

POTENSI EKSTRAK ETANOL BERAS HITAM SEBAGAI PENURUN GULA DARAH PADA TIKUS NEFROPATI DIABETES

Arifah Sri Wahyuni, Rima Munawaroh
Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta
Alamat korespondensi : Jl. A. Yani Tromol Pos I Pabelan Surakarta
Alamat Email : arifah.wahyuni@ums.ac.id

ABSTRACT

Anthocyanins contained in black rice bran (BBH) has been shown to have several properties, such as antioxidant and antihyperglycemic. The purpose of this study is to establish the levels of anthocyanins contained in BBH as well as measuring the ability of a decrease in blood sugar in diabetic rats nephropatic. The study was conducted with pre- and post-test design with control group design Twenty rats were divided into 5 groups. Preparation of alloxan induced diabetic rats by ip dose of 160 mg / kg body weight and blood glucose levels of mice were monitored for 21 days. Rats with diabetic nephropathy is used as a sample. Treatment with ethanol extract of black rice bran (EEBBH) doses of 50, 100, and 200 mg / kg performed for 14 days. Blood sugar levels are set at day-7, -10, and -14. Determination of total anthocyanin content using the pH difference method. The results showed that administration of anthocyanin-containing EEBBH total of 3.28 ± 0.34 mg / mL. Giving EEBBH dose of 200 mg / kg significantly decreased the levels of GD to 130.50 ± 31.86 mg / dL.

Keywords: Black Rice Bran, diabetic nephropathy, antihyperglykemia

BAB 1. PENDAHULUAN

Keadaan hiperglikemik dengan kandungan gula dalam darah diatas 200 mg/dL dapat menimbulkan berbagai komplikasi penyakit. Komplikasi yang terjadi antara lain berupa penyakit vaskuler sistemik (percepatan aterosklerosis), penyakit jantung, penyakit mikrovaskuler pada mata (retinodiabetik), kerusakan syaraf tepi (neuropati diabetik) (Setiawan & Suhartono 2005). Terjadinya komplikasi pada penderita diabetes diduga berhubungan kerusakan jaringan akibat keadaan hiperglikemia. Komplikasi yang sering muncul adalah komplikasi metabolik akut termasuk diabetic ketoacidosis, koma hiperosmolar nonketonik dan hipoglikemia. Dan komplikasi sistemik seperti aterosklerosis, diabetes mikroangiopati, nefropati, retinopati serta infeksi (Kangralkar et al. 2010).

Kondisi hiperglikemia akan memicu pembentukan ROS melalui beberapa mekanisme, sehingga pembentukan ekspresi Tumour necrosis factor- α (TNF- α) meningkat dan memperparah stres oksidatif. Tumour necrosis factor- α (TNF- α) dapat mengakibatkan resistensi insulin melalui penurunan autofosforilasi dari reseptor insulin, perubahan reseptor insulin substrat 1

menjadi inhibitor insulin receptor tyrosine kinase activity, penurunan insulin sensitive glucose transporter (GLUT-4), meningkatkan sirkulasi asam lemak, merubah fungsi sel β , meningkatkan kadar trigliserida dan menurunkan kadar HDL. Stres oksidatif pada penderita diabetes akan meningkatkan pembentukan ROS di dalam mitokondria yang mengakibatkan berbagai kerusakan oksidatif berupa komplikasi diabetes dan akan memperparah kondisi penderita diabetes, untuk itu perlu menormalkan kadar ROS di mitokondria untuk mencegah kerusakan oksidatif (Tiwari & Rao 2002). Untuk meredakan kerusakan oksidatif tersebut diperlukan senyawa yang mampu berperan sebagai antioksidan. Peningkatan suplai antioksidan yang cukup akan membantu mencegah komplikasi klinis DM. Dari beberapa studi menunjukkan bahwa terdapat korelasi antara peningkatan lipid hidroperoksida serum dengan prevalensi retinopati pada penderita diabetes dengan komplikasi (Ueno et al. 2002).

Sejumlah penelitian telah menunjukkan bahwa senyawa yang diperoleh dari bahan alam dapat menjadi modulator penting dalam pra-konvensi dari berbagai penyakit kronis. Bekatul beras hitam merupakan fiber yang kaya akan serat dan

sering dihilangkan pada saat penggilingan beras (Patel 2012). Bekatul ini telah diteliti mengandung senyawa bioaktif diantaranya tokoferol, tocotrienol, oryzanols, vitamin B kompleks, dan senyawa fenolik. Kandungan yang penting adalah anthocyanin (Zhang et al. 2010), yaitu suatu pigmen alami yang termasuk dalam keluarga besar flavonoid yang larut dalam air, yang bertanggung jawab memberikan warna merah, ungu, dan biru pada tanaman (Raghvendra et al. 2011). Cyanidin-3-glucoside (C3G) merupakan kandungan utama dalam beras hitam (Ichikawa et al. 2001), telah terbukti mampu mengurangi peradangan adiposa dan steatosis hati pada tikus diet tinggi lemak serta hiperglikemia pada tikus diabetes (Li et al. 2012). Sehingga antosianin diyakini sebagai antioksidan, yang dapat berlaku untuk efek proteksi terhadap peradangan, aterosklerosis (Abdel-Moemin 2011), diabetes serta karsinoma (Chen et al. 2005). Penelitian ini menguji kemanfaatan secara preklinis bekatul beras hitam dalam mencegah komplikasi hiperglikemi secara in vivo ditinjau dari kemampuan menurunkan kadar gula darah pada tikus dengan kondisi diabete nefropati.

METODE PENELITIAN

1. Pembuatan Ekstrak

Bekatul beras hitam dimaserasi dengan etanol 70 % dengan perbandingan 1:7. Ekstrak direndam selama 5 hari dan dilakukan remaserasi sebanyak 3 kali. Maserat yang terkumpul diuapkan dengan rotary evaporator sampai didapatkan ekstrak kental.

2. Uji efek antihiperglikemik dan pemantauan kadar Gula darah, BUN dan SCr

Sebanyak 20 ekor tikus jantan galur SD berumur 2-3 bulan dengan berat badan 200-300 g diaklimatisasi selama 1 minggu. Tikus di bagi menjadi 5 kelompok perlakuan, kelompok I sebagai kontrol normal tanpa perlakuan, kelompok II-V mendapat aloksan 150 mg/kgBB secara intraperitoneal yang sebelumnya telah diukur kadar GD, creatinine serum, BUN, *baseline*. Glukosa darah (GD) diukur pada hari ke-3 setelah diinduksi aloksan dalam keadaan tidak berpuasa. Tikus yang mempunyai kadar glukosa darah >200 mg/dL digunakan untuk

percobaan. Kelompok III-VI mendapat perlakuan dengan ekstrak bekatul beras hitam dengan dosis berturut-turut 50, 100, 200 mg/Kgbb selama 21 hari mulai hari ke-3 setelah induksi aloksan. Kadar GD dipantau hari ke-7,10 dan14. Pengukuran kadar dilakukan dengan metode spektrofotometer visibel pada λ 500 nm menggunakan reagen kit DSI.

3. Penetapan kadar antosianin total dalam bekatul beras hitam dengan metode perbedaan pH

Bekatul beras hitam yang telah diblender halus dilarutkan dengan dapar KCl pH 1,0 dan dapar $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}_3\text{H}_2\text{O}$ pH 4,5. Larutan pada pH yang berbeda tersebut diukur serapannya pada λ 520 dan 700 nm. Kandungan antosianin total dalam bekatul beras hitam dihitung menggunakan perhitungan dengan koefisien ekstingsi molar (ϵ) sebesar 29.600 (berdasar koefisien ekstingsi molar dari sianidin-3 glukosida) dan bobot molekul sebesar 449,2 sebagai berikut :

$$\text{Total antosianin (mg/L)} : \frac{A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 10^3}{\epsilon \times l}$$

Keterangan :

A : $(A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 1} - (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 4,5}$

E : koefisien ekstingsi molar ($\text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

MW : Bobot molekul

DF : Faktor pengenceran

l : Tebal kuvet (1 cm) (Lee, *et al.*, 2005)

HASIL DAN PEMBAHASAN

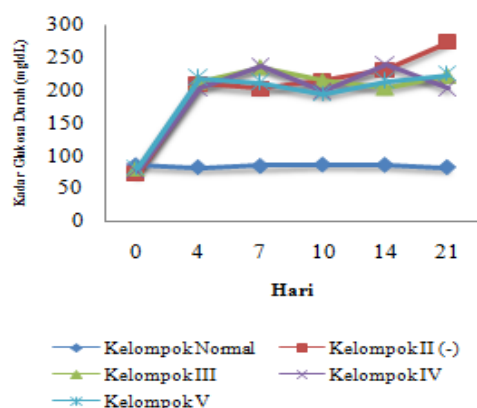
Penetapan kadar antosianin Total

Kemanfaatan beras hitam selain sebagai bahan makanan, juga mempunyai aktivitas farmakologi. Kemampuan ini ditunjang adanya zat warna yang terjadi secara alami yang termasuk kelompok flavonoid yang disebut anthocyanin, yaitu golongan flavonoid. Pigmen ini terletak di lapisan aleuron gabah (Yawadio et al. 2007). Kadar antosianin dapat ditetapkan dengan metode perbedaan pH (Yodmanee et al. 2011). Hasil penetapan kadar antosianin total adalah sebesar $(328,43 \pm 34,76)$ mg/g. Menurut Zhang et al (2006) kandungan senyawa polifenol dan antosianin tertinggi dimiliki oleh beras hitam ((Zhang et al. 2006).

Induksi Aloksan

Aloksan sebagai agen diabetogenik diberikan dengan dosis 160 mg/Kgbb secara

intraperitoneal. Tikus yang telah diberikan induksi aloksan mengalami peningkatan kadar GD. Profil peningkatan GDP > 200 mg/dL tersebut tercapai pada hari ke mulai hari ke 4 dan stabil meningkat sampai dengan hari ke 21 (Tabel 1, Gambar 1). Aloksan sebagai agen diabetogenik mampu menaikkan secara signifikan ($p < 0,05$) kadar glukosa darah pada kelompok II-V dari hari ke-0 (baseline) sampai dengan hari ke-21.



Gambar 1. Profil kadar GD setelah di induksi aloksan 160 mg/Kgbb (n=4)

Kadar GD setelah diinduksi aloksan 160 mg/kgbb mencapai $273,25 \pm 4,11$ mg/dL, sementara nilai normal kadar glukosa darah pada tikus berkisar antara 50-135 mg/dL (Johnson-Delaney 1996). Selain itu induksi aloksan 160 mg/kgBB selama 21 hari dapat menyebabkan kenaikan rata-rata pada kadar *Blood Urea Nitrogen* (BUN) menjadi $32,02 \pm 1,69$ mg/dL. Kadar tersebut melebihi kadar normal BUN pada tikus yaitu 15-21mg/dL (Johnson-Delaney 1996), maka tikus dikategorikan telah mengalami nefropati diabetes.

a. Profil Penurunan Glukosa Darah

Pemberian EEBBH dengan tiga peringkat dosis, yakni berturut-turut 50, 100 dan 200 mg/KgBB menunjukkan penurunan kadar GD yang signifikan ($p < 0,05$). Pemberian ekstrak Etanol Bekatul Beras Hitam (EEBBH) dosis 50, 100 dan 200 mg/Kg BB mulai menurunkan GDP pada hari ke 10. Kadar GD pada hari ke-10 berturut-turut $178,75 \pm 43,67$; $174,25 \pm 44,26$; $156,75 \pm 44,81$ mg/dL. Semakin tinggi dosis, maka penurunan GD semakin besar pula, sehingga penurunan terbesar adalah pada pemberian EEBBH dosis 200 mg/KgBB (Tabel 1).

Tabel 1. Kadar GD (mg/dL) tikus sebelum dan setelah mendapat perlakuan EEBBH berbagai dosis (n=4)

Kelompok	Kadar Glukosa Darah (mg/dL) (X ± SD)			
	Hari ke-0	Hari ke-7	Hari ke-10	Hari ke-14
Kelompok normal	82,75 ± 4,11	83,75 ± 6,18	86,5 ± 4,20	77,75 ± 4,92
Kelompok negatif	273,25 ± 4,11	226,75 ± 29,11	227,75 ± 18,77	236,00 ± 6,63
EEBBH 50mg/kgBB	221,00 ± 32,09	196,75 ± 40,63	178,75 ± 43,67	160,75 ± 33,54
EEBBH 100mg/kgBB	203,75 ± 24,13	178,25 ± 34,04	174,25 ± 44,26	152,50 ± 35,97
EEBBH 200mg/kgBB	224,75 ± 29,68	178,25 ± 34,04	156,75 ± 44,81	130,50 ± 31,86

b. Profil Fungsi Ginjal

Pada keadaan hiperglikemik yang tidak terkontrol, dapat memicu hiperfiltrasi dan hipertrofi ginjal yang mengakibatkan area filtrasi glomerulus berkurang. Perubahan tersebut menyebabkan fungsi ginjal terganggu menjadi glomerulosklerosis dan berakhir ke gagal ginjal (Probosari 2013). Parameter terjadinya kerusakan fungsi ginjal pada nefropati diabetik yaitu peningkatan konsentrasi serum kreatinin (Hendromartono 2009), dan peningkatan *Blood Urea Nitrogen* (BUN) (Wulandari et al. 2012).

Tabel 2. Profil kadar BUN dan SCr sebelum (pretest) dan setelah perlakuan (post-test)

Parameter	Kelompok normal	Kontrol negatif	EEBBH H 50 mg/Kgbb	EEBBH H 100 mg/Kgbb	EEBBH H 200 mg/Kgbb
Kadar BUN (mg/dL)					
Base	13,77	18,56	16,81	16,81	15,99
line	±2,17	±2,48	±1,98	±0,85	±1,54
Hari ke-0	17,39	30,00	33,74	31,29	33,04
Hari ke-10	±4,54	±5,63	±7,62	±6,06	±4,64
Hari ke-14	12,25	40,62	21,83	18,56	15,06
	±2,67	±7,55	±3,33	±2,39	±1,63
Kadar Serum Creatinin (mg/dL)					
Base	0,80±	0,62±	0,65±	0,80±	0,92±
line	0,1	0,22	0,05	0,08	0,09
Hari ke-0	0,72±	0,75±	0,90±	0,85±	0,85±
Hari ke-10	0,09	0,20	0,08	0,1	0,12
Hari ke-14	0,75±	0,90±	0,80±	0,67±	0,70±
	0,19	0,08	0,08	0,09	0,08

Pada pemberian ekstrak etanol bekatul beras hitam dosis 50 dan 100 mg/kgBB bila dibandingkan dengan kontrol negatif menunjukkan penurunan kadar BUN signifikan ($p < 0,05$) pada hari ke-10 setelah pemberian perlakuan. Sedangkan pada dosis 200 mg/kgBB bila dibandingkan dengan kontrol negatif menunjukkan penurunan kadar BUN signifikan ($p < 0,05$) pada hari ke-7 setelah pemberian perlakuan ekstrak. Penurunan kadar BUN yang paling efektif yaitu $15,06 \pm 1,63$ mg/dL ditunjukkan pada dosis 200 mg/kgBB pada hari ke-14 setelah pemberian ekstrak bekatul beras hitam. Sementara Profil Serum kreatinin menunjukkan tidak ada penurunan yang signifikan setelah pemberian EEBBH (Tabel 2).

Hasil Hitopatologi menunjukkan bahwa semua organ ginjal baik kelompok control normal, control negative maupun setelah pemberian EEBBH mengalami peradangan. Namun tidak disebutkan jenis peradangan yang berat atau ringan. Pada kelompok control negative ada satu ekor yang mengalami congesti (Tabel 3).

Tabel 3. Hasil pengamatan histopatologi organ ginjal berbagai kelompok perlakuan (n=3)

Hewan uji No-	Hasil pengamatan histopatologi organ ginjal			
	Kontrol negatif	EEBBH 50 mg/Kgbb	EEBBH 100 mg/Kgbb	EEBBH 200 mg/Kgbb
1	Radang	Normal	Radang	Normal
2	Radang, congesti	Radang	Radang	Radang
3	Radang	Normal	Radang	Radang

Dari data-data yang diperoleh, diketahui bahwa EEBBH mampu menurunkan kadar glukosa darah pada tikus nefropati diabetes. Kemampuan menurunkan GD diduga kandungan antosianin dalam EEBBH. Salah satu senyawa yang tergolong antosianin dalam BBH adalah sianidin-3-glukosida. Senyawa ini dapat memperbaiki keadaan hiperglikemia (Sasaki et al. 2007), dan memiliki potensi untuk memperbaiki resistensi insulin (Inaguma et al. 2011). Kandungan lain dari antosianin yaitu pelagornidin-3-galaktosida dilaporkan memiliki kemampuan untuk meningkatkan sekresi insulin (Jayaprakasam et al. 2005). Selain itu, antosianin juga bertindak sebagai antioksidan (Kaneda et al. 2006) yang

bekerja dengan cara melindungi sel beta pankreas terhadap peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) pada kondisi hiperglikemia dan sekaligus mengurangi stress oksidatif pada penderita diabetes. Sehingga penggunaan antioksidan mampu mencegah adanya komplikasi diabetes melitus.

Selain itu antosianin dalam EEBBH mampu menurunkan kadar ureum yang signifikan sehingga mampu menghambat progresifitas komplikasi diabetes. Antosianin merupakan antioksidan kuat, yang dapat menstabilkan oksidan yang reaktif (Zheng & Wang 2003). Senyawa antioksidan yang dimiliki bekatul beras hitam bekerja dengan cara mengikat radikal bebas didalam tubuh, maka terjadi keseimbangan antara oksidan dan antioksidan. Peran sebagai antiradikal inilah menyebabkan berbagai penyakit dapat dicegah komplikasinya, termasuk diabetes (Sen et al. 2010). Antosianin sebagai antioksidan dapat mencegah pemotongan untai DNA superkoil yang disebabkan oleh *Reactive Oxidative Species* (khususnya radikal peroksida dan radikal hidrosil) (Hu et al. 2003).

KESIMPULAN

Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa kandungan antosianin total yang terkandung dalam EEBBH adalah sebesar $(328,43 \pm 34,76)$ mg/g. Hasil uji aktivitas farmakologi menunjukkan bahwa EEBBH mempunyai aktivitas antihiperglikemik pada tikus diabetes nefropathy sekaligus menurunkan kadar BUN. Sehingga EEBBH berpotensi dikembangkan sebagai obat herbal terstandar.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Moemin, A., 2011. Switching to black rice diets modulates low-density lipoprotein oxidation and lipid measurements in rabbits. *Am J Med Sci*, 341, pp.318–324.
- Chen, P. et al., 2005. Cyanidin 3- glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis in vitro and suppress tumor growth in vivo. *Nutr Cancer*, 53, pp.232–243.

- Hendromartono, 2009. Nefropati Diabetik, dalam Buku Ajar Ilmu Penyakit. In *Jilid III edisi V*. Jakarta: Interna Publishing.
- Hu, C. et al., 2003. Black rice (*Oryza sativa* L. indica) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems. *J Agric Food Chem.*, 51(18), pp.5271–7.
- Ichikawa, H. et al., 2001. Antioxidant activity of anthocyanin extract from purple black rice. *J Med Food*, 4, pp.211–218.
- Inaguma, T., Han, J. & Isoda, H., 2011. Improvement of insulin resistance by Cyanidin 3-glucoside, anthocyanin from black beans through the up-regulation of GLUT4 gene expression. *BMC proceedings*, 5 Suppl 8(Suppl 8), p.P21.
- Jayaprakasam, B. et al., 2005. Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp.28–31.
- Johnson-Delaney, C., 1996. *Exotic Animal Companion Medicine Handbook for Veterinarians, Zoological Education Network*,
- Kaneda, I., Kubo, F. & Sakuraic, H., 2006. Antioxidative Compounds in the Extracts of Black Rice Brans. *Journal of Health Science*, 52(5), pp.495–511.
- Kangralkar, V.A., Patil, S.D. & Bandivadekar, R.M., 2010. Oxidative Stress And Diabetes : A Review. , 1(1), pp.38–45.
- Li, L.-N. et al., 2012. (Z)-4-[(Ethyl-amino)(furan-2-yl)methyl-idene]-3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-5(4H)-one. *Acta crystallographica. Section E, Structure reports online*, 68(Pt 5), p.o1277.
- Patel, S., 2012. Cereal bran: the next super food with significant antioxidant and anticancer potential. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 5(2), pp.91–104.
- Probosari, E., 2013. Faktor Resiko Gagal Ginjal pada Diabetes Melitus. *Journal Of Nutrition And Health*, Vol.1, No.
- Raghvendra et al., 2011. Chemical and potential aspects of anthocyanins-a water-soluble vacuolar flavonoid pigments: a review. *IJPSRR*, 6, pp.28–33.
- Sasaki, R. et al., 2007. Cyanidin 3-Glucoside Ameliorates Hyperglycemia and Insulin Sensitivity due to Downregulation of Retinol Binding Protein 4 Expression In Diabetic Mice. *Journal Article*, 74(11), pp.1619–1627.
- Sen, S. et al., 2010. Free Radicals , Antioxidants , Diseases And Phytomedicines : Current Status And Future Prospect Nitrogen Species. , 3(1), pp.91–100.
- Setiawan, B. & Suhartono, E., 2005. Stres Oksidatif dan Peran Antioksidan pada Diabetes Melitus. *Majalah Kedokteran Indonesia*, 55 No 22.
- Tiwari, A. & Rao, J.M., 2002. Diabetes Mellitus and Multiple Therapeutic Approaches of Phytochemicals. *Present Status and Future Prospect, Current Science*, Vol 83 (1), pp.30–38.
- Ueno, Y. et al., 2002. Dietary Gluhatione Protects Rats from Diabetic Nephropathy and Neuropathy. *J. Nutr*, 132 : 897.
- Wulandari, A.D., S., C. & Ismail, A., 2012. *Hubungan Dislipidemia Dengan Kadar Ureum Dan Kreatinin Darah Pada Penderita Nefropati Diabetik*, Semarang.
- Yawadio, R., Tanimori, S. & Morita, N., 2007. Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rices and their aldose reductase inhibitory activities. *Food Chemistry*, 101 (4), pp.1616–1625.

Yodmanee, S., Karrila, T.. & Pakdeechanuan, P., 2011. Physical , chemical and antioxidant properties of pigmented rice grown in Southern Thailand. *International Food Reserach Journal*, 18(3), pp.901–906.

Zhang, M. et al., 2010. Phenolic profiles and antioxidant activity of black rice bran of different commercially available varieties. *J Agric Food Chem*, 58, pp.7580–7587.

Zhang, M.W. et al., 2006. Separation purification and identification of antioxidant compositions in Black Rice. *Agric.Sci.China*, 5, pp.431–440.

Zheng, W. & Wang, S.Y., 2003. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(2), pp.502–9.