

PERAN TEMPE KEDELAI HITAM DALAM MENINGKATKAN AKTIVITAS ENZIM ANTIOKSIDAN DAN DAYA TAHAN LIMFOSIT TIKUS TERHADAP HIDROGEN PEROKSIDA *IN VIVO*

ROLE OF BLACK SOYBEAN TEMPE TO INCREASE ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYM AND LYMPHOCYTE RESISTANCE TO HYDROGEN PEROXIDE, IN VIVO

Nurrahman^a, Mary Astuti^b, Suparmo^b dan Marsetyawan HNE Soesaty^c

^aDepartement of Food Technology, Semarang Muhammadiyah University, Semarang, Indonesia

^bDepartement of Food Science, Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia

^cFaculty of Medicine, Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia

ABSTRAK

Konsumsi tempe dapat meningkatkan status antioksidan dalam tubuh karena tempe kedelai hitam mengandung senyawa antioksidan. Tujuan dari penelitian ini mengkaji peran tempe kedelai hitam dalam meningkatkan aktivitas enzim antioksidan plasma dan daya tahan limfosit terhadap hidrogen peroksida *in vivo*. Sebanyak 24 ekor tikus dikelompokkan menjadi 4 (empat). Keempat kelompok sebanyak 6 ekor tikus diperlakukan dengan pemberian diit standar, diit ditambah tepung tempe kedelai hitam, diit ekstrak tempe kedelai hitam dan diit kombinasi tepung dan ekstrak tempe. Pada hari ke-36 tikus dimatikan untuk diambil darah dan limpa. Darah dibuat plasma, yang kemudian digunakan untuk analisa aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathion peroksidase dan limpa diekstrak limfositnya untuk analisa daya tahan limfosit terhadap hidrogen peroksida (90 μ M). Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan aktivitas enzim SOD dan daya tahan limfosit terhadap hidrogen peroksida secara signifikan. Kesimpulan dari penelitian ini bahwa konsumsi tempe kedelai hitam dapat meningkatkan status antioksidan tikus.

Kata kunci: Tempe kedelai hitam, aktivitas enzim, antioksidan dan limfosit

Soybean consumption may increase the antioxidant status in the body as black soy tempeh contain antioxidant compounds. The purpose of this study examines the role of black tempeh Soybean increase the activity of antioxidant enzymes in plasma and lymphocyte resistance to hydrogen peroxide, in vivo. A total of 24 rats divided into 4 (four). The fourth group of rats treated for 6 with the provision of standard diet, diet of black soybean tempe, diet of black soybean tempe extract and diet of combination between tempe and extract of tempe. On day-36 rats to be taken off the blood and spleen. Blood plasma is created, which is then used to analyze the activity of SOD enzyme, catalase and glutathione peroxidase, while spleen was extracted its lymphocyte for analysis of lymphocyte resistance to hydrogen peroxide (90 μ M). The results showed an increase in SOD enzyme activity and resistance lymphocyte to hydrogen peroxide lymphocytes significantly. The conclusion of this research that consumption of black soybean tempe can enhance the antioxidant status of rats.

Key words: black soybean tempe, activity of enzym, antioxidant, and lymphocyte

PENDAHULUAN

Tempe merupakan salah satu makanan tradisional Indonesia yang sudah dikenal secara global. Tempe terbuat dari kedelai yang mengalami fermentasi oleh jamur *Rhizopus* spp seperti *R. oligosporus*, *R. stolonifer* dan *R. oryzae* dengan ciri khas produk warna putih, tekstur kompak dan flavor khas campuran aroma jamur dan kedelai. Makanan ini banyak diminati oleh masyarakat sebagai lauk-pauk atau camilan yang rasanya khas dan lezat, dan menjadi sumber protein dalam makanan harian.

Proses fermentasi menyebabkan tempe memiliki beberapa keunggulan dibandingkan kedelai, yang dapat dilihat dari komposisi zat gizi secara umum, daya cerna protein dan kandungan asam amino esensial yang lebih tinggi, zat anti gizi yaitu antitripsin dan asam fitat yang jauh lebih rendah dibandingkan kedelai. Pada tempe, terdapat enzim-enzim pengurai yang dihasilkan oleh jamur tempe, sehingga protein, lemak dan karbohidrat menjadi lebih mudah dicerna (Suparmo dan Markakis, 1987).

Tempe mempunyai kandungan genistein dan daidzein lebih tinggi dibanding produk kedelai yang lain, merupakan isoflavon yang mempunyai sifat antioksidan (Haron *et al.*, 2009). Isoflavon yang lain adalah glycitein dan faktor II, isoflavon faktor II hanya ada di tempe. Isoflavon dapat berfungsi sebagai anti tumor atau anti kanker, hal ini berkaitan dengan sifat antioksidan yang mampu melindungi DNA dari serangan radikal bebas. Daidzein dan genistein merupakan *phytoestrogen* yang mempunyai sifat esterogenik, antiesterogenik, antikarsinogenik, antiviral, antifungal dan antioksidan (Mazur, 1998).

Krinsky (1992) menyatakan bahwa sel imun sangat sensitif terhadap oksidasi oleh radikal bebas karena kandungan asam lemak tak jenuh (ALTJ) yang tinggi pada lipid membran sel. Radikal bebas bertindak sebagai prooksidan melalui transfer elektron tidak berpasangan pada orbital luarnya sehingga dapat melakukan oksidasi terhadap ALTJ, protein dan DNA. Menurut Meydani (1995), sel imun sangat sensitif terhadap keseimbangan oksidasi dan antioksidan. Dalam keadaan normal limfosit, makrofag dan neutrofil memproduksi ROS untuk membunuh antigen melalui mekanisme oksidasi, namun kelebihan ROS dapat menyebabkan stres oksidatif (Chew dan Park, 2004). Stres oksidatif adalah keadaan ketidakseimbangan antara prooksidan dan antioksidan. Hal ini terjadi karena kurangnya antioksidan dan kelebihan produksi radikal bebas. Dalam keadaan ROS yang tidak seimbang dapat bereaksi dengan membran sel, protein sel dan asam nukleat, sehingga dapat mengganggu kesehatan (Brambilla *et al.*, 2008).

Konsumsi makanan yang mengandung antioksidan meningkatkan status antioksidan di dalam tubuh. Tempe mengandung komponen antioksidan seperti isoflavon, vitamin E dan

β -karoten (Astuti, 1996). Senyawa antioksidan (isoflavon) pada tempe mungkin juga berkontribusi pada ekspresi gen (Rimbach *et al.*, 2008). Aktivitas enzim antioksidan seperti superoksida dismutase, katalase dan glutathion peroksidase secara signifikan meningkat oleh genistein (Rimbach *et al.*, 2008). Sierens *et al.* (2001) menyatakan hipotesa bahwa fitoestrogen dalam keadaan tertentu berfungsi sebagai antioksidan dan melindungi DNA dari kerusakan oksidatif. Mereka mendapatkan, limfosit manusia yang diinkubasi dengan genistein secara *in vitro* tahan terhadap kerusakan yang disebabkan oleh H₂O₂.

Tujuan dari penelitian ini mengkaji peran tempe kedelai hitam dalam meningkatkan aktivitas enzim antioksidan plasma dan daya tahan limfosit terhadap hidrogen peroksida *in vivo*.

METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tempe kedelai hitam varietas Mallika, inokulum tempe, pakan tikus dengan komposisi berdasarkan AIN 93, tikus (Wistar, sebanyak 24 ekor, jantan dan berumur 6-8 minggu), berbagai bahan kimia untuk kultur sel seperti *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640, Sigma, USA), hidrogen peroksida, *reagent kit* aktivitas enzim superoksida dismutase (BioVision, USA), *reagent kit* aktivitas enzim katalase (BioVision, USA) dan *reagent kit* aktivitas enzim glutathion peroksidase (Biovision, USA).

Prosedur Kerja

Pada penelitian ini dilakukan pembuatan inokulum tempe, pembuatan tempe, ekstraksi antioksidan dari tempe, analisa aktivitas antioksidan tepung tempe dan ekstrak antioksidannya, analisa kandungan genistein dan daidzen tepung tempe dan ekstrak antioksidan, pembuatan pakan tikus, pemeliharaan tikus, limfosit dari plak Peyer, analisa aktivitas enzim antioksidan dan pengukuran proliferasi limfosit dari limpa secara *in vivo*.

Pembuatan Inokulum (Pawiroharsono, 1996)

Inokulum tempe dalam bentuk tepung dibuat dengan bahan baku beras dan mikroorganisme yang digunakan adalah *Rhizopus stolonifer*. Beras dimasukan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan air destilata dengan rasio 1:1, lalu disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian diinokulasikan 1 ml cairan jamur dari isolat murni yang telah diketahui jenis mikroorganismenya (dari isolat murni yang diencerkan dengan larutan fisiologis sampai 10⁻⁶), lalu dimasukan dalam wadah dan diperam selama 3 hari pada suhu 25-27 °C. Nasi yang penuh jamur dan sporanya berwarna abu-abu sampai hitam dikeringkan dengan oven 40°C. Setelah itu digiling atau ditumbuk sehingga menjadi tepung ragi tempe.

Tepung ragi tersebut dapat digunakan untuk membuat tempe. Sebelum digunakan tepung ragi yang telah dihasilkan disimpan dalam kemasan plastik.

Pembuatan Tempe

Kedelai kering dibersihkan untuk membuang benda-benda asing yang bercampur dengan biji kedelai. Kedelai dicuci dengan air hingga bersih. Kemudian kedelai direbus dengan air sampai mendidih selama 30 menit. Kedelai kemudian dikuliti, setelah itu direndam selama 36 jam. Lalu ditiriskan hingga tuntas, kemudian dikukus selama 1 jam. Kedelai yang telah matang diinokulasi dengan ragi tempe sebanyak 2 gram per kg kedelai (tiga jenis inokulum). Pemeraman (inkubasi) pada suhu sekitar 25-27°C selama 36 jam. Tempe yang telah diperoleh dikeringkan pada suhu 40°C selama 24 jam, kemudian dihancurkan sehingga diperoleh tepung tempe (60 mesh).

Ekstraksi Antioksidan Tempe (Xu dan Chang, 2007)

Tempe yang akan diekstrak antioksidannya dikeringkan lebih dulu pada temperatur 40 – 45°C selama 24 jam. Tempe yang sudah kering dihancurkan sampai menjadi tepung (60 mesh). Tepung tempe direndam dalam etanol 70 % (1:2) selama 24 jam, kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh ditampung, sedangkan ampas ditambah lagi dengan etanol 70 % lalu disaring. Filtrat hasil penyaringan kedua dicampur dengan penyaringan pertama. Filtrat yang diperoleh diuapkan sampai mendapatkan cairan kental.

Pengukuran Aktivitas Antioksidan dengan metode DPPH (Xu dan Chang, 2007)

Untuk mengukur aktivitas antioksidan tempe digunakan metode DPPH dari Xu dan Chang (2007). Tempe yang akan diukur aktivitas antioksidan terlebih dahulu dikeringkan dan diekstrak komponen yang bersifat antioksidan dengan prosedur sebagai berikut:

Tempe yang akan diekstrak antioksidannya dipotong tipis dan dikeringkan dengan alat pengering pada suhu 35-40°C sampai mengering. Tempe yang telah kering ditumbuk hingga halus (60 mesh). Dimasukan 0,5 gram bubuk tempe ke dalam tabung sentrifus yang berisi pelarut etanol/air (70:30, v/v). Campuran tersebut dikocok pada 150 rpm selama 3 jam, kemudian didiamkan selama 12 jam dalam keadaan gelap. Setelah itu disentrifus 3000 rpm selama 10 menit, supernatan yang diperoleh dipindahkan ke dalam tabung baru. Residu diekstrak lagi dengan menambahkan 5 ml pelarut, kedua ekstrak dicampur dan disimpan dalam keadaan gelap pada suhu 4°C.

Ekstrak antioksidan dari bubuk tempe sebanyak 0,2 ml dimasukan ke dalam tabung dan ditambahkan 3,8 ml larutan DPPH. Campuran dikocok selama 1 menit dengan vortex, kemudian didiamkan pada suhu kamar dan gelap selama 30 menit. Setelah itu diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm. Sebagai kontrol

digunakan etanol 70% dan diperlakukan seperti sampel. *Scavenging effect* DPPH dihitung dengan perhitungan rumus :

Scavenging effect (%) :

$$= \left(1 - \frac{\text{absorbansi sampel pada 517 nm}}{\text{absorbansi blanko pada 517 nm}} \right) \times 100 \%$$

Analisa Profil Isoflavon (Penalvo *et al.*, 2004 dan Haron *et al.*, 2009)

Sampel sebanyak 100 gram dihancurkan, kemudian dikeringkan pada suhu 40°C dan dihancurkan lagi. Bubuk sampel 1 – 2 gram diekstrak dengan 5 ml 1 M HCl di dalam 80% etanol dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 80°C. Selanjutnya di shaker selama 2 menit dan disentrifus 2140 x g selama 2 menit. Supernatan disaring, sedangkan ampas ditambah 2,5 ml 80% etanol kemudian dishaker dan disentrifus kembali. Disaring dan supernatan yang diperoleh digabung dengan supernatan pertama.

Kondisi HPLC: HPLC Merk Simadzu, isokratik, volume sampel 20 µl, kolom: C 18, eluen: methanol dan asetonitril (97:3), detektor: SPD 10A, laju aliran: 1 ml/min, temperatur: 25 - 27°C, panjang gelombang 260 nm dan pompa LC10AD.

Pemeliharaan Tikus

Sebanyak 24 ekor tikus dikelompokkan menjadi 4 (empat), masing-masing kelompok sebanyak 6 ekor tikus. Tikus ditempatkan di dalam kandang individu dan suhu kamar (25 – 27°C). Selama 35 hari dipelihara masing-masing kelompok diperlakukan dengan pemberian diit standar, diit ditambah tepung tempe kedelai hitam, diit ekstrak tempe kedelai hitam

Tabel 5. Komposisi diit tikus (g/kg)

| No | Bahan | Diit standar | Diit tempe | Diit ekstrak tempe | Diit kombinasi tempe dan ekstrak tempe |
|----|--------------------|--------------|------------|--------------------|--|
| 1 | Kasein | 140 | - | 140 | 70 |
| 2 | Pati jagung | 620,7 | 561,66 | 620,7 | 591,18 |
| 3 | Tepung tempe | - | 278,5 | - | 139,25 |
| 4 | Ekstrak tempe | - | - | 28 | 14 |
| 5 | Minyak kedelai | 42,29 | - | 42,29 | 21,145 |
| 6 | Sukrosa | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 7 | CMC | 50 | 35,4 | 50 | 42,7 |
| 8 | Vitamin mix AIN 93 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 9 | Mineral mix AIN 93 | 35 | 35 | 35 | 35 |
| 10 | L-cystin | 1,8 | 1,8 | 1,8 | 1,8 |
| 11 | Kholin bitatrat | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |

Nurrahman, *at al.* (2011)

dan diit kombinasi tepung dan ekstrak tempe. Adapun komposisi diit sesuai dengan standar AIN93 (Tabel 1). Pada hari ke-36 tikus dimatikan untuk diambil darah dan limpa. Darah dibuat plasma, yang kemudian digunakan untuk analisa aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutation peroksidase. Limpa diekstrak limfositnya untuk analisa daya tahan limfosit terhadap hidrogen peroksida (90 µM).

Pengukuran Proliferasi Limfosit (Sasmito *et al.*, 2006)

Disiapkan terlebih dahulu suspensi limfosit dari limpa (RPMI 1640). Suspensi ditepatkan dengan media sehingga konsentrasinya $1,5 \times 10^6$ sel/ml, kemudian dimasukan ke dalam piringan dengan 96 sumur sebanyak 200 µl, setelah itu ditambahkan 90 µM H₂O₂. Sebagai kontrol pada kultur hanya ditambahkan media pertumbuhan. Lalu dikultur di dalam inkubator dengan kelembaban atmosfer 5% CO₂-95% udara dan suhu 37°C. Setelah inkubasi selama 76 jam, masing-masing sumuran ditambahkan larutan 20 µl MTT 5 mg/ml. Kemudian diinkubasi lagi 4 jam. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Reaksi dengan MTT dihentikan dengan menambah reagen stopper yaitu larutan SDS 10% dalam asam klorida 0,01 N sebanyak 50 µl pada tiap sumuran, setelah didiamkan semalam selanjutnya diukur absorbansi dengan mikroplat reader dengan panjang gelombang 550 nm.

Analisa Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase (SOD)

Prosedur pengukuran aktivitas enzim SOD didasarkan pada manual yang disediakan oleh *reagent kit* aktivitas enzim superoksida dismutase (BioVision, USA). Plasma diencerkan sebanyak 3-10 X, analisa dirancang seperti tabel berikut:

| | Sampel | Blanko 1 | Blanko 2 | Blanko 3 |
|-----------------------|--------|----------|----------|----------|
| Larutan sampel (µl) | 20 | - | 20 | - |
| H ₂ O (µl) | - | 20 | - | 20 |
| Larutan WST(µl) | 200 | 200 | 200 | 200 |
| Larutan enzim (µl) | 20 | 20 | - | - |
| Larutan buffer (µl) | - | - | 20 | 20 |

Campuran di atas diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit, kemudian dibaca pada panjang gelombang 450 nm menggunakan *microplate reader*. Aktivitas SOD dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas SOD (laju penghambatan\%)} = \frac{(A_{\text{blanko1}} - A_{\text{blanko2}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blanko2}})}{(A_{\text{blanko1}} - A_{\text{blanko2}})} \times 100$$

Analisa Aktivitas Katalase

Prosedur pengukuran aktivitas enzim katalase didasarkan pada manual yang disediakan oleh *reagent kit* aktivitas enzim katalase (BioVision, USA). Sebanyak 1 ml plasma dilarutkan ke dalam larutan buffer dingin sebanyak 0,4 – 1,0 ml. Larutan tersebut ditambahkan ke dalam sumuran sebanyak 2 – 78 μ l, juga dilakukan terhadap larutan kontrol positif sebanyak 1 – 10 μ l, kemudian ditepatkan volumenya mencapai 78 μ l dengan larutan buffer. Disiapkan juga sampel kontrol dengan jumlah yang sama dengan sampel pada sumur terpisah, volume ditepatkan sampai 78 μ l dengan larutan buffer. Ditambahkan 10 μ l larutan penghenti ke dalam sampel kontrol, dicampur dan diinkubasi pada 25°C selama 5 menit. Ditambahkan 12 μ l 1 mM hidrogen peroksida ke dalam setiap sumuran yang berisi sampel dan sampel kontrol, diinkubasi pada 25°C selama 30 menit, kemudian ditambahkan larutan penghenti sebanyak 10 μ l. Setelah itu ditambahkan 50 μ l larutan pengembang (campuran dari 46 μ l buffer, 2 μ l oxidred dan larutan 2 μ l HRP) pada setiap sampel, sampel kontrol dan standar. Campuran dalam sumuran diinkubasi pada 25°C selama 10 menit, kemudian dibaca pada 570 nm dengan *microplate reader*. Untuk menghitung aktivitas enzim katalase menggunakan kurva standar.

Analisa Aktivitas Glutation Peroksidase

Prosedur pengukuran aktivitas enzim katalase didasarkan pada manual yang disediakan oleh *reagent kit* aktivitas enzim katalase (BioVision, USA). Sebanyak 1 ml plasma dilarutkan ke dalam larutan buffer dingin sebanyak 0,4 – 1,0 ml. Larutan tersebut ditambahkan ke dalam sumuran sebanyak 2 – 100 μ l, lalu ditepatkan sampai volume 100 μ l dengan larutan buffer. Ditambahkan pada sampel sebanyak 90 μ l campuran pereaksi (campuran berisi 82 μ l buffer, 4 μ l 40 mM NADPH, 2 μ l larutan GR, dan 2 μ l larutan GSH). Campuran sumuran diinkubasi selama 15 menit, kemudian ditambahkan 10 μ l larutan cumene hidroperoksida untuk memulai reaksi GPx. Dicampur dengan baik, lalu diukur OD pada 340 nm (T1) untuk membaca A1 dan dibaca lagi pada 340 nm (T2) setelah diinkubasi pada 25°C selama 5 menit dalam ruang gelap untuk membaca A2. Untuk menghitung aktivitas enzim glutathione peroxidase menggunakan kurva standar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tempe yang dihasilkan dengan bahan baku kedelai hitam varietas Mallika, inokulum dari jamur *Rhizopus stolonifer* DUCC204 dan lama inkubasi 36 jam diperoleh aktivitas antioksidan 27,61 % RSA dan ekstrak etanol sebanyak 10,15 gram per 100 gram tepung

tempe. Kandungan genestin dan daidzein tempe kedelai hitam adalah 0,73 dan 1,82 mg/g. Pada ekstrak tempe memiliki aktivitas antioksidan 33,64% RSA dan mengandung genistein 0,90 mg/g dan daidzein 2,21 mg/g.

Daya Tahan Limfosit terhadap Hidrogen Peroksida (H₂O₂)

Hidrogen peroksida merupakan senyawa kimia oksidator kuat yang bersifat toksik. Menurut Yen *et al.* (2004) keberadaan hidrogen peroksida dapat berimplikasi terjadinya berbagai macam proses patologis, seperti iskemia, penyakit inflamasi dan atherosklerosis. Apabila bereaksi dengan lemak dapat menimbulkan lemak peroksida, bereaksi dengan protein menghasilkan protein teroksidasi dan dapat juga bereaksi dengan DNA menyebabkan DNA rusak (Sierens *et al.*, 2001). Panayiotidis *et al.* (1999) menyatakan hidrogen peroksida merupakan senyawa metabolit intermediet bersifat oksidatif dan mampu menginduksi kerusakan DNA meskipun berinteraksi secara tidak langsung. Sedangkan Sierens *et al.*, (2001) mendapatkan kerusakan DNA limfosit yang diinkubasi dengan hidrogen peroksida 500 μ M di dalam kultur selama 10 menit.

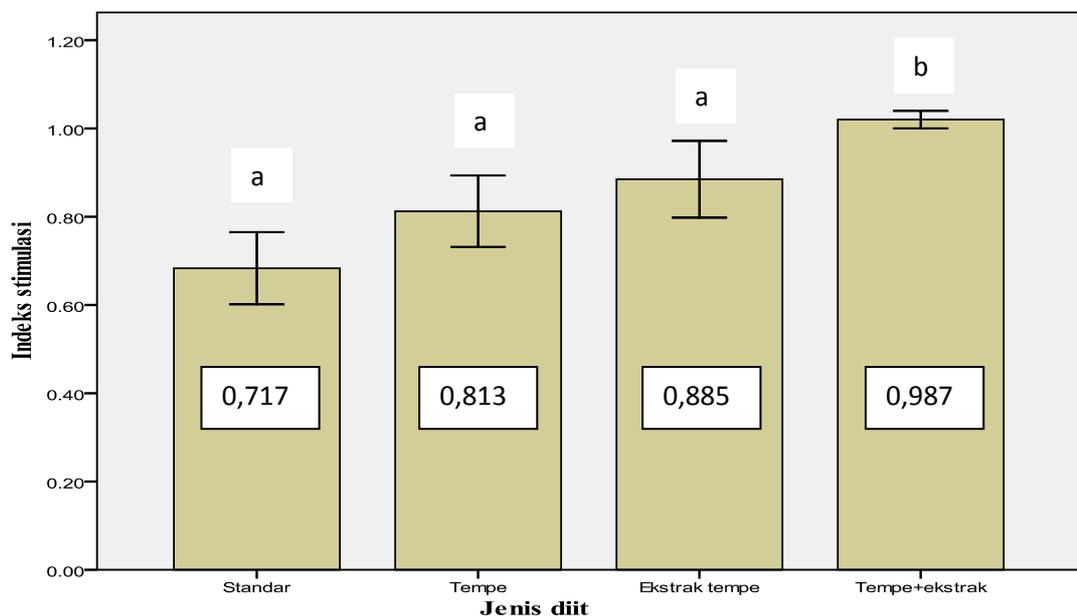
Konsentrasi hidrogen peroksida yang digunakan dalam penelitian ini 90 μ M per kultur. Penentuan konsentrasi ini didasarkan pada penelitian yang dilakukan peneliti bahwa pada konsentrasi 90 μ M mulai banyak kultur limfosit yang berasal dari tikus perlakuan terhambat proliferasinya. Limfosit yang digunakan berasal dari limpa tikus yang telah mengalami perlakuan berupa jenis diit, yaitu diit standar, tempe, ekstrak tempe dan campuran tempe dan ekstrak tempe.

Hasil analisa terhadap indeks stimulasi proliferasi limfosit menunjukkan rata-rata nilai indeks stimulasi proliferasi dari semua kelompok diit di bawah satu (Gambar 1). Kelompok tikus diit standar nilai indeks stimulasinya paling rendah (0,717), kelompok diit tempe 0,813, kelompok diit ekstrak tempe 0,885, sedangkan kelompok yang diberi diit campuran tempe dan ekstraknya paling tinggi (0,987). Data tersebut menunjukkan rata-rata keempat kelompok lebih rendah dibanding kultur limfosit yang tidak ditambah hidrogen peroksida. Ini berarti semua kultur limfosit yang ditambah hidrogen peroksida terhambat proliferasinya. Dengan demikian, hidrogen peroksida dapat menekan proliferasi dari limfosit.

Berdasarkan uji statistik metode ANOVA faktor tunggal pengaruh diit terhadap indeks stimulasi dari limfosit yang ditambahkan hidrogen peroksida ada perbedaan secara signifikan ($P \leq 0,05$). Berdasarkan hal tersebut dapat disimpulkan bahwa mengonsumsi tempe dan ekstraknya mampu meningkatkan daya tahan limfosit terhadap hidrogen peroksida. Sedangkan tikus yang diberi tempe daya tahan limfositnya lebih tinggi dibanding standar, namun tidak signifikan.

Penambahan hidrogen peroksida ke dalam kultur limfosit dapat menciptakan kondisi stres oksidatif, yaitu peningkatan jumlah prooksidan (Panayiotidis *et al.*, (1999) dan Sierens *et al.*, (2001)). Dalam keadaan keseimbangan antara prooksidan dan antioksidan, prooksidan dapat dinetralkan oleh enzim superoksida dismutase, katalase, glutathion peroksidase dan masih banyak antioksidan lain (Langseth, 1995 dan Yen *et al.*, 2004).

Menurut Nabet (1996), pembentukan anion superoksida (O_2^-) melalui beberapa mekanisme antara lain reduksi monovalen O_2 dalam mitokondria, reaksi yang dikatalis NADP oksidase dalam proses fagositosis, metabolisme obat-obatan dan reaksi yang dikatalis oleh xantin oksidase. Pembentukan anion superoksida melalui jalur reaksi yang dikatalis oleh xantin oksidase adalah $xantin + H_2O + 2O_2 \rightarrow asam\ urat + O_2^- + 2H$.



Gambar 1. Grafik ketahanan limfosit terhadap hidrogen peroksida 90 μM yang dinyatakan dalam indeks stimulasi proliferasi. Tanda huruf berbeda menunjukkan beda nyata ($p \leq 0.05$).

Enzim SOD mengkatalis dismutasi O_2^- menjadi H_2O_2 (Yuan *et al.*, 2009). Enzim ini menghambat kehadiran simultan dari O_2^- dan H_2O_2 yang berasal dari pembentukan radikal hidroksi ($*OH$). Pada manusia SOD dalam bentuk Mn-SOD mitokondria dan Cu-Zn SOD sitosolisik dan ekstraseluler (Nabet, 1996). Enzim katalase merupakan enzim terlokasi pada manusia dalam peroksisom dan dalam hematis. Katalase mendegradasi hidrogen peroksida menjadi air ($H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$) (Nabet, 1996 dan Yuan *et al.*, 2009). Enzim glutathion peroksidase merupakan enzim yang mempunyai selenium (Se) pada sisi aktifnya. Enzim ini mengkatalis reduksi H_2O_2 dan lemak peroksida ($LOOH$) dengan menggunakan glutathion

tereduksi (GSH) sebagai kofaktor (Nabet, 1996). Menurut Meydani *et al.*, (1995), sel imun sangat sensitif terhadap perubahan keseimbangan prooksidan dan antioksidan.

Hasil analisa menunjukkan daya tahan limfosit terhadap penambahan hidrogen peroksida dari kelompok tikus perlakuan lebih tinggi dibanding kelompok kontrol, meskipun rata-rata semua kelompok mengalami penghambatan. Hal ini terjadi karena tempe mengandung komponen-komponen yang dapat berperan dalam meningkatkan status antioksidan limfosit seperti isoflavon, vitamin E, β -karoten, asam amino dan mineral Cu, Mn dan Zn. Sehingga kemungkinan limfosit dari kelompok yang mengkonsumsi tempe dan ekstraknya telah teraktivasi terlebih dahulu di dalam tubuh oleh komponen tempe (isoflavon). Kemungkinan lain hidrogen peroksida tidak dapat menembus limfosit atau dapat menembusnya, akan tetapi dapat dinetralisir oleh sistem antioksidan sel.

Aktivitas Enzim Antioksidan

Ada tiga enzim yang berperan dalam menghambat reaksi oksidasi di dalam tubuh, yaitu enzim superoksida dismutase, katalase dan glutathion peroksidase (Yen *et al.*, 2004, Ramprasath *et al.*, 2005 dan Rimbach *et al.*, 2008). Ketiga enzim tersebut berperan menekan terjadinya reaksi oksidasi di dalam tubuh dengan adanya ROS, seperti O_2^- dan H_2O_2 . Enzim SOD merubah radikal superoksida menjadi molekul hidrogen peroksida dan oksigen. Enzim katalase dan glutathion peroksidase mengkonversi hidrogen peroksida menjadi H_2O (Yuan *et al.*, 2009).

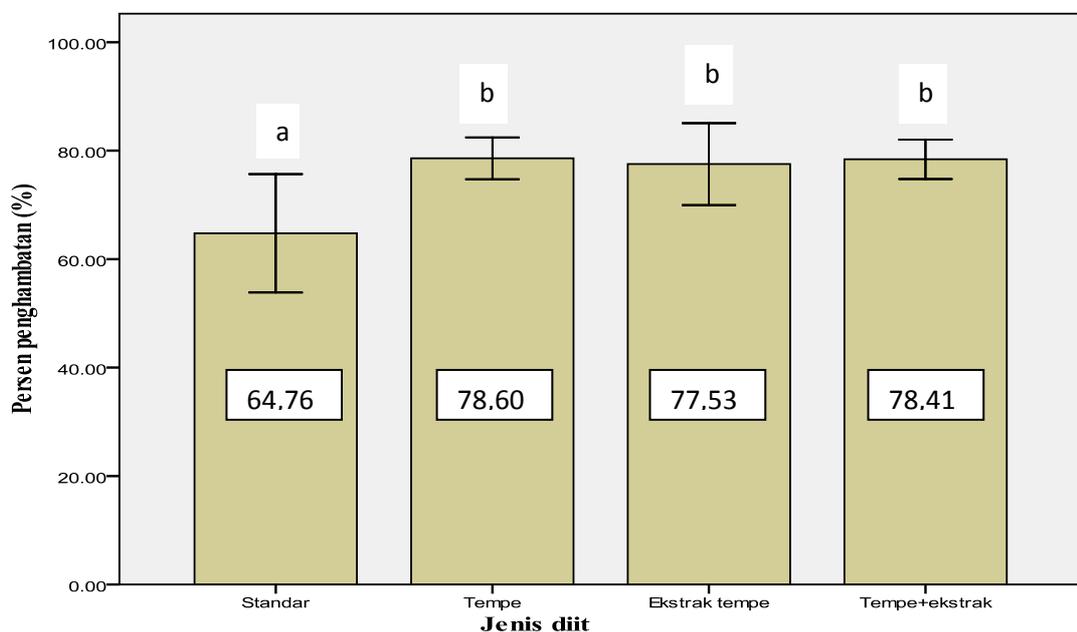
Enzim superoksida dismutase (SOD)

Aktivitas enzim superoksida dismutase dari plasma tikus yang diberi perlakuan diit standar, tempe, ekstrak tempe dan campuran tempe dan ekstraknya masing-masing dinyatakan dalam persen penghambatan adalah 64,76, 78,62, 77,53 dan 78,41 persen. Gambar 2 menunjukkan aktivitas enzim SOD plasma dengan berbagai perlakuan jenis diit. Dari Gambar 2 terlihat diit yang mengandung tempe dan ekstraknya memiliki aktivitas SOD lebih tinggi dibanding diit standar.

Hasil analisa statistik dengan ANOVA faktor tunggal, bahwa jenis diit berpengaruh secara signifikan terhadap aktivitas enzim SOD ($p \leq 0,05$). Ini menunjukkan bahwa diit tempe dan ekstraknya dapat meningkatkan aktivitas enzim SOD. Berdasarkan uji LSD didapatkan rata-rata aktivitas SOD kelompok diit standar beda nyata dengan kelompok diit yang lain. Sedangkan antar perlakuan rata-rata aktivitas SOD kelompok diit tempe, diit ekstrak dan campuran tempe dan ekstraknya tidak beda nyata.

Enzim SOD merupakan salah satu enzim yang berperan dalam menghambat reaksi oksidasi dengan merubah superoksida radikal menjadi hidrogen peroksida dan oksigen (Yuan

et al., 2009). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tikus yang mendapatkan diit tempe dan ekstraknya meningkat aktivitas SOD nya. Hasil ini sesuai dengan yang ditemukan Astuti (1997) bahwa tikus yang mengkonsumsi tempe aktivitas enzim SOD lebih tinggi dibanding standar, dan ada kecenderungan semakin tinggi kandungan tempe di dalam pakan semakin tinggi pula aktivitas SOD nya. Masih menurut Astuti (1997) peningkatan aktivitas SOD ini mungkin disebabkan tempe mengandung SOD dengan aktivitas tinggi. Di samping itu, di dalam tempe kaya dengan logam Cu, yang mana logam Cu berfungsi sebagai kofaktor dan regulator dari aktivitas enzim SOD. Kemungkinan lain komponen-komponen antioksidan dalam tempe bekerja secara sinergis dengan enzim SOD dalam menetralkan radikal bebas, sehingga aktivitas enzim SOD menjadi tinggi (Yuan *et al.*, 2009).



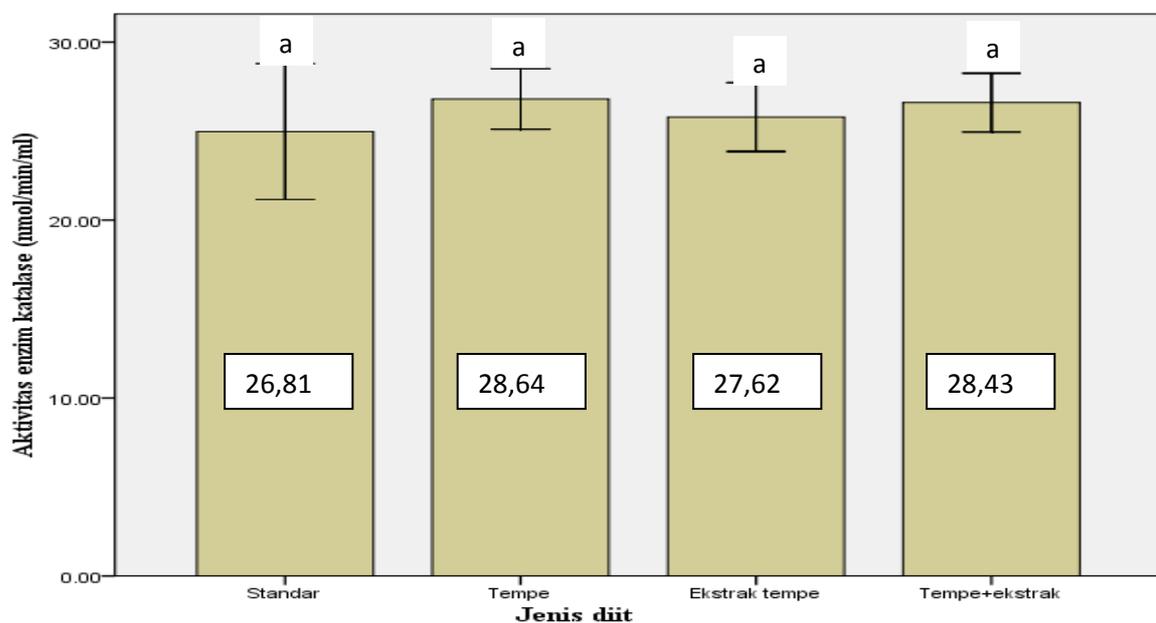
Gambar 2. Grafik pengaruh jenis diit terhadap aktivitas enzim superoksida dismutase dalam persen penghambatan. Tanda huruf berbeda menunjukkan beda nyata ($p \leq 0.05$).

Meningkatnya aktivitas enzim SOD menunjukkan bahwa status antioksidan pada subyek meningkat. Hal ini berdampak terhadap meningkatnya kemampuan dalam menangkal senyawa-senyawa yang bersifat prooksidan. Sel imun sangat peka terhadap keseimbangan antioksidan dan prooksidan. Dengan meningkatnya status antioksidan pada subyek penelitian, maka meningkat pula sistem imunnya. Hal ini terbukti dengan adanya limfosit dari tikus yang mengkonsumsi tempe memiliki daya tahan terhadap hidrogen peroksida lebih tinggi dibanding yang lain.

Aktivitas enzim katalase

Aktivitas enzim katalase dari plasma tikus yang diberi perlakuan diit standar, tempe, ekstrak tempe dan campuran tempe dan ekstraknya masing-masing adalah 26,81, 28,64, 27,62 dan 28,43 nmol/min/ml. Ada kecenderungan pemberian tempe dan ekstraknya meningkatkan aktivitas enzim katalase.

Gambar 3 menunjukkan aktivitas enzim katalase plasma dengan berbagai perlakuan jenis diit. Dari gambar tersebut terlihat diit yang mengandung tempe dan ekstraknya memiliki aktivitas enzim katalase lebih tinggi dibanding diit standar. Namun demikian, hasil analisa statistik dengan ANOVA faktor tunggal, bahwa jenis diit tidak berpengaruh secara signifikan terhadap aktivitas enzim katalase. Hal ini berarti pemberian tempe pada pakan tikus aktivitas enzim katalasenya tidak beda nyata dengan tikus yang diberi pakan standar.



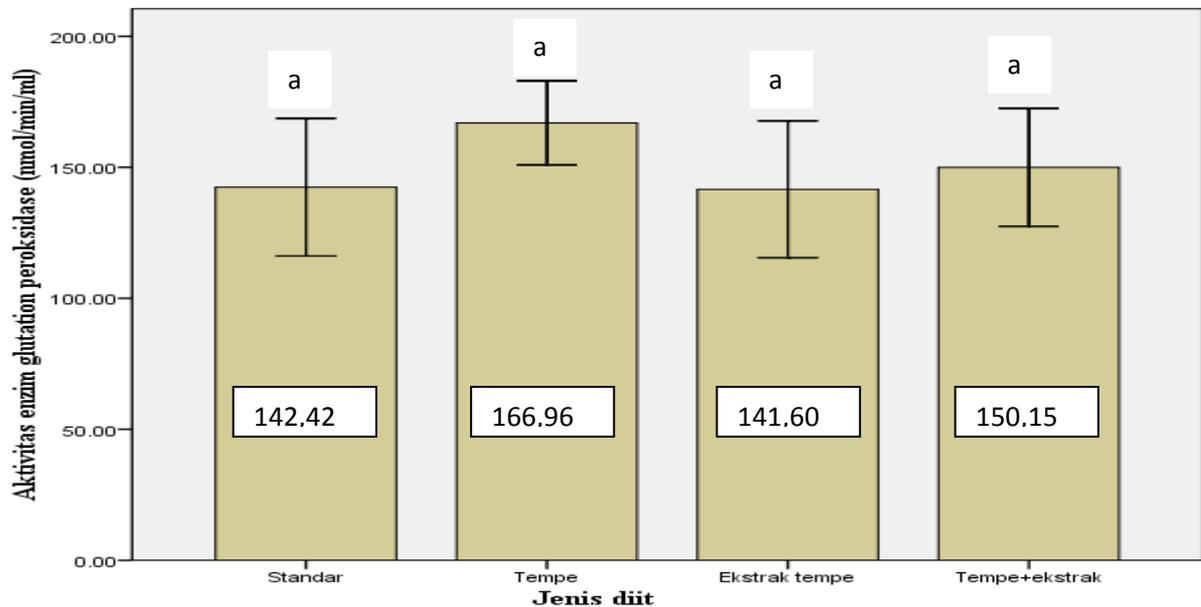
Gambar 3. Grafik pengaruh jenis diit terhadap aktivitas enzim katalase . Tanda huruf sama menunjukkan tidak beda nyata

Aktivitas Enzim Glutation Peroksidase

Aktivitas enzim glutathione peroxidase dari plasma tikus yang diberi perlakuan diit standar, tempe, ekstrak tempe dan campuran tempe dan ekstraknya masing-masing adalah 142,42, 166,96, 141,60 dan 150,15 nmol/min/ml. Ada kecenderungan pemberian tempe dan ekstraknya meningkatkan aktivitas enzim glutathione peroxidase.

Gambar 4 menunjukkan aktivitas enzim glutathione peroxidase plasma dengan berbagai perlakuan jenis diit. Dari gambar tersebut terlihat diit yang mengandung tempe dan ekstraknya memiliki aktivitas enzim glutathione peroxidase lebih tinggi dibanding diit standar. Namun

demikian, hasil analisa statistik dengan ANOVA faktor tunggal, bahwa jenis diit tidak berpengaruh secara signifikan terhadap aktivitas enzim glutathion peroksidase. Hal ini berarti pemberian tempe pada pakan tikus aktivitas enzim glutathion peroksidasenya tidak beda nyata dengan tikus yang diberi pakan standar.



Gambar 4. Grafik pengaruh jenis diit terhadap aktivitas enzim glutathion peroksidase. Tanda huruf sama menunjukkan tidak beda nyata.

UCAPAN TERIMA KASIH

Saya mengucapkan terima kasih kepada Danone Institute Indonesia yang telah membiayai penelitian ini.

KESIMPULAN

Jenis diit tempe kedelai hitam meningkatkan daya tahan limfosit dari hidrogen peroksida dan aktivitas enzim SOD. Ada kecenderungan diit tempe kedelai hitam meningkatkan aktivitas enzim katalase dan glutathion peroksidase, namun pengaruhnya tidak signifikan. Konsumsi tempe kedelai hitam dapat meningkatkan status antioksidan tikus.

DAFTAR PUSTAKA

- Astuti, M. 1996. Tempe dan antoksidan prospek pencegahan penyakit degeneratif. *Dalam*. Sapuan dan N. Soetrisno (eds.). 1996. *Bunga Rampai Tempe Indonesia*, Jakarta, hal. 133-146. Yayasan Tempe Indonesia, Jakarta.
- Astuti, M. 1997. Superoxide Dismutase in Tempe, an Antioxidant Enzym, and its Implication on Health and Disease. *Dalam*. Sudarmadji et al. (eds.). 1997. *Reinventing the Hidden Miracle of Tempe*, hal. 145-156. Proceeding International Tempe Symposium, Bali. Yayasan Tempe Indonesia, Jakarta.
- Brambilla, D., C. Mancuso, M. R. Scuderi, P. Bosco, G. Cantarella, L. Lempereur, G.D. Benedetto, S. Pezzino and R. Benardini. 2008. The role of antioxidant supplement in

- immune system, neoplastic, and neurodegenerative disorders: a point of view for an assessment of the risk/benefit profile. *Nutr. J.*, 7:29 – 38.
- Chew, B.P. and J.S. Park. 2004. Carotenoid action on the immune response. *J. Nutr.*, 134:257 – 261.
- Haron, H., A. Ismail, A. Azlan, S. Shahar and L.S. Peng. 2009. Daidzein and genestein contents in tempeh and selected soy products. *Food Chem.*, xxx: 1-7.
- Krinsky, I. 1992. *Mechanism of Action of Biological Antioxidants. The Society for Experimental Biology and Medicine*. Boston, Massachusetts.
- Mazur, W.M., J.A. Duke, K. . and S. Rasku. 1998. Isoflavonoids and lignans in legumes: Nutritional and health aspects in humans. *J. Nutr. Biochem.*, 9:193 – 200.
- Meydani, S.N., Wu D., Santos, M.S. and Hayek, M.G. 1995. Antioxidant and response in aged person: overview of present evidence. *Am.J.Clin.Nutr.*, 62:1462-1476.
- Nabet, F.B. 1996. Zat gizi antioksidan penangkal senyawa radikal pangan dalam sistem biologis. *Dalam. Zakaria et al. (eds.). Prosiding Seminar Senyawa Radikal dan Sistem pangan: Reaksi Biomolekuler, Dampak terhadap Kesehatan dan Penangkalan*, hal. 8-15. Kerjasama PAU IPB dengan Kedutaan Perancis, Jakarta.
- Nurrahman, M. Astuti, Suparmo dan M.H.N.E. Soesatyo. 2011. The effect of black soybeans tempe and its ethanol extract on lymphocyte proliferation and IgA secretion in *Salmonella typhimurium* induced rat. *Afri. J. Food Sci.*, 5(14): 775 – 779.
- Panayiotidis, M., O. Tsolas and D. Galaris. 1999. Glucose oxidase-produced H₂O₂ induces Ca⁺-dependent DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. *Free Rad. Biol & Med.*, 26(5/6): 548 – 556.
- Pawiroharsono, S. 1996. Aspek mikrobiologi tempe. *Dalam. Sapuan dan N. Soetrisno (eds.). 1996. Bunga Rampai Tempe Indonesia, Jakarta*, hal. 169-204. Yayasan Tempe Indonesia, Jakarta.
- Penalvo, J.L., T. Nurmi and H. Adlercreutz. 2004. A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products. *Food Chem.*, 87: 297-305.
- Ramprasath, V.R., P. Shanthi and P. Sachdanandam. 2005. Evaluation antioxidant effect of *Samecarpus anacardium* Linn. Extract on the components of immune system in adjuvant arthritis. *Vas. Pharmacol.*, 42:179 – 186.
- Rimbach, G., C.B. Saadatmandi, J. Frank, D. Fuchs, U. Wenzel, H. Daniel, W.L. Hall and P.D. Weinberg. 2008. Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease-A molecular perspective. *Food and Chem. Toxicol.*, 46:1308-1319.
- Sasmito, E., Rumiati, S. Rahayu W., E. Andriyani dan R. Istikharah. 2006a. Pengaruh pemberian susu kuda terfermentasi terhadap imunitas vaksin hepatitis A pada tikus Balb/c. *Maj. Farma. Ind.* 17(1): 13-18.
- Sierens, J., J.A. Hartley, M.J. Campbell, A.J.C. Leatham and J.V. Woodside. 2001. Effect of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay. *Mut. Res.*, 485:169-176.
- Suparmo and P. Markakis, 1987. Tempeh Prepared from Germinated Soybeans. *J. Food Sci.*, 52(6):1736–1737.
- Xu, B.J. and S.K.S. Chang. 2007. A Comparative study on phenolic profiles and antioxidant of legumes as affected by extraction solvents. *J. Food Sci.*, 72(2):159-166.
- Yen, G.C., P.D. Duh, and H.J. Su. 2004. Antioxidant properties of lotus seed and its effect on DNA damage in human lymphocytes. *Food Chem.*, 89: 379 – 385.
- Yuan, C., X.Huang, L. Cheng, Y. Bu, and G.Liu, F. Yi, Z. Yang and F. Song. 2009. Evaluation of antioxidant and immune activity of *Phellinus ribis* glucan in mice. *Food Chem.*, 115: 581 – 584.

