

POTENSI PROTEIN KECAMBAH KEDELAI DALAM MENSTIMULASI SEKRESI INSULIN PADA PANKREAS TIKUS NORMAL DAN DIABETES

The Potential of Germinated Soybean Protein to Stimulate Insulin Secretion in the Pancreas of Normal and Diabetic Rats

Bayu Kanetro¹, Zuheid Noor², Sutardi², Retno Indrati²

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah mempelajari potensi protein biji dan kecambah kedelai (protein total dan TI), Kunitz Trypsin Inhibitor (KTI), dan Bowman Birk Inhibitor (BBI) dalam menstimulasi sekresi insulin pada pankreas tikus normal dan diabetes melalui pengujian biologis secara *in vitro*. Tikus Sprague Dawley (SD) jantan yang digunakan dalam pengujian biologis secara *in vitro* dibagi menjadi dua kelompok, yaitu tikus diabetes yang disiapkan dengan cara menginduksi melalui injeksi aloksan, dan tikus normal (tanpa diinjeksi aloksan). Selanjutnya tikus dieksekusi dengan bius ether dan dilakukan pencucian beberapa kali dengan larutan RPMI 1640 LITE. Pencucian terakhir menggunakan buffer Krebs Ringer Bicarbonat sebelum pancreas islet yang diperoleh diinkubasi. Pancreas islet diinkubasi dalam Krebs buffer yang dicampur dengan 7 perlakuan media inkubasi yang berbeda, yaitu medium glukosa sebagai control (R), protein total biji kedelai (SPT), protein total kecambah kedelai (GPT), protein TI biji kedelai (SPTI), protein TI kecambah kedelai (GPTI), KTI dan BBI. Inkubasi dilakukan selama 2 jam, kemudian disonikasi, dan sentrifugasi. Supernatan yang diperoleh disimpan pada suhu -20 °C untuk disiapkan dalam analisis insulin menggunakan metode ELISA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa injeksi aloksan pada tikus dapat menginduksi terjadinya diabetes karena dapat meningkatkan gula darah tikus. Perlakuan media inkubasi berpengaruh terhadap kadar protein terlarut media dan kemampuannya menstimulasi islet untuk mensekresikan insulin. Protein kecambah kedelai memiliki kemampuan menstimulasi sekresi insulin baik pada pancreas tikus normal maupun diabetes. Sekresi insulin dari islet dalam medium GPTI paling tinggi dibandingkan perlakuan yang lain. Urutan potensi sekresi insulin dari pancreas tikus normal, yaitu berturut-turut dari yang tertinggi GPTI, KTI, BBI, GPT, SPTI, SPT, dan R. Sedangkan pada pancreas tikus diabetes, yaitu dari yang tertinggi GPTI, GPT, SPTI, BBI, KTI, SPT, and R media. Secara umum disimpulkan bahwa potensi protein kecambah kedelai dalam menstimulasi sekresi insulin lebih baik dibandingkan protein biji kedelai.

Kata kunci: Perkecambahan, protein kedelai, tripsin inhibitor, pancreas islets, insulin, diabetes

ABSTRACT

The objective of this investigation was to examine the potential of seed and germinated SP that were extracted at two condition precipitation, Kunitz Trypsin Inhibitor (KTI) and Bowman Birk Inhibitor (BBI) to stimulate insulin secretion of the pancreas of induced diabetic and normal rats by *in vitro* bioassay. Mature male Sprague Dawley (SD) rats of the *in vitro* bioassay were divided into two groups. They were diabetic rats that was induced by aloksan injection and normal rats (without aloksan injection). Rat was anaesthetized with ether, and the pancreas was taken out, injected by HBS solution, hydrolyzed by collagenase and then washed several times with RPMI 1640 LITE solution and Krebs Ringer bicarbonate buffer before incubation. The islets of the pancreas were incubated in Krebs buffer under seven conditions of media treatment as follows: glucose medium that was used as a reference standard (R), total protein of seed (SPT), total protein of germinated soybean (GPT), TI protein of seed (SPTI), TI protein of germinated soybean (GPTI), KTI, and BBI. After two hours of incubation, the mixture was sonicated, and centrifuged. The supernatant was stored at -20 °C for determination of insulin. The insulin analysis was conducted by ELISA method. The results show that aloksan injection increased the level of blood sugar and induced diabetic rats. The media treatment altered the

¹ Program Studi Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Mercu Buana Jl. Wates km 10, Yogyakarta

² Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Sosio Yustisia, Bulaksumur, Yogyakarta 55281

soluble protein profile and the insulin secretion of the islets. The germinated SP has the ability to stimulate insulin secretion of the pancreas of diabetic as well as normal rats. The insulin secretion of the islets in the medium of crude TI of germinated soybean (GPTI) was highest. The potential order of the insulin secretion of normal rats islets were GPTI, KTI, BBI, GPT, SPTI, SPT, and R media. While the potential order of the insulin secretion of diabetic rat islets were GPTI, GPT, SPTI, BBI, KTI, SPT, and R media. The potential of germinated SP to stimulate insulin secretion was better than ungerminated SP.

Keywords: *Germinated, soybean protein, trypsin inhibitor, pancreas islets, insulin, diabetic.*

PENDAHULUAN

Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa protein kedelai yang diperoleh melalui pengendapan pada pH asam (pH 4 dan 3) memiliki kemampuan menstimulasi sekresi insulin secara *in vitro* (Krissetiana, 2000) dan bersifat hipoglisemik melalui pengujian secara *in vivo* (Hurley dkk., 1995; Retnaningsih dkk., 2001). Protein kedelai juga telah diketahui memperbaiki resistensi insulin dan meningkatkan sensitivitas insulin pada model binatang diabetik (Iritani dkk., 1996; Iritani dkk., 1997). Adanya kemampuan tersebut disebabkan protein kedelai merupakan protein yang berkualitas dan mengandung asam amino yang lengkap dan dalam jumlah yang cukup untuk dapat menstimulasi sekresi insulin, misalnya arginin. Dibandingkan asam amino yang lain, arginin dan leusin memiliki potensi yang besar dalam menstimulasi sekresi insulin (Kaplan dan Szabo, 1989).

Selain itu protein kedelai juga mengandung trypsin inhibitor (TI). TI telah diketahui mampu memperbaiki fungsi pankreas dan meningkatkan sekresi insulin pada tikus diabetes (Suzuki dan Tobe, 1984). Percobaan secara *in vivo* juga telah menunjukkan bahwa penghambatan enzim tripsin oleh TI dalam *duodenum* pada tikus akan meningkatkan plasma Cholecystokinin (CCK) yang selanjutnya meningkatkan sekresi enzim dan hormon pankreatik secara paralel (Reseland dkk., 1996). Hal tersebut didukung penelitian Reseland dkk. (1996) yang menunjukkan bahwa instilasi TI mampu meningkatkan plasma CCK dan sekresi enzim pankreatik. CCK termasuk hormon intestinal yang dapat memacu sekresi insulin.

Hal tersebut membuka peluang pemanfaatan kedelai sebagai makanan fungsional bagi penderita diabetes. Penemuan makanan fungsional bagi penderita diabetes diharapkan segera dapat terwujud mengingat di Indonesia terdapat 8,4 juta penderita diabetes (Anonim, 2006). Peningkatan penderita diabetes juga akan meningkatkan tingkat kejadian penyakit lain, karena penderita diabetes dapat mengalami berbagai komplikasi. Atherosklerosis akan terjadi lebih awal pada penderita diabetes dibanding nondiabetes (Burtis dkk., 1988). Selain itu tingkat kematian akibat *coronary artery disease* (CAD) yang merupakan atherosklerosis pada pembuluh darah arteri

jantung akan meningkat 2 – 4 kali pada penderita diabetes, dan *cerebrovascular disease* (aterosklerosis pada pembuluh darah otak) yang menyebabkan stroke akan meningkat 150 – 400 % pada pasien diabetes (Beckman dkk., 2002).

Salah satu kendala untuk mengaplikasikan kedelai sebagai makanan fungsional bagi penderita diabetes adalah sifat TI yang sebagian besar tidak stabil terhadap pemanasan (Frozier dkk., 1997), sehingga kemungkinan akan terjadi penurunan aktivitas TI yang cukup nyata setelah proses pengolahan pangan. Menurut Miyagi dkk. (1997) dalam Su dan Chang (2002) produk-produk olahan kedelai mengandung aktivitas TI yang terbatas, yaitu tinggal 0,3 – 13 % dari aktivitas TI biji kedelai segar, sehingga konsumsi produk olahan kedelai bagi penderita diabetes kemungkinan kurang memberikan manfaat penurunan gula darah. Kendala lain adalah, pada umumnya kacang-kacangan khususnya kedelai dalam bentuk biji tidak lazim dikonsumsi pada kondisi segar (belum diolah), karena adanya *beany flavor* yang tidak disukai. Kecambah kacang-kacangan merupakan salah satu alternatif untuk mengatasi permasalahan tersebut. Kecambah kacang-kacangan memiliki aktivitas lipoksigenase yang lebih rendah dibandingkan dalam bentuk bijinya, sehingga dapat mengurangi *beany flavor* (King dan Puwastien, 1987; Kanetro dan Wariyah, 2002).

Kecambah kedelai sudah lazim dikonsumsi dalam bentuk kecambah segar (*lalapan*) atau sebagai campuran sayur meskipun tidak sebanyak kecambah kacang hijau. Namun kacang hijau memiliki aktivitas TI yang jauh lebih rendah dibandingkan kedelai, sehingga kecambah kedelai lebih berpotensi dikembangkan sebagai makanan fungsional bagi penderita diabetes. Diantara jenis kacang-kacangan, kedelai mengandung aktivitas TI yang paling tinggi (Boisen, 1989). Aktivitas TI kedelai, kacang hijau dan rata-rata jenis kacang-kacangan lain berturut-turut 15,77; 2,37; dan kurang dari 12 mg inhibitor/g sampel (Saini, 1989).

Selama perkecambahan biji akan terjadi mobilisasi kandungan makanan karena adanya peningkatan aktivitas enzim. Mobilisasi protein melibatkan enzim protease. Perkecambahan kacang tunggak selama 48 dan 72 akan meningkatkan akti-

vitas protease sebesar 2,2 dan 3,2 kali dari aktivitas awal (sebelum dikecambahkan) (Nnanna dan Phillips, 1988). Selama perkecambahan biji barley juga terjadi peningkatan pendeptidase (Zhang dan Jones, 1999). Hidrolisis protein menghasilkan protein BM rendah atau peptida sederhana dan asam amino bebas yang digunakan untuk sintesis protein dan sebagai sumber energi (Bewley dan Black, 1983). Beberapa penelitian lain juga telah menunjukkan perkecambahan kacang tanah sampai 72 jam menyebabkan peningkatan asam amino bebas (Chiou dkk., 1997). Perkecambahan kacang tanah tersebut juga mengakibatkan perubahan komposisi asam amino, beberapa asam amino seperti Thr, Ser, Pro, Gly, Tyr, His, dan Arg meningkat 5 kali sesudah dikecambahkan selama 72 jam (Chiou dkk., 1997).

Degradasi protein selama perkecambahan kedelai yang menghasilkan peptida sederhana dan asam amino bebas serta masih adanya aktivitas TI dalam kecambah kedelai kemungkinan akan mendukung peran protein kedelai dalam menstimulasi sekresi insulin. Pengujian karakteristik kimia protein kecambah kedelai telah menunjukkan bahwa protein kecambah mengandung asam amino bebas pemacu sekresi insulin yang lebih tinggi dibandingkan protein kedelai, dan masih mengandung aktivitas TI khususnya pada protein yang diperoleh melalui pengendapan pH 3 (Kanetro dkk., 2006). Oleh karena itu protein kecambah kedelai kemungkinan memiliki kemampuan menstimulasi sekresi insulin yang lebih tinggi dibandingkan protein biji kedelai. Hal tersebut akan dibuktikan dalam penelitian ini.

Sebagian besar asam amino memiliki kemampuan menstimulasi sekresi insulin (Kahn dkk., 1997). Beberapa penelitian juga telah menunjukkan bahwa pemberian asam-asam amino bebas tertentu maupun hidrolisat protein yang dikombinasikan dengan glukosa mampu meningkatkan level insulin (Awawdeh dkk., 2006; Calbet dan MacLean, 2002; van Loon dkk., 2000). Asam-asam amino tertentu telah diketahui berperan dalam regulasi sekresi insulin. Asam amino secara individu (asam amino bebas) harus dikombinasikan dengan glukosa agar dapat berperan secara efektif dalam memacu sekresi insulin (Newsholme dkk., 2007). Asam-asam amino pemacu sekresi insulin meliputi Arg, Lis, Phe, Ala, Leu, dan Ile (Calbeat dan MacLean, 2002; Newsholme dkk., 2006).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan protein kecambah kedelai dalam menstimulasi sekresi insulin secara *in vitro* dibandingkan dengan protein biji kedelai dan standar TI. Penelitian ini diharapkan dapat menunjukkan bahwa kecambah kedelai memiliki potensi yang lebih baik sebagai sumber protein yang dapat menstimulasi sekresi insulin dibandingkan biji kedelai, sehingga dapat dimanfaatkan untuk pengembangan makanan fungsional bagi penderita diabetes.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan utama penelitian ini adalah biji kedelai varietas lokal yang diperoleh dari Balai benih dengan spesifikasi tertentu dan seragam serta memiliki aktivitas TI tinggi, yaitu Varietas Sinabung. TI kedelai standar/*Soy Bean Trypsin Inhibitor* KTI (*Kunitz Trypsin Inhibitor*) dan BBI (*Bowman Birk Inhibitor*) (Sigma). Bahan-bahan kimia PA (Merck dan Sigma) untuk pemisahan protein kedelai dan analisa kimia meliputi HCL, NaOH, Reagen Biuret, HBSS (Hanks Balance Salt Solution), Larutan RPMI 1640 LITE, Collagenase Tipe XI, Glukosa standar, NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, Na₂CO₃, NaHCO₃, BSA (Bovine Serum Albumin), NaN₃, Na-Phosphat, NaCl, Triton X-100, Diethanolamin, MgCl₂, Insulin Monoklonal K.36 a C 10 (Sigma), dan Anti-Mouse IgG (Sigma). Bahan kimia untuk analisa kadar gula darah dengan kit "Blood Glukose Monitoring System", dan bahan-bahan untuk pakan standar tikus mengacu pada AIN 1993 (Reeves dkk., 1993), serta bahan untuk induksi diabetes digunakan aloksan (Sigma).

Hewan percobaan yang digunakan adalah tikus putih jantan jenis Sprague Dawley (SD) berumur kurang lebih 3 bulan dengan berat badan 240 – 260 kg diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP), UGM, Yogyakarta.

Peralatan

Peralatan yang digunakan meliputi peralatan untuk perkecambahan, pembuatan tepung kecambah, dan pembuatan isolat protein, serta untuk analisa, yaitu antara lain oven (Mommert-Germany), sentrifuse (Beckman tipe 7B-6), sentrifuse microfuge (TM11), vortex, *magnetic stirrer*, *freeze drier*, pH meter (HM-205), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 120-01), waterbath (GFL 1083), inkubator kultur (IG 150-Joun), microtiter plate (Falcon 3912), ELISA reader (ICN Titertek Multiscan MCC 1340 MKII), kandang tikus individual berserta perlengkapannya, microhematocrit tubes (Bector Dickinson & Company), syringe injeksi, dan alat-alat gelas.

Cara Penelitian

Perkecambahan dan pembuatan tepung. Proses perkecambahan diawali dengan perendaman kedelai dalam aquades selama 8 jam. Tahap selanjutnya adalah inkubasi pada suhu kamar dan dalam ruangan gelap, serta dalam wadah tertutup dengan RH mendekati 100 % selama 36 jam. Kecambah yang diperoleh dikeringkan dengan *freeze dryer* dan ditepungkan. Sebagai kontrol dibuat juga tepung biji kedelai.

Ekstraksi protein tepung biji dan kecambah kedelai.

Ekstraksi protein ini dilakukan menurut Noor dkk (2000) dengan dua cara, yaitu melalui pengendapan pH 4 yang menghasilkan fraksi protein total karena sebagian besar protein kedelai mengendap pada pH ini. Cara kedua adalah pengendapan pH 3 yang menghasilkan fraksi protein TI atau *crude* TI, karena sebagian besar TI mengendap pada pH ini dan masih terikat protein lain.

1. Fraksi protein total

Tepung kedelai diekstraksi dengan aquades yang diatur menjadi pH 9 selama 30 menit, suhu 40 °C, dan rasio tepung : aquades = 1 : 10, serta dilakukan pengadukan. Selanjutnya disentrifugasi pada 1500 g, 15 menit. Supernatan dipisahkan, dan diatur menjadi pH 4. Selanjutnya disentrifugasi pada 1500 g, 15 menit. Endapan yang diperoleh sebagian besar merupakan fraksi protein, kemudian dikeringkan dengan *freeze dryer*.

2. Fraksi protein TI

Tepung kedelai diekstraksi dengan aquades yang diatur pH 4, selama 30 menit, suhu 40 °C, dan dilakukan pengadukan. Suspensi tersebut selanjutnya disentrifugasi pada 1500 g, 15 menit. Supernatan yang diperoleh dipisahkan dan diatur menjadi pH 3, selanjutnya disentrifugasi pada 1500 g, 15 menit. Endapan yang diperoleh merupakan *crude* TI, kemudian dikeringkan dengan *freeze dryer*.

Preparasi pankreas tikus dan *bioassay* secara *in vitro*.

Pankreas diperoleh dari tikus-tikus yang dikelompokkan menjadi dua kelompok, yaitu kelompok tikus normal (tanpa injeksi aloksan), dan kelompok tikus diabetes (diinjeksi aloksan). Preparasi pankreas tikus dilakukan melalui tahap-tahap sebagai berikut. Tikus-tikus diadaptasikan selama 3 hari dengan pakan standar, kemudian dipuasakan selama 12 jam tetapi tetap diberi minum secara *ad-libitum*. Selanjutnya tikus diukur berat badannya. Selanjutnya tikus dibagi dua kelompok. Kelompok tikus pertama diinjeksi aloksan (tikus diabetes) dengan dosis 80 mg/kg bb tikus, sedangkan kelompok yang lain tanpa injeksi (tikus normal). Pemberian pakan standar dilanjutkan selama 24 jam, kemudian dilakukan pengukuran gula darah, dan berat badan, serta konsumsi pakan. Tahap berikutnya adalah tikus dibius dengan ether untuk diambil pankreasnya.

Pankreas yang diperoleh selanjutnya siap untuk dilakukan *bioassay* secara *in vitro* melalui tahap-tahap isolasi *pancreas islet* dan inkubasi menurut prosedur Tse dkk. (1995), yaitu pankreas dilakukan pencucian beberapa kali dengan larutan RPMI 1640 LITE. Pencucian terakhir menggunakan buffer Krebs Ringer Bicarbonat sebelum *pancreas islet* yang diperoleh diinkubasi. Inkubasi islet dilakukan dalam 1 ml Buffer Krebs Ringer Bikarbonat ditambah dengan 7 kondisi

perlakuan media yang mengacu pada Krissetiana (2000) dan Reseland dkk. (1996), yaitu glukosa 2,7 mmol/l (R/kontrol); glukosa 2,7 mmol/l + protein total biji 200 g/l (SPT); glukosa 2,7 mmol/l + protein total kecambah 200 g/l (GPT); glukosa 2,7 mmol/l + protein TI biji 10 g/l (SPTI); glukosa 2,7 mmol/l + protein TI kecambah (GPTI); glukosa 2,7 mmol/l + standar KTI 1,8 g/l; dan glukosa 2,7 mmol/l + standar BBI 0,6 g/l. Inkubasi dilakukan selama 2 jam, suhu 37 °C, selanjutnya disonikasi selama 30 detik x 6 dan disentrifugasi 7500 g selama 3 menit. Supernatan yang diperoleh dipisahkan dan disimpan -20 °C untuk dianalisa kandungan insulinnya.

Analisa kandungan insulin dilakukan dengan Metode ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) menurut Artama (1995). Sebelum dilakukan pengujian ELISA, supernatan dari masing-masing perlakuan diuji kadar protein terlarut (uji antigen) dengan Metode Biuret. Berdasarkan optimasi antigen dan antibodi, maka kondisi pengujian ELISA, yaitu banyaknya antigen insulin *pancreas islet* dari masing-masing perlakuan sebanyak 30 ug protein antigen/ml, antibodi insulin monoklonal K.36 a C.10 yang digunakan diencerkan 1 : 1250, dan konjugat alkaliphosphatase anti-mouse IgG yang digunakan diencerkan 1 : 3000, serta panjang gelombang yang digunakan pada ELISA *reader* 405 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh menunjukkan kandungan insulin yang disekresikan oleh *pancreas islet* akibat adanya stimulasi dari masing-masing perlakuan media inkubasi.

Rancangan Percobaan

Penelitian ini dilakukan dengan rancangan acak lengkap faktorial (2 faktor). Faktor pertama jenis media inkubasi yang terdiri 7 perlakuan yaitu R, SPTI, GPTI, SPT, GPT, KTI, BBI, dan faktor kedua jenis pankreas islet yang terdiri 2 perlakuan yaitu normal dan diabetes, sehingga dari dua faktor tersebut diperoleh 14 kombinasi perlakuan. Percobaan dilakukan dengan menganalisis parameter yang memberikan data analisis dari 14 kombinasi perlakuan tersebut. Parameter yang diamati adalah kadar protein dan kadar insulin. Data yang diperoleh dianalisis statistik ANOVA yang dilanjutkan dengan uji beda nyata DMRT jika perlakuan yang diberikan berpengaruh terhadap parameter yang diamati (Gomez dan Gomez, 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berat Badan dan Kadar Gula Darah Tikus Sebelum Diinjeksi Aloksan

Pengujian dalam penelitian ini diawali dengan pengamatan berat badan tikus yang bertujuan untuk menentukan jumlah aloksan yang diinjeksikan sesuai dosis yaitu 80 mg/kg berat badan tikus. Tikus yang digunakan dalam penelitian ini

juga diuji kadar gula darah untuk menunjukkan bahwa tikus yang digunakan dalam kondisi normal atau sehat (tidak sakit diabetes). Kadar gula darah tikus sesudah puasa sekitar 64 - 68 mg/dl. Pada penderita diabetes kadar gula puasa akan lebih dari 120 mg/dl, sedangkan pada orang normal sekitar 60 -110 mg/dl.

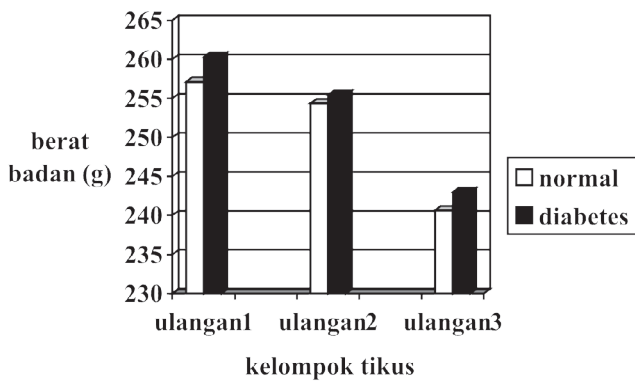
Berat Badan dan Kadar Gula Darah Tikus Sesudah Diinjeksi Aloksan

Berat badan dan kadar gula darah tikus percobaan diamati kembali sesudah satu hari tikus diinjeksi aloksan. Hasil pengujian terlihat pada Gambar 1 dan 2. Berat badan semua kelompok tikus sesudah perlakuan injeksi aloksan tidak mengalami perubahan berat badan yang nyata baik pada tikus normal maupun diabetes. Hal ini menunjukkan bahwa pemeliharaan tikus selama satu hari belum berpengaruh terhadap penurunan berat badan khususnya pada tikus yang sudah menderita diabetes, meskipun pada tikus kelompok ini sudah nampak terjadi penurunan konsumsi pakan yang tidak terjadi pada tikus normal. Penurunan konsumsi pakan tersebut disebabkan tikus mengalami stress akibat injeksi aloksan sehingga merasa tidak nyaman dan sakit. Aloksan menyebabkan nekrosis pada pulau-pulau Langerhans pankreas dan secara selektif merupakan toksin sel β pankreas yang bertanggung jawab dalam pembentukan hormon

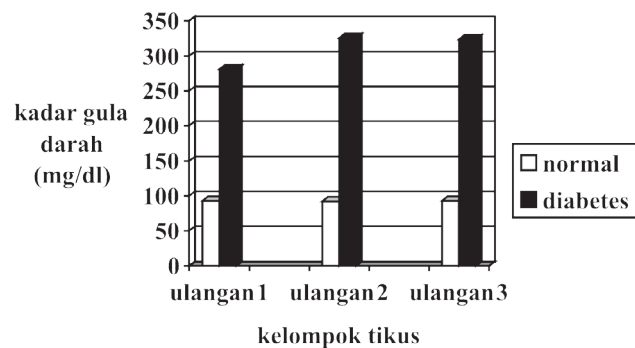
insulin(Lenzen dkk., 1996), sehingga tikus yang diinjeksi aloksan akan menderita diabetes mellitus karena mengalami gangguan sekresi insulin.

Kadar Protein Terlarut Islets

Pancreas islets yang sudah diinkubasi dalam berbagai perlakuan medium diuji kadar protein terlarut sebelum kadar insulin yang disekresikannya dianalisa, seperti terlihat pada Tabel 1. Kadar protein ini digunakan sebagai dasar perhitungan untuk menentukan jumlah antigen pada analisa kadar insulin dengan metode ELISA. Protein insulin yang disekresikan dari pancreas islets merupakan antigen. Kadar protein terlarut dari masing-masing perlakuan berkisar 1,79 – 4,53 ug/ul. Adanya variasi kadar protein ini disebabkan perlakuan yang diberikan memiliki kadar protein terlarut berbeda dan kemampuan menstimulasi sekresi insulin yang kemungkinan berbeda juga. Pada pengujian ELISA digunakan jumlah protein yang sama sebagai antigen pada masing-masing perlakuan, sehingga pada penelitian dilakukan optimasi jumlah antigen yang diperoleh dari perlakuan dengan kadar protein terendah (kontrol pada tikus diabetes/K) dan dari perlakuan dengan kadar protein tertinggi (KTI pada tikus normal). Berdasarkan optimasi ini dapat diketahui jumlah antigen yang tepat untuk memberikan reaksi positif (terjadi reaksi antigen/insulin dari pancreas islets dengan antibodi/insulin monoklonal yang digunakan) pada pengujian ELISA, yaitu pada kadar 30 ug protein/ml.



Gambar 1. Grafik berat badan tikus sesudah perlakuan injeksi aloksan



Gambar 2. Grafik kadar gula darah tikus sesudah perlakuan injeksi aloksan

Tabel 1. Kadar protein terlarut (% wb) *pancreas islet* tikus normal dan diabetes sesudah inkubasi (glukosa + berbagai perlakuan media), sentrifugasi, dan diamati dengan ELISA reader pada panjang gelombang 405 nm.*

Perlakuan	<i>pancreas islet</i> tikus normal	<i>pancreas islet</i> tikus diabetes
Glukosa	2,63b	1,79a
SPTI	3,00bcd	2,64b
GPTI	3,59efg	2,91bc
SPT	3,24cdef	3,10bcde
GPT	4,05g	3,69fg
KTI	4,53h	3,68fg
BBI	3,47def	3,22cdef

* rata-rata dari 2 ulangan percobaan dan 3 ulangan analisis, notasi huruf yang sama pada baris dan kolom menunjukkan tidak ada beda nyata

Kadar protein terlarut yang terdeteksi pada perlakuan medium glukosa/kontrol (R) bisa digunakan sebagai perkiraan

jumlah insulin yang disekresikan oleh pancreas islets. Adanya kadar protein yang terdeteksi pada perlakuan kontrol juga menunjukkan bahwa inkubasi yang dilakukan telah cukup untuk dapat menginduksi sel pankreas untuk menghasilkan hormon dan enzim pankreatik, salah satunya adalah insulin. Tabel 1 menunjukkan bahwa kadar protein terlarut *pancreas islets* dari tikus diabetes lebih rendah dari pada tikus normal pada perlakuan R maupun pada semua perlakuan medium inkubasi. Hal ini bisa digunakan sebagai perkiraan bahwa pada tikus diabetes mengalami gangguan sekresi insulin. Kadar protein terlarut tertinggi adalah perlakuan medium KTI-tikus normal, sedangkan paling rendah adalah perlakuan R-tikus diabetes

Kadar Insulin yang Disekresikan oleh *Pancreas Islets*

Pengujian kadar insulin dilakukan dengan metode ELISA. Pengujian ini diawali dengan optimasi jumlah antigen dan jumlah antibodi yang dapat memberikan reaksi positif. Variasi jumlah antigen yang diuji adalah berkisar 5 sampai 50 ug protein/ml, sedangkan variasi rasio antibodi (insulin monoclonal : buffer) yang digunakan adalah 1:50 sampai 1:3200. Berdasarkan optimasi tersebut diketahui bahwa jumlah antigen yang digunakan 30 ug protein/ml, sedangkan rasio antibodi yang digunakan 1 : 1250 untuk semua perlakuan medium inkubasi. Hasil pengujian kadar insulin terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. kadar insulin (Abs) *pancreas islet* tikus normal dan diabetes sesudah inkubasi (glukosa + berbagai perlakuan media), sentrifugasi, dan diamati dengan ELISA reader pada panjang gelombang 405 nm.*

Perlakuan	<i>pancreas islet</i> tikus normal	<i>pancreas islet</i> tikus diabetes
Glukosa	0,71b	0,56a
SPTI	0,87d	0,84cd
GPTI	1,11f	0,91de
SPT	0,83bcd	0,72bc
GPT	1,02ef	0,88d
KTI	1,06f	0,81bcd
BBI	1,04f	0,83bcd

* rata-rata dari 3 ulangan percobaan, notasi huruf yang sama pada baris dan kolom menunjukkan tidak ada beda nyata

Tabel 2 menunjukkan bahwa kadar insulin semua perlakuan lebih tinggi dibandingkan kontrol. Kadar insulin kontrol pada tikus diabetes lebih rendah dibandingkan normal,

karena terjadi kerusakan sel β pankreas akibat injeksi aloksan yang menurunkan produksi insulin. Perlakuan medium inkubasi berpengaruh terhadap kadar insulin pancreas islets. Pada umumnya protein biji dan kecambah kedelai baik dalam bentuk isolat protein maupun crude TI memiliki kemampuan menstimulasi sekresi insulin pada tikus normal maupun diabetes. Hal ini ditunjukkan dengan perbedaan nilai kadar insulin (Abs) yang nyata dengan kontrol (tanpa penambahan medium protein biji atau kecambah).

Kadar insulin paling tinggi adalah perlakuan GPTI (glukosa + Protein TI kecambah). Pada tikus normal perlakuan tersebut berbeda nyata dengan perlakuan yang lain, sedangkan pada tikus diabetes tidak berbeda nyata dengan perlakuan GPT (glukosa + protein total kecambah) dan SPT (glukosa + protein total biji). Hal ini menunjukkan bahwa protein kecambah kedelai dalam bentuk protein TI maupun protein total memiliki potensi yang lebih baik dalam menstimulasi sekresi insulin dibandingkan protein biji kedelai.

Selama perkecambahan terjadi hidrolisis protein menjadi peptida sederhana dan asam amino bebas. Kandungan peptida sederhana dan asam amino bebas kecambah kemungkinan lebih besar dibandingkan biji kedelai, sehingga dapat meningkatkan kemampuan menstimulasi sekresi insulin. Beberapa penelitian juga telah menunjukkan bahwa pemberian protein hidrolisat maupun asam amino (khususnya leusin, arginin, metionin, dan phenilalanin) dalam pengujian bilogis pada manusia dan hewan percobaan dapat meningkatkan level plasma insulin (Awawdeh dkk., 2006; Calbet dan MacLean, 2002; van Loon dkk., 2000). Semua sel membutuhkan asam amino untuk sintesis protein, sehingga ketersediaan asam amino bebas kemungkinan akan meningkatkan efektivitas sel dalam sintesis protein karena lebih mudah diabsorpsi kedalam sel, termasuk sel β pankreas dalam memproduksi hormon insulin. Hal ini didukung penelitian Calbet dan MacLean, 2002 yang menunjukkan bahwa hidrolisat peptida lebih efektif meningkatkan plasma asam amino dibandingkan protein susu yang merupakan protein kompleks. Peningkatan plasma asam amino akan mempercepat peningkatan plasma insulin.

Peningkatan kadar insulin pada perlakuan GPTI dan SPTI juga disebabkan oleh peranan TI yang terkandung dalam biji maupun kecambah kedelai. Pada penelitian ini terbukti bahwa TI jenis KTI maupun BBI mampu menstimulasi sekresi insulin. TI akan membentuk kompleks dengan enzim tripsin sehingga memacu pankreas untuk memproduksi enzim maupun hormon pankreatik termasuk insulin (Reseland dkk., 1996; Noor dkk., 2000,). Penelitian yang dilakukan oleh Matsumoto dkk (2001) menunjukkan bahwa perlakuan penambahan TI pada *impure pancreas islets* mampu mempertahankan dan meningkatkan islets pada proses penyimpanan dan pemurnian, sehingga tidak terjadi penurunan kandungan insulin. Penelitian ini menunjukkan bahwa TI memiliki peranan dalam merecovery

pankreas untuk dapat memproduksi insulin kembali, sehingga membuka peluang pemanfaatannya untuk mengatasi tidak hanya penyakit diabetes iiddm (*insulin independent diabetes mellitus*) tetapi juga diabetes iddm (*insulin dependent diabetes mellitus*).

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa protein kecambah kedelai memiliki potensi yang lebih baik dibandingkan protein biji kedelai dalam menstimulasi sekresi insulin baik pada tikus normal maupun tikus diabetes. Pada tikus normal, potensi protein TI kecambah dalam menstimulasi sekresi insulin lebih baik dibandingkan protein total kecambah kedelai, sedangkan pada tikus diabetes potensinya sama. Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan dalam pengembangan makanan fungsional bagi penderita diabetes.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada DIRJEN DIKTI yang telah membantu penelitian ini melalui program Hibah Bersaing Tahun 2007.

DAFTAR PUSTAKA

- Artama, W. 1991. Antibodi Monoklonal Teori, Produksi, Karakterisasi dan Penerapan. PAU Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Awadeh, M.S., Titgemeyer, E.C., Schroeder, G.F. dan Gnad, D.P. 2006. Excess amino acid supply improves methionin and leucine utilization by growing steers. *Journal of Animal Science* **84**: 1801-1810.
- Beckman, J.A., Creager, M.A. dan Libby, P. 2002. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* **287**: 2570-2574.
- Bewley, J.D. dan Black, M. 1983. *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination Vol 1*. Springer-verlag, Berlin.
- Boisen, S. 1989. Comparative studies on trypsin inhibitors in legumes and cereal. *Dalam*: Huisman, J., van der Poel, T.F.B. dan Liener, I.E. (Ed.). *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seed*. Pudoc, Wageningen.
- Burtis, G., Davis, J. dan Martin, S. 1988. *Applied Nutrition and Diet Therapy*. W.B. Saunders Co., Philadelphia.
- Calbet, J.A.L. dan MacLean, D.A. 2002. Plasma glucagons and insulin responses depend on the rate of apperance of amino acids after ingestion of different protein solutions in human. *Journal of Nutrition* **132**: 2174-2182.
- Chiou, R.Y., Ku, K.L. dan Chen, W.L. 1997. Compositional characterization of peanut kernels after subjection to various germination times. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **45**: 3060-3064.
- Frozier, H., Jorgensen, T.M.R., Rosendal, A., Tonsgaard, M.C. dan Barkholt, V. 1997. Antinutritional and allergenic proteins *dalam Antinutrient and phytochemical. Dalam*: Shahidi, F. (Ed). *Food*. American Chemical Society, Washington DC.
- Gomez, K.A. dan Gomez, A.A. 1995. *Prosedur Statistik untuk Penelitian Pertanian*, (Penerjemah: Endang, S. dan Justika S.B.). UI Press, Jakarta.
- Hurley, C., Galibois, I. dan Jacques, H. 1995. Fasting and postprandial lipid and glucose metabolisms are modulated by dietary proteins and carbohydrates: Role of plasma insulin concentration. *Journal of Nutrition and Biochemistry* **6**: 540-546.
- Iritani, N., Hosomi, H., Fukuda, H., Teda, K. dan Ikeda, H. 1996. Soybean protein suppresses hepatic lipogenic enzyme gene expression in wistar fatty rats. *Journal of Nutrition* **126**: 380-388.
- Iritani, N., Susimoto, T., Fukuda, H., Komiyama, M. dan Ikeda, H. 1997. Dietary soybean protein increases insulin receptor gene expression in wistar fatty rats when dietary polyunsaturated fatty acid level is low. *Journal of Nutrition* **126**: 1077-1083.
- Kahn, S.E., McCulloch, D.K. dan Porte, D. 1997. Insulin secretion in the normal and diabetic human. *Dalam*: Albert, K.G.M.M (Ed.), *International Textbook of Diabetes Mellitus*. John Wiley and Son Ltd., Washington.
- Kanetro, B. dan Wariyah 2002. Perubahan sifat kimia dan aktivitas lipoksigenase kacang-kacangan selama perkecambahan. *Buletin Agroindustri* **11**: 34-43.
- Kaplan, A. dan Szabo, L.L. 1989. *Clinical Chemistry: Interpretation and Techniques*. Lea & Febiger, Philadelphia.
- King, R.D. dan Puwastien, P. 1987. Effect of germination on proximate composition and nutritional quality of winged bean. *Journal of Food Science* **52**: 106-108.
- Krissetiana, H. 2000. *In Vitro Bioassay Pancreas Tikus yang Dibuat Diabetic dalam Berbagai Medium*. Thesis S-2. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

- Lenzen, T., Tiedge, M., Jorns, A. dan Munday, R. 1996. *Alloxan Derivates as a Tool for Elucidation of the Mechanism of the Diabetogenic Action of Alloxan. Lesson from Animal Diabetes VI*. Shaffir. USA.
- Newsholme, P., Brennan, L. dan Bender, K. 2006. Amino acid metabolism, β -cell function, and diabetes. *Diabetes* **55**: S39-S47.
- Newsholme, P., Brennan, L. dan Bender, K. 2007. Amino acid metabolism, insulin secretion, and diabetes. *Diabetes* **55**: S39-S47.
- Nnanna, L.A. dan Phillips, R.D. 1988. Changes in oligo-saccharides content, enzyme activities, and dry matter during controlled germination of cowpeas. *Journal of Food Science* **53**: 1782-1786.
- Noor, Z., Marsono, Y. dan Astuti, M. 2000. Sifat hipoglisemik komponen kedelai. Prosiding Seminar Nasional Industri Pangan Vol II PATPI, Surabaya.
- Reeves, P.G., Neilson, F.H. dan Fahey, G.C. 1993. AIN-93. Purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Formulation of the AIN-76 A Rodent Diet. *Journal of Nutrition* **123**: 1939-1951.
- Reseland, J.E., Holm, H., Jacobsen, M.B., Jenssen, T.G. dan Hanssen, L.E. 1996. Proteinase inhibitor induced selective stimulation of human trypsin and chymotrypsin secretion. *Journal of Nutrition* **126**: 634-642.
- Retnaningsih, C., Noor, Z. dan Marsono, Y. 2001. Sifat hipoglisemik pakan tinggi protein kedelai pada model diabetik induksi aloksan. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* **12**: 141-146.
- Saini, H.S., 1989. Activity and thermal inactivation of protease inhibitors in grain legumes in Recent advances of research in antinutritional factors. *Dalam: Huisman, J., van der Poel, T.F.B. dan Liener, I.E. (Ed). Legume Seeds*. Pudoc, Wageningen.
- Su, G. dan Chang, K.C. 2002. Trypsin inhibitor activity in vitro digestibility and sensory quality of meat-like yuba products as affected by processing. *Journal of Food Science* **67**: 1260-1266.
- Suzuki, T dan Tobe, T. 1984. Effect of trypsin inhibitor on the remnant pancreas after 85 percent pancreatectomy in rats. *Journal of Surgery Today* **14**: 420-431
- Tse, E.O., Gregoire, F.M., Magrum, L.J., Johnson, P.R. dan Stern, J.S. 1995. A low protein diet lowers islet insulin secretion but does not alter hyperinsulinemia in obese Zucker rats. *Journal of Nutrition* **125**: 1923-1929
- Van Loon, L.J.C., Kruijshoop, M., Verhagen, H., Sarris, W.H.M. dan Wagenmakers, A.J.M. 2000. Ingestion of protein hydrolysate and amino acid-carbohydrate mixture increases postexercise plasma insulin response in men. *Journal of Nutrition* **130**: 2508-2513.
- Zhang, N. dan Jones, B.L. 1999. Polymorphism of aspartic proteinases in resting and germinating barley seeds. *Cereal Chemistry* **76**: 134-144.