

Peningkatan Kadar *Glucagon Like Peptide-1*(GLP-1) Pada Tikus Model Diabetes setelah Pemberian diit *Resistant Starch Tipe 3 Pati Singkong (Manihot Esculanta Crantz)*

Increased Plasma GLP-1 Levels after Resistant Starch Type 3 From Cassava Starch (Manihot Esculanta Crantz) Diet on Diabetic Rat

Elly Nurus Sakinah

Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Jember
Jalan Kalimantan No.37, Jember, Indonesia, 68121
e-mail korespondensi: ellyns.fk@unej.ac.id

Abstrak

Diabetes Melitus (DM) merupakan penyakit akibat berkurangnya produksi insulin atau akibat tubuh tidak mampu menggunakan insulin secara efektif, sehingga terjadi peningkatan konsentrasi gula dalam darah (hiperglikemia). Prevalensi DM diperkirakan mencapai 7,7% atau 439 juta orang pada tahun 2030, dan Indonesia menempati urutan keempat setelah Amerika, Cina dan India. Salah satu upaya untuk memperbaiki kadar gula darah dan kadar insulin adalah melalui stimulasi efek *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek pati tahan cerna tipe 3 (RS3) pati singkong dalam meningkatkan kadar GLP-1. Penelitian ini merupakan *true experimental* menggunakan hewan coba tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) sebagai model diabetes dengan memberi diet tinggi lemak dan injeksi streptozotocin (STZ) dosis rendah. Hewan coba dikelompokkan menjadi 4 kelompok secara acak (1) kontrol negatif dan (2) diet pati singkong, (3) diet RS3 pati singkong, (4) kontrol positif. Dilakukan pemeriksaan kadar gula darah pada awal penelitian dan setelah pemberian induksi STZ untuk menentukan kondisi diabetes (gula darah ≥ 200 mg/dL). perlakuan diberikan selama 4 minggu. Pada akhir penelitian, tikus diambil darahnya untuk dilakukan pemeriksaan kadar glukosa darah dan kadar GLP1 menggunakan ELISA. Analisis statistik menunjukkan penurunan bermakna kadar gula darah ($p < 0.05$) dan peningkatan bermakna kadar GLP-1 setelah pemberian RS3 pati singkong. Hal ini menunjukkan bahwa RS3 pati singkong berpotensi sebagai terapi nutrisi pada penyakit diabetes mellitus.

Kata kunci : RS3 pati singkong, GLP-1, Gula darah, Diabetes Mellitus

Abstract

Diabetes mellitus (DM) occur when human body is unable to produce enough insulin and/or unable to use insulin effectively, resulting in an increase of blood sugar levels (hyperglycemia). Indonesia has ranks fourth after United States, China and India in the prevalence of DM. Controlling blood sugar and insulin levels can be done through the stimulation effect of *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1). The goal of this study was to determine the effects of resistant starch type 3 (RS3) from cassava starch in increasing plasma GLP-1 levels. This reasearch use male mouse (*Rattus norvegicus*) as a diabetic model by providing a high-fat diet (HFD) for one mounth than combine with intraoperitonal injection of low dose streptozotocin (STZ). The mouse then grouped into 4 groups randomly (1) normal or negative control, (2) cassava starch diet, (3) RS3 diet, (4) positive control. Blood sugar levels were measured before and after STZ injection to determine the diabetic conditions (blood sugar ≥ 200 mg /dL). After 4 weeks of dietary administration blood sugar and plasma GLP-1 levels were examined using ELISA. Statistical analysis showed decreased in blood sugar levels and increased in plasma GLP-1 levels after one mounth of RS3 diet. This research shows that RS3 from cassava starch has a potential role as a nutritional therapy on diabetes mellitus condition.

Keywords: Resistant starch type 3, cassava starch, GLP-1, Blood Sugar, Diabetes Mellitus

Pendahuluan

Diabetes Melitus (DM) merupakan penyakit yang terjadi akibat berkurangnya produksi insulin atau akibat tubuh tidak mampu menggunakan insulin secara efektif, sehingga terjadi peningkatan konsentrasi gula dalam darah (hiperglikemia). Prevalensi DM pada tahun 2030 mencapai 7,7% atau 439 juta orang pada tahun 2030, dan Indonesia menempati urutan keempat setelah Amerika, Cina dan India (IDF, 2015). Salah satu penyebab komplikasi diabetes adalah pola konsumsi yang tidak seimbang dan asupan karbohidrat serta lemak berlebih. Penelitian membuktikan bahwa selain dengan obat agen hipoglikemik, salah satu upaya untuk memperbaiki kadar glukosa darah dan kadar insulin adalah melalui stimulasi efek Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) (Leon, 2006).

GLP-1 merupakan hormon peptida yang terdapat didalam saluran cerna yang dapat menstimulasi sekresi insulin dari kelenjar pankreas, memiliki efek proteksi terhadap sel β -pankreas, serta menghambat sekresi hormon glukagon sehingga dapat mengontrol kadar glukosa darah (Holst, 2007). Pada penderita DM tipe 2 terjadi penurunan sekresi GLP-1 dibanding dengan orang sehat. Sekresi GLP-1 dapat distimulasi segera setelah mengkonsumsi makanan yang mengandung karbohidrat dan protein. Produksi GLP-1 juga dapat ditingkatkan melalui peningkatan jumlah asam lemak rantai pendek (*short chain fatty acid/SCFA*) yang merupakan hasil fermentasi komponen karbohidrat tanaman yang tidak dapat dicerna atau Resistant Starch (RS) (Keenan et al, 2015).

RS adalah bagian dari pati yang tahan terhadap hidrolisis enzim pencernaan amilase sehingga sulit dicerna di dalam usus halus. Di dalam kolon, fraksi pati ini kemudian difermentasi oleh mikroflora usus sehingga menghasilkan asam lemak rantai pendek (Herawati, 2011). Penelitian menunjukkan bahwa konsumsi makanan yang mengandung RS dapat memperbaiki metabolisme glukosa dan resistensi insulin (Bodinham et al, 2014; Keenan et al, 2015). RS tipe 3 (terbentuk karena proses pengolahan dan pendinginan) dari kacang-kacangan dapat menjadi salah satu modalitas pencegahan diabetes meliitus. RS tipe 4 (dihasilkan dari proses modifikasi secara kimiawi) menghambat terjadinya resistansi insulin dan menurunkan postprandial glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP; incretin) pada tikus diabetes (Tachibe et al, 2009; Shimotoyodome et al, 2014). Konsumsi RS meningkatkan ekspresi gen glucagon like-peptide-1 (GLP-1) pada usus dan plasma, serta meningkatkan toleransi glukosa pada tikus diabetes yang diinduksi dengan streptozotocin (Shimada, 2009).

Suatu makanan dapat dijadikan sebagai sumber RS jika makanan tersebut mempunyai kandungan pati terutama amilosa yang cukup tinggi. Singkong memiliki kadar pati 86.21% dan kadar amilosa 24.5-31%. Sebagai perbandingan, Beberapa umbi seperti ganyong mempunyai kadar pati 90% dan amilosa 31.3-38.9%. Kentang mempunyai kadar pati 65.80% dan kadar amilosa 25%. Kimpul mempunyai kadar pati 85.68% dan kadar amilosa 21.21%. Singkong memiliki kandungan pati dengan indeks glisemik lebih rendah (48%) dibandingkan dengan jagung (54%), barley (61%) dan quinoa (70%) (Hidayat, 2006). RS tipe 3 (terbentuk karena proses pengolahan dan pendinginan) dapat menjadi salah satu modalitas pencegahan diabetes mellitus.

Metode Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah *quasy experimental post-test only control group design*. Penelitian dilakukan pada bulan Februari-April 2017 di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Populasi penelitian ini adalah tikus putih jantan *strain* Wistar. 16 ekor tikus wistar jantan, dibagi menjadi empat kelompok yaitu KN, K- (DM), P1 (DM + diet pati singkong), dan P2 (DM + RS Tipe 3). Kriteria inklusi adalah tikus dengan berat badan (BB) 150-200 gram, tikus jantan, umur 2-3 bulan, sehat fisik ditandai dengan nafsu makan baik dan berperilaku baik dan normal. Kriteria eksklusi pada penelitian ini adalah tikus yang selama penelitian tidak mau makan, diare, dan mati sebelum maupun selama penelitian berlangsung. Perhitungan menggunakan aplikasi perhitungan sampel G Power versi 3.1 dan didapatkan jumlah sampel 16 ekor dengan 4 ekor di tiap kelompok.

Pati singkong kuning diekstraksi patinya dengan cara: umbi dikupas, dicuci, dihancurkan, diekstraksi dengan air (umbi:air = 1:4), disaring, diendapkan selama 24 jam, dan dikeringkan dengan oven (suhu 40°C), dan terakhir disaring dengan saringan 100 mesh. Pembentukan RS Tipe 3 dilakukan dengan metode *autoclaving-cooling* yang dikemukakan Lehmann *et al.* (2002). Sebanyak 20 gram pati singkong kuning dalam labu Erlenmeyer 300 ml yang disuspensikan dalam akuades (20% b/b). Sampel kemudian dipanaskan pada suhu tinggi dalam autoklaf 121°C selama 1 jam. Pasta pati didinginkan pada suhu ruangan selama 2 jam, dibekukan pada suhu -20°C, terakhir dikeringkan di dalam oven bersuhu 60°C. RS Tipe 3 yang terbentuk kemudian digiling dan diayak 60 mesh.

Pembuatan tikus model DMT2 yaitu pemberian diet tinggi lemak / (HFD) dengan pemberian kuning telur

bebek 0,01 mg/kgBB (Ariantari, 2010). Empat minggu setelah pemberian diet, tikus dipuaskan semalam, hewan kemudian diinjeksikan STZ dengan dosis rendah (35mg/kgBB dalam 0.1M, pH 4.5) secara intraperitoneal (Srinivasan, 2005). Kemudian ditunggu 1 minggu dan diukur kadar GDP untuk mengonfirmasi keadaan diabetes pada hewan coba. Hewan coba diberikan diet sesuai kelompok dan air minum secara *ad libitum* selama 4 minggu. Pada akhir penelitian, tikus diambil darahnya untuk dilakukan pemeriksaan kadar glukosa darah dan kadar GLP1 menggunakan ELISA. Data yang didapat disajikan dalam bentuk tabel dan diolah dengan menggunakan analisis statistik *one way* ANOVA dengan dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) kemudian bila didapatkan signifikansi dilanjutkan dengan uji beda

Hasil Penelitian

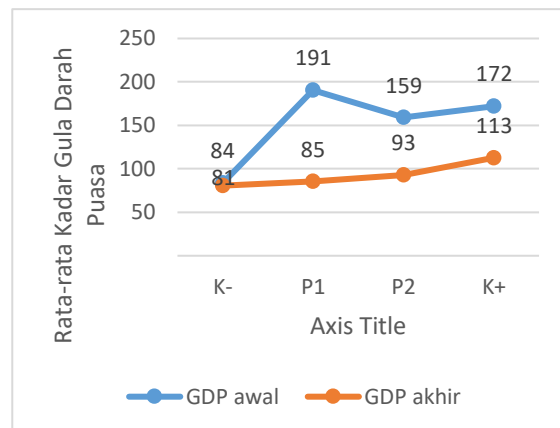
Pada awal penelitian rata-rata kadar gula darah puasa (GDP) setelah induksi stz dosis rendah adalah 151,31. Pemberian perlakuan selama 4 minggu menyebabkan tikus mengalami penurunan kadar gula darah saat puasa sehingga terdapat penurunan rata-rata Kadar GDP pada tikus di akhir penelitian. Penurunan tertinggi terjadi pada kelompok P1 sebesar 105 mg/dL (55,1 %). Data lengkap dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Data rata-rata Kadar Gula Darah Puasa Hewan Coba

Kelompok	GDP awal (mg/dL)	GDP akhir (mg/dL)	Penurunan (%)
K -	84	81	3.4
P1	191	85	55.1
P2	159	93	41.6
K+	172	113	34.6

Hasil uji normalitas *Kolmogorov-Smirnov* pada kelompok gula darah puasa awal maupun akhir didapatkan bahwa data pada keempat kelompok tersebut berdistribusi normal. Selanjutnya data dapat diuji dengan statistik parametrik. Pada uji anova didapatkan perbedaan bermakna pada kelompok GDP awal dengan kelompok GDP akhir ($p=0,030$).

Perbandingan Kadar GDP baik awal maupun akhir dari masing-masing kelompok lebih jelas dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Perbandingan Kadar Gula Darah Puasa (GDP) awal dan akhir penelitian

Setiap tikus pada seluruh kelompok diperiksa kadar GLP-1 plasma setelah mendapat perlakuan. Selanjutnya dibandingkan antara masing-masing kelompok. Kadar GLP-1 diperiksa dengan menggunakan metode spektrofotometri dan dinyatakan dengan satuan mg/dl. Data lengkap dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rata-rata kadar GLP-1 hewan coba

Kelompok	Rata-rata Kadar GLP-1
K -	0.0822841630 ± 0.0003115
P1	0.0825047470 ± 0.0001655
P2	0.0817752835 ± 0.0001197
K+	0.0818360138 ± 0.0001861

Hasil uji normalitas *Kolmogorov-Smirnov* pada kelompok awal maupun akhir didapatkan bahwa data pada kelima kelompok tersebut berdistribusi normal. Selanjutnya data dapat diuji dengan statistik parametrik. Hasil uji ANOVA menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna kadar rata-rata GLP-1 antara kelompok RS3 pati singkong dengan pati singkong ($P= 0.000$), RS3 pati singkong dengan K+ ($P= 0.000$) sedangkan antara kelompok RS3 pati singkong dengan kelompok kontrol normal (K-) tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($P= 0,121$).

Pembahasan

Pada penelitian ini tikus wistar jantan mendapat pakan standar untuk kelompok kontrol /normal (K-). Sedangkan pada kelompok perlakuan terbagi

dalam tiga kelompok yakni kelompok DM dengan diet RS3 pati singkong (P1), DM dengan diet pati singkong (P2) dan DM dengan pakan standard (K+). Setelah perlakuan selama 4 minggu diperoleh hasil bahwa pemberian pakan diet RS3 pati singkong dan pati singkong masing-masing dapat menurunkan kadar gula darah tikus wistar jantan sehingga sama dengan tikus normal sedangkan pada tikus DM dengan pakan standard tampak kadar gula darah yang tetap tinggi hingga akhir penelitian. Terdapat perbedaan penurunan kadar gula darah antara kelompok diet RS3 pati singkong dan pati singkong tetapi tidak signifikan secara statistik. Penurunan kadar gula darah pada kelompok tikus DM dengan diet RS3 pati singkong disertai dengan peningkatan kadar GLP-1 dalam plasma sedangkan pada tikus DM dengan diet pati singkong tidak disertai dengan peningkatan kadar GLP-1 bahkan tampak lebih rendah dibandingkan dengan tikus DM dengan pakan standard.

Saat ini peneliti banyak mengembangkan analog GLP-1 atau obat yang mampu menghambat enzim Dipenyl Peptidase (DPP) yang mendegradasi GLP-1 di dalam plasma sebagai obat Diabetes Mellitus karena obat jenis ini tidak mengakibatkan efek hipoglikemia seperti yang ditunjukkan oleh obat diabetes sebelumnya. Semakin banyak GLP-1 yang diproduksi dan disekresikan ke dalam plasma maka semakin besar GLP-1 yang tidak terdegradasi oleh enzim DPP sehingga semakin besar rangsangan yang diterima oleh sel B pankreas dalam menghasilkan insulin sehingga penurunan gula di dalam darah dapat lebih optimal. (Nurul, 2011) Dalam penelitian ini RS3 pati singkong pati singkong terbukti mampu menurunkan kadar gula darah sekaligus meningkatkan kadar GLP-1.

Peningkatan kadar GLP-1 pada tikus DM dengan diet RS3 pati singkong terjadi oleh karena setelah menjadi RS3 pati singkong, pati singkong tidak dicerna oleh enzim pencernaan di dalam saluran pencernaan tikus sehingga sulit diserap oleh epitel usus halus. Di dalam kolon, fraksi RS3 pati singkong pati singkong ini kemudian menjadi media pertumbuhan bagi flora normal usus dalam hal ini adalah bakteri asam laktat yang memfermentasi RS3 pati singkong menjadi asam lemak rantai pendek (SCFA). Asam lemak rantai pendek ini kemudian memicu sel L dalam lumen usus tikus untuk menghasilkan GLP-1. Sebagaimana diketahui GLP-1 memiliki peran besar (80%) dalam peningkatan respon insulin sehingga sekresi GLP-1 yang lebih banyak menyebabkan kadar GLP-1 dalam plasma juga meningkat dan memicu sel B-pankreas untuk menghasilkan insulin lebih banyak dan mengakibatkan penurunan kadar gula darah.

(Herawati, 2010; Anderson, 2006; D. L. Topping et al. 2003).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa RS3 pati singkong terbukti dapat menurunkan kadar gula darah serta meningkatkan kadar GLP-1 pada tikus model diabetes mellitus tipe 2 selama perlakuan selama 4 minggu sehingga RS3 pati singkong terbukti dapat menjadi modalitas terapi yang baru dalam pengobatan penyakit diabetes mellitus tipe 2.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini didanai DIPA Universitas Jember Tahun Anggaran 2016 nomor SP.DIPA-042.01.2.400922/2016 Tanggal 07 Desember 2015.

Daftar Pustaka

- Anderson JW. 2006. Diabetes Mellitus: Medical nutrition therapy. Dalam: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, editor. Modern Nutrition in Health and Disease. Edisi ke-10. Philadelphia: Lippincot Williams and Wilkins. hal.1043- 64
- Ariantari, N.P., S.C. Yowani dan D.A. Swastini. 2010. Uji Aktivitas Penurunan Kolesterol Produk Madu Herbal yang Beredar di Pasaran Pada Tikus Putih Diet Lemak Tinggi. *Jurnal Kimia* 4(1): 15-19.
- Bodinhm, CL; Smith L; Thomas EL; Bell JD; Swann JR, Costabile A; Russell-Jones D; Umpleby AM, Robertson MD. 2014. Efficacy of increased resistant starch consumption in human type 2 diabetes. *Endocrine connection* (2014)3: 75-84
- David L. Topping, et al. 2003. Resistant Starch as Prebiotic and Synbiotic: State of the art. *Proceeding Of The Nutrition Society*. 62: 171-176.
- De León, D.D., Crutchlow, M.F., Ham, J.Y.N. and Stoffers, D.A., 2006. Role of glucagon-like peptide-1 in the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(5-6), pp.845-859.
- Herawati, H., 2011. Potensi pengembangan produk pati tahan cerna sebagai pangan

- fungsional. *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian*, 30(1), pp.31-39.
- Hidayat, B., Widodo, Y.R. and Wirawati, C.U. 2006. Pengaruh Jenis Ubi Kayu terhadap Karakteristik Tepung Ubi Kayu (Cassava Flour) yang Dihasilkan. *Laporan Penelitian Hibah Kompetisi Pemda Propinsi Lampung Tahun Anggaran*.
- Holst, J.J., 2007. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiological reviews*, 87(4), pp.1409-1439.
- IDF, D.A.G. 2015. Update of mortality attributable to diabetes for the IDF Diabetes Atlas: Estimates for the year 2013. *Diabetes research and clinical practice*, 109(3), p.461.
- Keenan, M.J., Zhou, J., Hegsted, M., Pelkman, C., Durham, H.A., Coulon, D.B. and Martin, R.J. 2015. Role of Resistant Starch in Improving Gut Health, Adiposity, and Insulin Resistance-. *Advances in Nutrition*, 6(2), pp.198-205.
- Lehmann U., G.Jacobash, dan D.Schmiedl. 2002. Characterization of Resistant Starch Type III from Banana (*Musa acuminata*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 50(18): 5236-5240.
- Shimada, M., Mochizuki, K. and Goda, T. 2009. Feeding rats dietary resistant starch shifts the peak of SGLT1 gene expression and histone H3 acetylation on the gene from the upper jejunum toward the ileum. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(17), pp.8049-8055.
- Shimotoyodome, A., Suzuki, J., Fukuoka, D., Tokimitsu, I. and Hase, T. 2009. RS4-type resistant starch prevents high-fat diet-induced obesity via increased hepatic fatty acid oxidation and decreased postprandial GIP in C57BL/6J mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 298(3), pp.E652-E662.
- Srinivasan K., B.Viswanad, A.Lydia, C.L.Kaul, dan P. Ramarao. 2005. Combination of high-fat diet-fed and low dose streptozotocin-induced ype 2 diabetes rat model and pharmacological screening. *Pharmacological Research* 52: 313-320.
- Tachibe, M., Kato, R., Sugano, S., Kishida, T. and Ebihara, K. 2009. Hydroxypropylated Tapioca Starch Retards the Development of Insulin Resistance in KKAY Mice, a Type 2 Diabetes Model, Fed a High-Fat Diet. *Journal of food science*, 74(7).