

**AKTIVITAS *SUPEROXYDE DISMUTASE* (SOD) TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) WISTAR
DIABETES SETELAH PEMBERIAN EKSTRAK KULIT BUAH DELIMA MERAH
(*Punica granatum L.*)**

Intan Fitri Aprila¹, Dasrul², Al Azhar³

¹Program Studi Kesehatan Masyarakat Veteriner Universitas Syiah Kuala,

²Laboratorium Reproduksi Universitas Syiah Kuala

³Laboratorium Biokimia Universitas Syiah Kuala

Email: intan_aprilya@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh pemberian ekstrak kulit buah delima merah (*Punica granatum L.*) terhadap aktivitas enzim *Superoxide Dismutase* (SOD) pada jaringan testes tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar DM akibat induksi aloksan. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik jenis *Postest Only Control Group Design*, dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola satu arah dengan lima perlakuan. Kelompok 1 sebagai kontrol negatif (KN) yaitu tikus yang tidak diberi apapun. Kelompok 2 sebagai kontrol positif (KP) yaitu tikus yang diinduksi aloksan 120 mg/kgBB. Kelompok 3 sebagai perlakuan 1 (P1) yaitu tikus yang diinduksi aloksan 120 mg/kgBB dan diberi 100 mg/kgbb/hari ekstrak kulit buah delima. Kelompok 4 sebagai perlakuan 2 (P2) yaitu tikus yang diinduksi aloksan 120 mg/kgBB dan diberi 200 mg/kgbb/hari ekstrak kulit delima. Masing-masing kelompok diulangi sebanyak 5 kali. Rata-rata aktivitas SOD jaringan testes pada kelompok KN ($2,60 \pm 0,72^a$) tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan aktivitas SOD jaringan testes pada kelompok KP₂ ($0,86 \pm 0,32^b$), namun secara nyata lebih tinggi ($P < 0,05$) daripada aktivitas SOD jaringan testes pada kelompok KP ($0,86 \pm 0,32^b$) dan KP₁ ($1,84 \pm 0,62^c$). Aktivitas enzim SOD jaringan testes pada kelompok KP₂ lebih tinggi secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan aktivitas enzim SOD jaringan testes dengan KP dan KP₁. Hasil ini membuktikan bahwa kondisi DM yang disebabkan induksi aloksan dapat menurunkan aktivitas enzim SOD testes tikus putih, sedangkan pemberian ekstrak kulit buah delima merah dapat meningkatkan kembali aktivitas enzim SOD jaringan testes pada tikus yang diinduksi aloksan tersebut.

Kata Kunci: SOD, DM, Delima Merah

PENDAHULUAN

Diabetes melitus (DM) adalah gangguan metabolik kronis yang ditandai dengan hiperglikemia, salah satu penanda terjadinya kelainan metabolisme karbohidrat, lipid, dan protein. Hiperglikemia mengakibatkan peningkatan berlebihan radikal bebas yang bersifat toksik di dalam sel (Chaiyasut *et al.*, 2011).

Reactive oxygen spesies (ROS) merupakan radikal bebas yang sangat tidak stabil sehingga cepat bereaksi dengan molekul lain di sekitarnya (Suryohudoyo, 2000). Peningkatan berlebihan ROS dan penurunan daya pertahanan tubuh melalui sistem antioksidan menyebabkan ketidakseimbangan yang disebut stres oksidatif, yaitu lebih tingginya produksi ROS daripada

kapasitas total antioksidan dalam tubuh. Pada keadaan stres oksidatif aktivitas enzim antioksidan meningkat untuk menetralkan ROS sehingga jumlahnya dalam tubuh menjadi berkurang (Stiphanuk, 2000). Telah terbukti bahwa pada tikus putih yang mengalami stres oksidatif akibat hiperglikemia terjadi penurunan nyata kadar enzim SOD dalam serum, hati, testes dan jantung (Mohajeri, 2013).

Semakin banyak dan lama tubuh terpapar ROS, semakin besar kemungkinan terjadi oksidasi terutama pada membran sel (Agarwal *et al.*, 2006). Hal ini berakibat terjadinya kerusakan membran oksidatif, modifikasi lipid, mutasi *deoxyribonucleic acid* (DNA), dan denaturasi protein pada berbagai jaringan.

Hiperglikemia kronis diabetes berhubungan dengan kerusakan mata, ginjal, saraf, jantung, dan pembuluh darah. Kerusakan akibat stres oksidatif pada pankreas dapat mengakibatkan fungsi organ ini terganggu sehingga tidak mampu memproduksi hormon insulin yang diperlukan pada proses masuknya glukosa dari sirkulasi ke dalam sel sehingga kadar gula darah meningkat (American Diabetes Assosation, 2012). Upaya untuk mengurangi efek merugikan radikal bebas terhadap sel dan jaringan tubuh dapat dilakukan dengan cara asupan antioksidan eksogen seperti senyawa flavonoid, keratinoid, vitamin C, dan vitamin E yang dapat ditemukan pada sayuran dan buah-buahan (Hadi, 2013). Delima merah (*Punica granatum L.*) adalah salah satu buah yang mengandung senyawa bersifat antioksidan seperti polifenol, flavonoid dan antosianin. Menurut penelitian Elfalleh *et al.* (2012), buah delima memiliki aktifitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan biji dan daunnya. Kulit buah delima merah telah terbukti mengandung antosianin 3 kali lebih tinggi daripada daun dan bijinya. Hasil penelitian Palmar dan Kar (2007) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak buah delima merah 200 miligram per kilogram berat badan per hari (mg/kgBB/hari) selama 14 hari terbukti menurunkan kadar glukosa dan SOD darah secara bermakna pada tikus putih diabetes akibat diinduksi aloksan.

Meskipun telah banyak penelitian yang menunjukkan khasiat ekstrak kulit buah delima untuk hiperglikemia, kenyataannya masih sedikit penelitian yang membuktikan pengaruh ekstrak kulit buah delima (*Punica granatum L.*) terhadap aktivitas enzim SOD di dalam serum dan fungsi organ reproduksi jantan (testes) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar diabetes yang diinduksi aloksan. Oleh karena itu penelitian tentang manfaat kandungan ekstrak delima perlu terus dilakukan.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik jenis *Posttest Only Control Group Design*, dengan menggunakan

rancangan acak lengkap (RAL) pola satu arah dengan 5 perlakuan. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar sebanyak 24 ekor yang berumur 3-4 bulan dengan berat badan 150-200 gram akan diamati selama seminggu untuk proses aklimasi hewan percobaan atau proses adaptasi dengan lingkungan. Pada tahap ini semua tikus putih diberi ransum standar T79-4. Selama proses adaptasi, berat badan dan aktivitas hewan coba terus diamati dan dicatat. Hal tersebut dilakukan agar hewan coba dapat bergerak aktif dan berat badannya tidak ada yang kurang dari 150 gram selama dan setelah proses adaptasi sehingga tidak ada sampel yang dikeluarkan. Dibawah ini merupakan komposisi ransum yang akan diberikan pada tikus putih pada

Kelompok 1 sebagai kontrol negatif (KN) yaitu tikus yang tidak diberi apapun. Kelompok 2 sebagai kontrol positif (KP) yaitu tikus yang diinduksi aloksan 120 mg/kgBB. Kelompok 3 sebagai perlakuan 1 (KP¹) yaitu tikus yang diinduksi aloksan 120 mg/kgBB dan diberi 100 mg/kgbb/hari ekstrak kulit buah delima. Kelompok 4 sebagai perlakuan 2 (KP²) yaitu tikus yang diinduksi aloksan 120 mg/kgBB dan diberi 200 mg/kgbb/hari ekstrak kulit BUAH delima. Masing-masing kelompok diulangi sebanyak 5 kali.

Sampel pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar yang diperoleh dari Laboratorium Hewan Coba FKH UNSYIAH dan belum pernah diberikan perlakuan apapun. Tikus diadaptasikan pada kandang percobaan selama 7 hari diberi pakan pelet serta diberi air minum isi ulang *ad libitum*.

Uji herbarium terhadap buah delima merah dilakukan di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) UNSYIAH. Uji herbarium dilakukan untuk memastikan taksonomi dari delima merah (*Punica granatum L.*).

Uji kuantitatif terhadap ekstrak delima merah dengan pereaksi umum untuk alkaloid (pereaksi mayer), flavonoid (pereaksi Mg/HCl), terpenoid/steroid (pereaksi Liebermen-

Burchard), fenol/tenin (pereaksi FeCl₃) dan saponin (reaksi busa dalam air).

Pada akhir masa adaptasi masing-masing tikus ditimbang untuk mengetahui beratnya. Kemudian tikus-tikus tersebut dibagi dalam empat kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan 1 sebagai kontrol negatif (KN) diberi plasebo, sedangkan untuk kelompok perlakuan 2, 3, dan 4 diberikan suntikan aloksan dengan dosis 125mg/kgbb/hari dosis tunggal secara intra peritoneal. Setelah hari ke 7, semua tikus diambil darahnya melalui vena caudalis untuk pemeriksaan kadar glukosa dalam darah. Tikus yang memiliki kadar glukosa darah lebih dari 120 mg/dl digunakan sebagai sampel penelitian. Selanjutnya pada kelompok 3 diberi ekstrak delima merah 100 mg/kgbb/hr dan kelompok 4 diberi ekstrak delima merah 200 mg/kgbb/hr. Pemberian ekstrak kulit buah delima merah dilakukan secara oral menggunakan sonde lambung selama 30 hari. Setelah pemberian perlakuan selama 30 hari, semua tikus perlakuan

diambil darahnya melalui vena di ekor untuk pemeriksaan kadar glukosa setelah perlakuan. Selanjutnya tikus-tikus tersebut dieutanasi dan dinekropsi testis dengan cara pemberian anestesi inhalasi menggunakan kloroform dengan konsentrasi 10%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pemeriksaan aktivitas enzim SOD jaringan testes tikus pada berbagai kelompok perlakuan pemberian ekstrak kulit buah delima merah (KN, KP, KP₁ dan KP₂) dapat dilihat pada Tabel 4. Hasil uji statistik *one way analysis of variance* (ANOVA) terhadap aktivitas enzim SOD jaringan testes menunjukkan ada perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) diantara kelompok perlakuan tersebut.

Tabel 4. Rata-rata (\pm SD) aktivitas enzim SOD jaringan testis tikus putih berbagai kelompok perlakuan

Perlakuan	Aktivitas enzim SOD ($\mu\text{g} / \text{mg}$)
KN	2,60 \pm 0,72 ^a
KP	0,86 \pm 0,32 ^b
KP ₁	1,84 \pm 0,62 ^c
KP ₂	2,97 \pm 1,15 ^a

Keterangan: Superskrip huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$). KN=Kontrol negatif adalah tikus non-DM, KP=Kontrol positif adalah tikus DM, KP₁=Tikus DM yang diberikan ekstrak kulit buah delima merah 100mg/kgBB/hari, dan KP₂=Tikus DM yang diberikan ekstrak kulit buah delima merah 200mg/kgBB/hari.

Aktivitas SOD jaringan testes pada kelompok kontrol negatif (KN) mengalami penurunan pada kelompok perlakuan tikus DM yang tidak diberikan ekstrak kulit buah delima merah (KP), kemudian meningkat kembali pada kelompok tikus DM yang diberikan ekstrak

kulit buah delima merah 100 mg/kgBB/hari (KP₁) dan 200 mg/kgBB/hari (KP₂).

Hasil analisis lanjutan dengan uji Duncan menunjukkan rata-rata aktivitas SOD jaringan testes pada kelompok KN tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan aktivitas SOD jaringan testes pada kelompok KP₂, namun secara nyata lebih

tinggi ($P < 0,05$) daripada aktivitas SOD jaringan testes pada kelompok KP dan KP₁. Aktivitas enzim SOD jaringan testes pada kelompok KP₂ lebih tinggi secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan aktivitas enzim SOD jaringan testes dengan KP dan KP₁. Hasil ini membuktikan bahwa kondisi DM yang disebabkan induksi aloksan dapat menurunkan aktivitas enzim SOD testes tikus putih, sedangkan pemberian ekstrak kulit buah delima merah dapat meningkatkan kembali aktivitas enzim SOD jaringan testes pada tikus yang diinduksi aloksan tersebut.

Hasil yang ditemukan dalam penelitian ini sejalan dengan hasil yang diperoleh beberapa penelitian sebelumnya bahwa pemberian antioksidan eksogen dapat meningkatkan status antioksidan endogen seperti enzim SOD, GPx dan katalase secara signifikan pada tikus (Al-Moraie *et al.*, 2013). Sulistyoningrum *et al.* (2012) mengemukakan bahwa menurunnya aktivitas SOD pada jaringan testes kelompok tikus DM yang diinduksi aloksan kemungkinan terkait dengan adanya peningkatan produksi ROS dalam darah akibat gangguan metabolisme glukosa. Tikus yang disuntikkan aloksan akan mengalami kerusakan sel β pankreas sehingga produksi insulin menurun dan tidak mampu mengarahkan pemasukan glukosa ke dalam sel-sel jaringan, dan terjadi hiperglikemia. Pada kondisi hiperglikemia terjadi peningkatan aktivitas enzim xantin oksidase yang bekerja merubah xantin menjadi asam urat, senyawa oksidan alami endogen. Pada saat yang sama, sel berusaha memenuhi kebutuhan akan glukosa dengan menggunakan asam lemak dan senyawa non-karbohidrat melalui proses glukoneogenesis. Penggunaan asam lemak dan protein ini menyebabkan terbentuknya amonium dan benda keton, produk samping yang menyebabkan peningkatan keasaman cairan tubuh (asidosis metabolik). Kondisi ini menyebabkan terjadinya peningkatan stres oksidatif yang kemudian mengganggu pembentukan protein, termasuk SOD sehingga aktivitasnya menurun (Robertson *et al.*, 2004).

Pada pada kondisi hiperglikemia terjadi peningkatan aktivitas xantin oksidoreduktase, penghasil utama ROS, pada semua sel tubuh. Enzim SOD, sebagai antioksidan endogen garis pertahanan pertama, segera bereaksi dengan ROS untuk menghambat terjadinya stres oksidatif. Pada kondisi jumlah ROS yang tinggi, diperlukan antioksidan tubuh yang tinggi untuk menetralsirnya. Hal ini menyebabkan penurunan jumlah antioksidan endogen yang tersisa dalam jaringan testes. Akibatnya terjadi peningkatan produksi ROS yang diikuti penurunan jumlah antioksidan endogen dalam serum dan jaringan testes, salah satunya enzim SOD (Scheuer *et al.*, 2000).

Terjadinya peningkatan aktivitas SOD jaringan testes pada kelompok tikus putih diabetes yang diinduksi aloksan setelah pemberian ekstrak kulit buah delima merah kemungkinan disebabkan karena ekstrak kulit buah delima merah mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder yang bersifat antioksidan, antiinflamasi, dan membran protektor. Kehadiran senyawa-senyawa ini menyebabkan terpenuhinya kebutuhan senyawa antioksidan untuk melawan stres oksidatif dan memutus reaksi berantai radikal bebas sehingga melindungi sel-sel dari kerusakan akibat stres oksidatif. Akibatnya SOD dapat disintesis dalam jumlah mencukupi dan kemudian aktif bekerja meredam radikal bebas (Prajapat dan Bhattacharya, 2017).

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Maryanto pada tahun 2013 keadaan stres oksidatif bisa dikendalikan dengan pemberian antioksidan enzimatis dan non enzimatis. Antioksidan enzimatis terdiri dari superoksida dismutase (SOD), glutathion peroksidase dan katalase. Kulit buah delima mengandung fitokimia dan kaya akan senyawa yang berfungsi sebagai antioksidan nonenzimatis yaitu polifenol, tanin dan antosianin.

Polifenol yang terkandung dalam ekstrak kulit buah delima merah mampu mengurangi stres oksidatif dengan cara mendonorkan atom hidrogen dari kelompok aromatik hidroksil (-

OH) polifenol untuk mengikat radikal bebas dan membuangnya dari dalam tubuh melalui sistem ekskresi. Hal ini mencegah terjadinya reaksi berantai perubahan superoksida menjadi hidrogen superoksida (Barbosa, 2007). Peran polifenol sebagai antioksidan diduga mampu melindungi sel β pankreas dari efek toksik radikal bebas yang diproduksi dibawah kondisi hiperglikemia kronis. Menurut Kaneto *et al.*, (1999), pemberian antioksidan mampu meningkatkan massa sel β pankreas dan menjaga kandungan insulin di dalamnya.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis dan pembahasan yang telah diuraikan dapat disimpulkan bahwa:

1. Pemberian ekstrak kulit buah delima merah dapat meningkatkan aktivitas superoksida dismutase jaringan testes tikus putih (*Rattus norvegicus*) diabetes melitus yang diinduksi aloksan.
2. Pemberian ekstrak kulit buah delima merah dapat meningkatkan kualitas

DAFTAR PUSTAKA

- ADA. 2012. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. American Diabetes Assosation. 35(1):64-68.
- Agarwal, A., Sharma, R., Nakella, K., Thomas, A., Alvarez, J., Sikka, S. 2006. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil Steril* 86(4): 878-885.
- Al-Moraie, M.M.D., R.A. Arafat, and A.A. AL-Rasheedi. 2013. Effect of Pomegranate Juice on Lipid Profile and Antioxidant Enzymes in Hypercholesterolemic Rats. *Life Sci. J.* 10(3):2717-2728.
- Barbosa, D.S., 2007. Green Tea *polyphenolic* compounds and human health. *J Consumer Protect Food Safety.* 2: 407-413.
- Chaiyasut, C., Kusirisin, W., Lailerd, N., Lertrakarnoon, P., Suttajit, M., danSrichairatanakool, S. 2011. Effect of phenolic compounds of fermented thai indigenous plants on oxidative stress in streptozotosin-induced diabetic rats. *Research Article.* 15(2):118-123.
- , W., Hannachi, H., Tlili, N., Yahia, Y., Nasri, N., and Ferchichi, A. 2012. Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. *J Med Plants Res.* 6: 4724-4730.
- Hadi, M.A. 2013. Protective effect of plants extract mixture on sperm abnormalities, testicular and epididymal tissues in diabetic male rats. *J Nat Sci Res.* 3: 30.
- Kaneto, H., Y. Kajimoto, J. Miyagawa, T. Matsuoka, Y. Fujitani, Y. Umayahara, T. Hanafusa, Y. Matsuzawa, Y. Yamasaki, and M. Hori, 1999, Beneficial Effects of Antioxidants in Diabetes: Possible Protection of Pancreatic β -Cells Against Glucose Toxicity, *Diabetes*, 48: 2398-2406.
- Mohajeri, D. 2013. Preventive effects of turnip (*Brassica rapa* L.) on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Life Sci J.*10(1): 1165-1170.
- Parmar, H.S., and Kar, A. 2008. Medicinal values of fruit peels from *Citrus sinensis*,

Antosianin dari kulit buah delima merah bekerja sebagai antioksidan dengan cara memutus rantai oksidasi lipid peroksida sehingga diperkirakan dapat melindungi sel β pankreas dari efek merugikan stres oksidatif. Akibatnya pembentukan malondialdehid (MDA) sebagai penanda stres oksidatif menurun dan aktivitas SOD serta enzim-enzim antioksidan endogen lain pada tikus diabetes meningkat (Sabuluntika dan Ayustaningwarno, 2013).

spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) diabetes melitus yang diinduksi aloksan.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang enzim kolesterol MDA endogen yang lain dengan daya fertilitas dan hubungan SOD dengan kualitas spermatozoa memperhatikan untuk menaikkan dosis pada penelitian selanjutnya.

- Punica granatum*, and *Musa paradisiaca* with respect to alterations in tissue lipid peroxidation and serum concentration of glucose, insulin, and thyroid hormones. *J. Med. Food*. 11: 376-381.
- Prajapat, Rajneesh. Ijen Bhattacharya. 2017. Effect of Vitamin E and C supplementation on oxidative stress in diabetic patients. *Advances in Diabetes and Metabolism*, 5: 39-42.
- Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V. 2004. B-cell glucose Reza A, Mangoli E, Nahangi H, Anvari M, Pouretezari M, Halvaei I. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* Vitamin C attenuates detrimental effects of diabetes mellitus on sperm parameters, chromatin quality and rate of apoptosis in mice. *Eur J Obstet Gynecol*. 2014;181:32-36. doi:10.1016/j.ejogrb.2014.07.007.
- Sabuluntika, N., F. Ayustaningwarno. 2013. Kadar β -Karoten, Antosianin, Isoflavon, dan Aktivitas Antioksidan Snack Bar Ubi Jalar Kedelai Hitam Sebagai Alternatif Makanan Selingan Penderita Diabetes Melitus Tipe 2. 2 (4): 689-695.
- Scheuer, H., W. Gwinner, J. Hohbach, E.F. Grone, R.P. Brandes, and E. Maile. 2000. Oxidant Stress in Hyperlipidemia-Induced Renal Damage. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 278(1):64-74.
- Stiphanuk, M.H. 2000. *Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition*. Amazon. New York.
- Sulistyoningrum, E., Setiawati, H. Nindyastuti, dan A.N. Putra. 2012. Infusa Daging Buah Mahkota Naga Memperbaiki Kerusakan Testis dan Parameter Sperma Tikus Diabetik. *Sains Medika*. 4(2):115-123.
- Suryohudoyo, P. 2000. *Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekuler*. CV. Infomedika, Jakarta.