzim hepar secara signifikan baik enzim AST, ALT maupun GGT pada kelompok control sakit.

Kerusakan membran sel hepar juga ditunjukkan oleh gambaran sel pada sediaan sel hepar yang diwarnai dengan pewarnaan hematoxil-eosin (HE). Pada sediaan mikroskopis (Gambar 1. b) menunjukkan adanya bentuk sel hepatosit menjadi tidak jelas, banyak inti sel yang rusak, tidak terlihat anak inti sel, dan sinusoid melebar.

Aktivitas enzim AST, ALT dan GGT pada kelompok perlakuan lebih rendah secara signifikan dibandingkan kelompok perlakuan yang diberi bubuk kacang gude baik dengan dosis 100, 200, maupun 400 mg/kg BB (Tabel 1). Data ini didukung oleh gambaran histologi sel hepar kelompok tikus yang diberi bubuk kacang gude (Gambar 1.c, 1.d dan 1.e) yaitu bentuk sel hepar (hepatosit) masih baik, inti sel jelas dan terlihat anak inti sel (nucleolus) serta ruang sinusoid tidak melebar.

Hal ini sejalan dengan penelitian, yang membuktikan aktivitas hepatoprotektif ekstrak methanol *C. cajan* terhadap liver mencit Swiss albino yang diinduksi carbontetrachloride (CCl₄), ditunjukkan dengan penurunan aktivitas enzim alanine amino transferase (ALT), aspartate amino transferase (AST) secara signifikan.

Dalam penelitian ini juga menunjukkan bahwa karbontetraklorida mengakibatkan kenaikan kadar MDA dalam darah. Hal ini menunjukkan telah terjadi peroksidasi

lipid dan mengakibatkan kondisi stress oksidatif. Pemberian bubuk kacang gude yang mengandung antioksidan dapat menghambat terjadinya peroksidasi lipid. Hal ini dibuktikan dengan kadar MDA pada tikus kelompok S lebih tinggi secara signifikan dibandingkan MDA pada tikus yang diberi bubuk kacang gude baik dengan dosis 100, 200, maupun 400 mg/kg BB (Tabel 1).

Mekanisme yang mungkin terjadi adalah senyawa antioksidan dalam bubuk kacang gude menjadi penerima electron tunggal dari senyawa radikal CCl₃* mengakibatkan reaksi berantai tidak berlanjut, sehingga reaksi peroksidasi senyawa lipid dihambat. Oleh karenanya hasil peroksidasi lipid berupa malondialdehid yang terbentuk sedikit. Namun demikian, pada pemberian bubuk kacang gude dengan dosis tertinggi yaitu 400 mg/kg BB, malondialdehid yang terbentuk masih lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol normal. Hal ini memungkinkan penelitian lebih lanjut untuk mengisolasi senyawa-senyawa aktif kacang gude, sehingga dapat diuji aktivitasnya secara terpisah dan didapatkan dosis optimal agar dicapai kondisi kembali normal.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan pada penelitian ini adalah : (1) Kacang gude mempunyai aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 70.08 mg/ml; (2) Kacang gude mempunyai aktivitas menghambat peningkatan enzim AST, ALT dan GGT dalam darah tikus yang diinduksi karbontetraklorida; (3) Kacang gude mempunyai aktivitas menghambat peningkatan kadar MDA dalam darah tikus yang diinduksi karbontetraklorida. Penelitian ini sebaiknya dapat dilanjutkan dengan : (1) Penelusuran komposisi dan struktur senyawa kimia yang mempunyai aktivitas antioksidan yang terkandung dalam kacang gude; dan (2) Penelitian tentang stabilitas senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan yang terkandung dalam kacang gude.

DAFTAR PUSTAKA

1. Manukumar, H.M. & Madhu, C.S., 2013. Comparative Evaluation of Fractional Efficiency on Antioxidant Activity of Red Gram (*Cajanus cajan*) Seed Coat Crude Protein Extracts. *International Journal of Recent Scientific Research*, 4(9), pp.1395–1399.
2. Joye, K., Sarah, L. & George, L., 2004. Antioxidants and Prevention of Chronic Disease. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 44, pp.275–295.
3. Loganayaki, N., Siddhuraju, P. & Manian, S., 2011. A Comparative Study on In Vitro Antioxidant Activity of The Legumes *Acacia Auriculiformis* and *Acacia Ferruginea* With A Conventional Legume *Cajanus Cajan*. *CyTA Journal of Food*, 9 No. 1(December 2014), pp.37–41.
4. Grassi, D., Desideri, G. & Ferri, C., 2010. Flavonoids: Antioxidants Against Atherosclerosis. *Nutrients*, 2, pp.889–902.
5. Al-Lawi, M.U.S, 2011. Skripsi: Kapasitas Antioksidan dan Stabilitas Ekstrak Pigmen Antosianin Kulit Kacang Gude Hitam (*Cajanus Cajan* Linn. Mill sp.) dengan Variasi Pelarut, FP-UNS.
6. Pal, D. et al., 2011. Biological activities and medicinal properties of *Cajanus cajan* (L) Millsp . *J Adv Pharm Technol Res*, 2(4), pp.207–214.
7. Knockaert, L. et al., 2012. Carbon Tetrachloride-Mediated Lipid Peroxidation Induces Early Mitochondrial Alterations in Mouse Liver. *Laboratory Investigation*, 92, pp.396–410.
8. Muriel, P., 2009. Role of free radicals in liver diseases. *Hepatology International*, 3(4), pp.526–536.