

## ISOFLAVON KEDELAI DAN POTENSINYA SEBAGAI PENANGKAP RADIKAL BEBAS

[Soybean Isoflavone and Its Potentially as Scavenger Free Radicals]

Sussi Astuti <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Staf Pengajar Jurusan Teknologi Industri Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung  
Jl. Prof. Soemantri Brojonegoro No. 1 Bandar Lampung, Lampung 35145

### SUMMARY

Improving of antioxidant status can be achieved by consuming antioxidant containing-food. Consumption of natural food that contains antioxidant will give positive effects for health if it is consumed according to regular on optimum and effective dosage. Isoflavones are the active compound in soybean. By measuring immunohistochemical technique, it was proven increasing the profile of copper, zinc-superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD) in the liver, kidney and testis of rats that were given isoflavones by oral administration. As phenolic antioxidants, isoflavones have a potential role for protection of cells in those tissues because of the capability of isoflavone as scavenger free radicals.

**Keywords:** antioxidant, free radical, isoflavone, soybean,

### PENDAHULUAN

Dalam keadaan normal, secara fisiologis sel memproduksi radikal bebas sebagai konsekuensi logis akibat reaksi biokimia dalam metabolisme sel aerob atau metabolisme xenobiotik. Tubuh secara alami memiliki sistem pertahanan terhadap radikal bebas, yaitu antioksidan endogen intrasel yang terdiri atas enzim-enzim yang disintesis oleh tubuh seperti superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathion peroksidase (Sanmugapriya dan Venkataraman, 2006). Antioksidan yang terdapat dalam tubuh harus terdapat dalam jumlah yang memadai. Pada keadaan patologik diantaranya akibat terbentuknya radikal bebas dalam jumlah berlebihan, enzim-enzim yang berfungsi sebagai antioksidan endogen dapat menurun aktivitasnya. Oleh karena itu, jika terjadi peningkatan radikal bebas dalam tubuh, dibutuhkan antioksidan eksogen (yang berasal dari bahan pangan yang dikonsumsi) dalam jumlah yang lebih

banyak untuk mengeliminir dan menetralkan efek radikal bebas.

Sistem pertahanan tubuh yang dapat digunakan untuk melawan radikal bebas sangat dipengaruhi oleh tersedianya zat-zat gizi dalam tubuh yang berasal dari makanan. Upaya mempertinggi status antioksidan dalam tubuh dapat dilakukan dengan mengkonsumsi bahan pangan yang mengandung zat-zat gizi antioksidan maupun antioksidan non gizi (komponen bioaktif), sehingga kadar antioksidan endogen dalam tubuh dipertahankan tetap tinggi.

Ada dua kelompok sumber antioksidan, yaitu antioksidan sintetik (antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia) dan antioksidan alami (antioksidan hasil ekstraksi bahan alami atau yang terkandung dalam bahan alami). Antioksidan alami berasal dari senyawa fenolik seperti golongan flavonoid. Flavonoid adalah suatu golongan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman.

Kedelai termasuk kelompok flavonoid, merupakan salah satu bahan pangan penghasil antioksidan alami. Salah satu komponen penting/senyawa bioaktif yang terdapat dalam kedelai dan bertindak sebagai antioksidan adalah isoflavon (Saija *et al.*, 1995). Konsumsi bahan pangan kaya antioksidan perlu ditingkatkan oleh masyarakat untuk menekan tingginya prevalensi penyakit degeneratif. Kedelai sebagai sumber antioksidan isoflavon telah dijadikan sebagai primadona karena mudah diperoleh dalam makanan sehari-hari dan merupakan komoditas yang populer di masyarakat. Berbagai produk olahan kedelai telah banyak dimanfaatkan masyarakat untuk mencukupi kebutuhan gizi sebagai bahan makanan.

Studi klinis maupun epidemiologis oleh beberapa peneliti menunjukkan peran isoflavon kedelai dalam memberikan perlindungan dan menjaga kesehatan tubuh, serta mencegah timbulnya berbagai penyakit. American Dietetic Association (ADA) melaporkan bahwa konsumsi pangan alami akan memberikan efek positif bagi kesehatan apabila dikonsumsi sebagai menu pangan secara teratur pada dosis yang efektif. Indiana Soybean Board (1998) menyarankan konsumsi isoflavon per hari sebesar 30-40 mg, sedangkan Cassidy *et al.* (1994) menyatakan bahwa isoflavon sebesar 50 mg per hari sudah cukup untuk memperoleh pengaruh klinis/biologis dalam tubuh.

Enzim superoksida dismutase (SOD) merupakan pertahanan pertama terhadap aktivasi senyawa oksigen reaktif (ROS). Salah satu metode untuk mendeteksi komponen sel dalam jaringan atau distribusi enzim yang spesifik adalah melalui pewarnaan secara imunohistokimia, dengan menggunakan prinsip ikatan antara antigen

dan antibodi (Kuhlmann, 1984). Cu,Zn-SOD terdapat dalam sitosol beberapa jaringan dan mempunyai fungsi sebagai bagian dari mekanisme pertahanan tubuh terhadap pengaruh buruk beberapa metabolisme oksigen (Chow, 1988). Tulisan ini akan menelaah potensi isoflavon kedelai sebagai penangkap (scavenger) radikal bebas.

### Isoflavon Kedelai

Isoflavon termasuk dalam golongan flavonoid yang merupakan senyawa polifenolik. Struktur kimia dasar dari isoflavon hampir sama seperti flavon, yaitu terdiri dari 2 cincin benzen (A dan B) dan terikat pada cincin C piran heterosiklik, tetapi orientasi cincin B nya berbeda. Pada flavon, cincin B diikat oleh karbon nomor 2 cincin tengah C, sedangkan isoflavon diikat oleh karbon nomor 3 (Schmidl dan Labuza, 2000).

Pada umumnya, senyawa isoflavon banyak ditemukan pada tanaman kacang-kacangan atau leguminosa (Zubik dan Meydani, 2003). Isoflavon pada kedelai terdapat dalam empat bentuk, yaitu (1) bentuk aglikon (non gula) : genistein, daidzein, dan glycitein; (2) bentuk glikosida : daidzin, genistin dan glisitin; (3) bentuk asetilglikosida : 6''-O-asetil daidzin, 6''-O-asetil genistin, 6''-O-asetil glisitin; dan (4) bentuk malonilglikosida : 6''-O-malonil daidzin, 6''-O-malonil genistin, 6''-O-malonil glisitin.

Isoflavon utama pada kedelai terdiri dari genistein (4',5',7-trihydroxyisoflavone) dan daidzein (4',7-dihydroxyisoflavone), serta turunan  $\beta$ -glikosida, genistin dan daidzin. Ditemukan juga sejumlah kecil senyawa isoflavon lainnya seperti glycitein (7,4'-dihydroxy-6-methoxy-isoflavone) dan glikosidanya (Wang dan Murphy, 1994). Secara alami, isoflavon pada kedelai hampir seluruhnya terdapat dalam bentuk

$\beta$ -glikosida (glikon). Bentuk glikosida dipertahankan oleh tanaman sebagai bentuk inaktif sehingga dibutuhkan sebagai antioksidan. Menurut Naim *et al.* (1974), sebanyak 99 % isoflavon pada kedelai terdapat dalam bentuk glikosida, terdiri dari 64 % genistin, 23 % daidzin dan 13 % glisitin. Komposisi ini biasanya terdapat pada makanan olahan kedelai yang tidak difermentasi seperti susu kedelai, tofu, tepung kedelai, konsentrat protein kedelai dan isolat protein kedelai. Pada makanan olahan kedelai yang mengalami proses fermentasi seperti miso dan tempe, isoflavon dalam bentuk bebas (aglikon) lebih dominan (Coward *et al.*, 1998).

Sebagian besar isoflavon dalam kedelai atau produk olahan kedelai terdapat dalam bentuk glikosida seperti genistin, daidzin dan glisitin yang berkonjugasi dengan mengikat satu molekul gula. Ketika produk kedelai dikonsumsi, bentuk glikosida isoflavon didegradasi menjadi senyawa aglikon dalam bentuk bebas yang dihasilkan oleh pelepasan glukosa dari glikosida. Proses degradasi glikosida menjadi aglikon seperti genistein, daidzein dan glisitein dikatalis oleh enzim glukosidase dalam usus halus. Isoflavon dalam bentuk aglikon lebih mudah diserap oleh usus halus sebagai bagian dari misel yang dibentuk oleh empedu. Sirkulasi isoflavon dalam darah bersifat kompleks, karena sebagian larut lemak dan sebagian berikatan dengan protein dengan kekuatan yang lemah. Isoflavon kemungkinan didistribusikan melalui darah ke hati, atau didaur ulang sebagai bagian dari cairan empedu dan sirkulasi enterohepatik. Ekskresi akhir isoflavon terjadi pada feses dan urin (Schmidl dan Labuza, 2000).

### Radikal Bebas dan Sistem Pertahanan Tubuh

Radikal bebas (free radical) atau sering juga disebut senyawa oksigen reaktif (reactive oxygen species/ROS) adalah sebuah molekul atau atom yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Radikal bebas bersifat tidak stabil, sangat reaktif dan dapat merebut elektron dari molekul lain dalam upaya mendapatkan pasangan elektronnya. Molekul yang kehilangan elektron ini dapat bersifat reaktif, terutama asam lemak tidak jenuh yang kemudian ditransformasikan menjadi radikal bebas yang sangat reaktif (Nabet, 1996). Dalam upaya memenuhi keganjilan elektronnya, radikal bebas yang elektronnya tidak berpasangan secara cepat akan menarik elektron makromolekul biologis yang berada di sekitarnya seperti protein, asam nukleat, dan asam deoksiribonukleat (DNA). Jika makromolekul yang teroksidasi dan terdegradasi tersebut merupakan bagian dari sel atau organel, maka dapat mengakibatkan kerusakan pada sel tersebut (Halliwell dan Gutteridge, 1990).

Pada keadaan normal, secara fisiologis sel memproduksi radikal bebas sebagai konsekuensi logis pada reaksi biokimia dalam kehidupan aerobik. Organisme aerobik memerlukan oksigen untuk menghasilkan ATP, yaitu suatu senyawa yang merupakan sumber energi bagi makhluk hidup melalui fosforilasi oksidatif yang terjadi dalam mitokondria. Pada proses tersebut terjadi reduksi  $O_2$  menjadi  $H_2O$  yang memerlukan pengalihan 4 elektron. Namun, dalam keadaan tertentu, pengalihan elektron tersebut berjalan kurang sempurna sehingga dapat terbentuk radikal bebas yang dapat merusak sel jika tidak diredam (Suryohudoyo, 2007).

Pembentukan radikal bebas akan dinetralisir oleh antioksidan yang diproduksi oleh tubuh dalam jumlah yang berimbang. Pengaruh negatif radikal bebas terjadi jika jumlahnya melebihi kemampuan detoksifikasi oleh sistem pertahanan antioksidan tubuh sehingga menimbulkan kondisi stres oksidatif. Radikal bebas dapat terbentuk melalui dua cara, yaitu : (1) secara endogen, sebagai respon normal dari rantai peristiwa biokimia dalam tubuh, dalam sel (intrasel) maupun ekstrasel, dan (2) secara eksogen, radikal bebas didapat dari polutan lingkungan, asap rokok, obat-obatan, dan radiasi ionisasi atau sinar ultra violet (Supari, 1996; Langseth, 2000).

Radikal bebas adalah sebuah atom atau molekul yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya (Clarkson dan Thompson, 2000). Radikal bebas bersifat tidak stabil dan mempunyai reaktivitas yang tinggi, sehingga dapat merebut elektron dari molekul lain dalam upaya mendapatkan pasangan elektronnya. Molekul yang kehilangan elektron ini dapat bersifat reaktif, terutama asam lemak tidak jenuh yang kemudian ditransformasikan menjadi radikal bebas yang sangat reaktif (Nabet, 1996). Jika radikal bebas tidak diinaktivasi, reaktivitas radikal bebas ini dapat menimbulkan perubahan kimiawi dan merusak seluruh tipe makromolekul seluler seperti karbohidrat, protein, lipid, dan asam nukleat (Langseth, 2000). Di samping radikal bebas (free radical), dikenal juga istilah reactive oxygen species (ROS), yaitu molekul yang bukan hanya merupakan radikal oksigen, tetapi juga beberapa turunan oksigen yang non radikal (Halliwell dan Gutteridge, 1999). Radikal bebas dan senyawa ROS dalam tubuh dapat menyebabkan oksidasi lipid, oksidasi

protein, DNA strand break, modifikasi basa DNA, dan modulasi ekspresi genetik (Lee *et al.*, 2004). Beberapa senyawa ROS yang penting dalam kehidupan makhluk hidup adalah : yang tergolong radikal bebas seperti radikal hidroksil (OH\*), radikal superoksida (O<sub>2</sub>\*), radikal nitrik oksida (NO\*) dan radikal lipid peroksil (LOO\*); serta yang tergolong non radikal seperti hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), singlet oksigen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), asam hipoklorat (HOCl), dan ozon (O<sub>3</sub>) (Halliwell dan Gutteridge, 1999; Langseth, 2000; Lee *et al.*, 2004).

Secara fisiologis, tubuh manusia mempunyai beberapa macam enzim dan senyawa non enzim tertentu yang berfungsi sebagai antioksidan. Antioksidan merupakan molekul yang dapat mengendalikan reaksi berantai radikal bebas dalam tubuh. Antioksidan biologis dapat dibagi berdasarkan proses enzimatik dan non-enzimatik. Antioksidan endogen terdiri atas enzim-enzim yang disintesis oleh tubuh seperti superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathion peroksidase. Sedangkan antioksidan eksogen yang berasal dari luar tubuh termasuk antioksidan non-enzimatik, terbagi atas antioksidan larut lemak ( $\alpha$ -tokoferol, karotenoid, quinon dan bilirubin) dan antioksidan larut air (asam askorbat, asam urat, protein pengikat logam, protein pengikat heme) (Halliwell dan Gutteridge, 1999). Pada keadaan patologik diantaranya akibat terbentuknya radikal bebas dalam jumlah berlebihan, enzim-enzim yang berfungsi sebagai antioksidan endogen dapat menurun aktivitasnya. Menurut konsep radikal bebas, kerusakan sel akibat molekul radikal baru dapat terjadi apabila kemampuan mekanisme pertahanan tubuh sudah dilampaui atau menurun (Gitawati, 1995).

Stres oksidatif adalah suatu kondisi yang berhubungan dengan peningkatan kecepatan kerusakan sel akibat induksi oksigen dan turunannya (senyawa spesies oksigen reaktif/ROS). Kerusakan sel terjadi akibat ketidakseimbangan antara pembentukan ROS dan aktivitas pertahanan enzim antioksidan (scavenger; Fujii *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004).

Ketidakseimbangan terjadi ketika pembentukan radikal bebas melebihi sistem pertahanan, sistem pertahanan tidak mampu mendetoksifikasi radikal bebas, atau ketika terjadi penurunan proses detoksifikasi (Saleh dan Agarwal, 2002). Kondisi yang berhubungan dengan stres meliputi status penyakit kronis, penuaan, terekspos toksin (Sikka *et al.*, 1995), infeksi, inflamasi, serta kasus infertilitas yang dapat meningkatkan proses oksidasi dan menyebabkan kerusakan sel (Saleh dan Agarwal, 2002). Situasi di mana terjadi perubahan keseimbangan karena berlebihnya ROS atau berkurangnya antioksidan yang berfungsi menetralkan ROS, merupakan status positif stres oksidatif (Sikka *et al.*, 1995).

Sistem pertahanan tubuh terhadap senyawa radikal dibedakan menjadi sistem pertahanan preventif dan sistem pertahanan melalui mekanisme pemutusan reaksi rantai radikal bebas. Sistem pertahanan preventif dilakukan oleh antioksidan sekunder, sedangkan pemutusan reaksi berantai radikal bebas dilakukan oleh antioksidan primer (Nabet, 1996). Menurut Gordon (1990), antioksidan primer merupakan substansi yang berperan sebagai akseptor radikal bebas sehingga dapat menghambat mekanisme radikal bebas pada proses oksidasi. Antioksidan ini juga disebut sebagai antioksidan pemecah rantai yang dapat bereaksi dengan radikal lipid dan mengubahnya menjadi bentuk yang lebih

stabil. Contoh antioksidan primer antara lain tokoferol dan asam askorbat. Antioksidan sekunder atau antioksidan pelindung berperan dalam mereduksi kecepatan rantai inisiasi melalui berbagai mekanisme. Mekanisme antioksidannya dapat terjadi melalui pengikatan ion-ion logam, scavenger oksigen, dekomposisi hidroperoksida menjadi bentuk-bentuk non radikal, menyerap radiasi sinar ultra violet atau deaktivasi singlet oksigen. Contoh antioksidan sekunder antara lain asam sitrat dan turunan asam fosfat, karoten, enzim superoksida dismutase, katalase dan glutathion peroksidase. Nabet (1996) menyatakan bahwa pada sistem pertahanan preventif, pembentukan senyawa ROS dan radikal bebas dihambat dengan mengikat logam atau merusak pembentukannya. Sistem pengikatan logam tersebut terjadi dalam cairan ekstraseluler. Sebaliknya di dalam cairan intraseluler, senyawa ROS dan radikal bebas dirusak oleh sistem enzim.

Jadhav *et al.* (1996) menyatakan bahwa dalam cairan intraseluler, enzim yang berperan pada proses degradasi senyawa ROS meliputi enzim superoksida dismutase (SOD) yang mengkatalisis dismutasi radikal anion superoksida ( $O_2^*$ ) menjadi  $H_2O_2$  dan  $O_2$ ; enzim katalase mendegradasi  $H_2O_2$  menjadi air dan oksigen; serta enzim glutathion peroksidase yang mengkatalisis reduksi  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$  dengan menggunakan glutathion tereduksi (GSH) dan glutathion teroksidasi (GSSG) sebagai kofaktor. Nutrisi memainkan peranan kunci dalam menjaga pertahanan enzim tubuh terhadap radikal bebas. Beberapa mineral seperti Mn, Cu, Zn dan Se terlibat dalam aktivitas katalitik enzim antioksidan tersebut dan diperlukan untuk mengendalikan radikal bebas yang terbentuk pada tahap awal. Keempat mineral tersebut diperlukan dalam

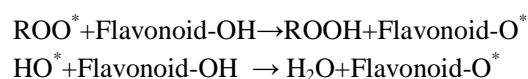
jumlah yang cukup dalam makanan. Antioksidan enzimatis yang bekerja intraseluler sebagian besar terdapat dalam mitokondria dan sitoplasma sel.

#### **Mekanisme Isoflavon sebagai Penangkap (Scavenger) Radikal Bebas**

Sebagai salah satu golongan flavonoid, senyawa bioaktif isoflavon yang mengandung gugus fenolik telah dilaporkan mempunyai kemampuan sebagai antioksidan dan mencegah terjadinya kerusakan akibat radikal bebas melalui dua mekanisme, yaitu : mendonorkan ion hidrogen (Saija *et al.*, 1995; Arora *et al.*, 1998), dan bertindak sebagai *scavenger* radikal bebas secara langsung (Arora *et al.*, 1998; Nijveldt *et al.*, 2001). Struktur meta 5,7-dihidroksil pada cincin A menunjukkan kemampuan isoflavon untuk berperan sebagai donor ion hidrogen sehingga terbentuk senyawa yang lebih stabil dan terbentuk radikal fenoksil yang kurang reaktif (Oteiza *et al.*, 2005), sedangkan gugus 4'-hidroksil pada cincin B senyawa isoflavon berperan sebagai *scavenger* senyawa ROS (Pokorny *et al.*, 2001). Konfigurasi grup hidroksil pada cincin B senyawa flavonoid telah dilaporkan berperan sebagai *scavenger* senyawa ROS (Heim *et al.*, 2002). Dikemukakan lebih lanjut bahwa grup hidroksil pada cincin B dapat mendonorkan ion hidrogen dengan mendonorkan sebuah elektron ke radikal hidroksil dan peroksil; menstabilkan kedua radikal tersebut, serta membentuk radikal flavonoid yang relatif lebih stabil.

Flavonoid efektif sebagai *scavenger* radikal hidroksil dan radikal peroksil (Lee *et al.*, 2004). Flavonoid (flavonoid-OH) dilaporkan dapat beraksi sebagai *scavenger* radikal peroksil ( $\text{ROO}^*$ ) yang akan diregenerasi menjadi  $\text{ROOH}$ , dan bertindak sebagai *scavenger* radikal hidroksil ( $\text{OH}^*$ )

yang akan diregenerasi menjadi  $\text{H}_2\text{O}$ . Senyawa hasil regenerasi radikal peroksil dan radikal hidroksil bersifat lebih stabil, sedangkan radikal fenoksil yang terbentuk (flavonoid- $\text{O}^*$ ) menjadi bersifat kurang reaktif untuk melakukan reaksi propagasi (Arora *et al.*, 1998). Senyawa radikal fenoksil menjadi inaktif akibat tingginya reaktivitas grup hidroksil senyawa flavonoid yang terjadi melalui reaksi (Nijveldt *et al.*, 2001) :



Dengan berperan sebagai antioksidan, isoflavon mempunyai kemampuan untuk mencegah peroksidasi lipid. Dalam hal ini, isoflavon berfungsi sebagai antioksidan primer karena berperan sebagai akseptor radikal bebas sehingga dapat menghambat reaksi rantai radikal bebas pada oksidasi lipid. Menurut Pokorny *et al.* (2001), kemampuan antioksidan untuk mendonasikan hidrogen mempengaruhi aktivitasnya. Dilaporkan bahwa suatu molekul akan mampu bereaksi sebagai antioksidan primer apabila dapat mendonasikan atom hidrogen secara cepat pada radikal lipida, radikal yang diturunkan dari antioksidan lebih stabil dibandingkan radikal lipid awal, atau dikonversi menjadi produk yang lebih stabil. Dengan demikian, maka reaktivitas radikal bebas dapat diredam. Castelluccio *et al.* (1996) menyatakan bahwa antioksidan senyawa flavonoid dapat mendonorkan hidrogen pada radikal bebas sehingga menghasilkan radikal stabil berenergi rendah yang berasal dari senyawa flavonoid yang kehilangan atom hidrogen. Radikal antioksidan yang terbentuk menjadi lebih stabil melalui proses resonansi dalam struktur cincin

aromatiknya, sehingga tidak mudah untuk terlibat pada reaksi radikal yang lain (Lee *et al.*, 2004).

Membran plasma umumnya bersifat sangat rentan terhadap oksidasi asam lemak tidak jenuh, karena sebagian besar komponen utama penyusun membran adalah PUFA. PUFA bersifat paling rentan/labil terhadap peroksidasi lipid karena banyak mengandung ikatan rangkap. Menurut Pokorny *et al.* (2001), keberadaan karbon-karbon yang memiliki ikatan rangkap akan melemahkan ikatan karbon-hidrogen, terutama atom hidrogen yang letaknya dekat dengan ikatan rangkap, sehingga atom hidrogen tersebut bersifat rentan untuk terabstraksi. Apabila atom hidrogen pada karbon  $\alpha$ -metilen dari ikatan rangkap PUFA hilang, maka akan terbentuk sebuah radikal alkil ( $R^*$ ) yaitu suatu senyawa turunan asam lemak yang bersifat tidak stabil. Terjadinya peroksidasi lipid akan menyebabkan hilangnya integritas dan permeabilitas membran (Geva *et al.*, 1998).

Suatu senyawa dapat bertindak sebagai antioksidan dan mencegah oksidasi lipid apabila potensial reduksi standar 1-elektron lebih rendah dari 600 mV (lebih rendah dari potensial reduksi PUFA). Flavonoid (isoflavon termasuk salah satu golongan flavonoid) memiliki potensial reduksi 530 mV (Buettner, 1993). Berdasarkan data potensial reduksi tersebut isoflavon berperan sebagai antioksidan primer dengan mendonasikan atom hidrogen secara cepat pada radikal lipid. Isoflavon bekerja dengan memberikan satu atom hidrogen kepada radikal peroksil, sebelum PUFA memberikannya. Senyawa yang terbentuk sebagai hasil regenerasi radikal peroksil bersifat lebih stabil.

### **Profil Imunohistokimia Cu,Zn-SOD pada Jaringan Hati, Ginjal dan Testis Tikus yang Diberi Tepung Kedelai Kaya Isoflavon**

Telah dilakukan pengamatan secara imunohistokimia terhadap keberadaan dan kandungan antioksidan Cu,Zn-SOD pada jaringan hati (Wresdiyati *et al.*, 2008), ginjal (Permana, 2007), dan testis tikus (Astuti, 2009). Tikus mendapat perlakuan cekok tepung kedelai kaya isoflavon pada dosis isoflavon 3 mg/ekor/hari selama 2 bulan, dan dibandingkan dengan kelompok tikus yang mendapat cekok aquadest (kontrol). Pengamatan kuantitatif terhadap enzim Cu,Zn-SOD dilihat dari jumlah inti sel yang bereaksi terhadap berbagai tingkat kandungan Cu,Zn-SOD. Perbedaan intensitas warna yang terbentuk akibat reaksi tersebut dibagi atas dua tingkatan intensitas warna untuk reaksi positif dan satu intensitas warna untuk reaksi negatif. Reaksi positif kuat (+++) ditunjukkan dengan warna coklat tua, reaksi positif sedang/lemah (++) ditunjukkan dengan warna coklat muda, sedangkan reaksi negatif (-) ditunjukkan dengan warna biru. Pada testis, kandungan Cu,Zn-SOD diamati pada tahap spermatosit dan spermatid awal karena produk reaksi warna coklat lebih banyak terdistribusi pada tahap tersebut. Hal ini didukung oleh Peltola *et al.* (1992), yang melaporkan bahwa pada tubuli seminiferi testis tikus, aktivitas SOD yang lebih tinggi ditemukan pada sel spermatosit dan spermatid awal. Hasil perhitungan secara kuantitatif jumlah inti sel hati, inti sel tubuli renalis, serta spermatosit dan spermatid awal tubuli seminiferi testis pada berbagai tingkat kandungan Cu,Zn-SOD tersaji pada Tabel 1.

Tabel 1. Profil kandungan Cu,Zn-SOD pada inti sel hati, ginjal, spermatisit dan spermatid awal tikus pada berbagai tingkat kandungan

Perlakuan	Hati			Ginjal			Testis		
	Jumlah Inti Sel Hati			Jumlah Inti Sel Tubuli Renalis			Jumlah Sel Spermatisit dan Spermatid Awal		
	+++	++/+	-	+++	++/+	-	+++	++/+	-
Cekok aquades	13.40± 4.16	99.00± 7.53	30.00± 4.64	22.60± 1.71	124.60± 8.50	52.80± 5.57	157.11± 13.72	75.11 ± 6.07	49.89± 3.21
Cekok isoflavon	36.40 ± 6.50	79.60 ± 7.52	15.60 ± 2.07	33.90± 2.33	149.20± 4.66	38.40± 3.20	194.78± 15.79	115.22± 9.24	41.89± 7.44

+++ = positif kuat; ++/+ = positif sedang/lemah; - = negatif

Sumber : Wresdiyati *et al.* (2008), Permana (2007), Astuti (2009)

Sel yang normal mempunyai sejumlah enzim pertahanan yang beraksi sebagai antioksidan endogen untuk mendetoksifikasi radikal bebas dan mencegah kerusakan sel. Kerentanan suatu jaringan terhadap kerusakan oksidatif tergantung pada mekanisme pertahanan oksidatifnya, antara lain oleh aktivitas dan kandungan enzim antioksidan endogen. Peningkatan radikal bebas dalam tubuh akan meningkatkan pemakaian enzim antioksidan intrasel sehingga menyebabkan penurunan aktivitas enzim SOD sebagai salah satu sistem antioksidan endogen dalam tubuh. Kelompok yang mendapat cekok aquadest (kontrol) memperlihatkan kandungan Cu,Zn-SOD pada inti sel hati, inti sel tubuli renalis, serta sel spermatisit dan spermatid awal pada tubuli seminiferi testis tikus yang lebih rendah dibandingkan kelompok yang mendapat cekok isoflavon.

Enzim Cu,Zn-superoksida dismutase (Cu,Zn-SOD) merupakan garis pertahanan pertama terhadap aktivasi dan toksisitas senyawa reaktif oksigen spesies (ROS) melalui dismutasi radikal anion superoksida, dan berkorelasi kuat dengan kemampuan sel untuk menghambat produk akhir hasil peroksidasi lipid (Oteiza *et al.*, 1995). Diduga, pada kelompok kontrol yang

mendapat cekok aquadest, jumlah radikal bebas yang tidak ternetralkan menjadi tinggi. Hal ini menyebabkan tingginya penggunaan antioksidan endogen dalam tubuh, sehingga menurunkan status antioksidan tubuh. Apabila kerusakan oksidatif jaringan testis terus berlanjut, akan terjadi ketidakseimbangan antara radikal bebas dan sistem pertahanan antioksidan. Ketidakseimbangan akan terjadi apabila pembentukan radikal bebas lebih tinggi dibandingkan sistem pertahanan antioksidan, sistem pertahanan antioksidan tidak mampu mendetoksifikasi terjadinya perubahan oleh radikal bebas secara terus menerus, atau ketika proses detoksifikasi menurun (Sikka, 2004).

Kelompok yang mendapat cekok isoflavon memperlihatkan kandungan Cu,Zn-SOD yang lebih tinggi, baik pada jaringan hati, ginjal, maupun testis. Sebagai antioksidan fenolik, diduga isoflavon berperan dalam melindungi sel ketiga organ tersebut dengan kemampuannya sebagai penangkap (*scavenger*) radikal bebas. Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini sejalan dengan pendapat Wang *et al.* (1998), yang menyatakan bahwa secara *in vitro*, isoflavon mampu menstimulasi ekspresi katalase mRNA, Cu-Zn SOD, serta GPx mRNA



sehingga dapat melindungi sel dari serangan stress oksidatif.

### DAFTAR PUSTAKA

- Arora, A., M.G. Nair, and G.M. Strasburg. 1998. Structure – activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic. Biol. & Med.* 24(9): 1355-1363.
- Astuti, S. 2009. Profil antioksidan Copper, Zinc-Superoxide Dismutase (Cu,Zn-SOD) pada tubuli seminiferi testis tikus yang diberi tepung kedelai kaya isoflavon, Seng (Zn) dan Vitamin E. *Prosiding Seminar Hasil-hasil Penelitian Unila-Dies ke 44.* Bandar Lampung. In Press.
- Buettner, G.R. 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants : lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 300: 535-543.
- Cassidy, A., S. Bingham, and K.R.D. Setchell. 1994. Biological effects of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal woman. *Am J. Clin. Nutr.* 60: 333-340.
- Castelluccio, C., G.P. Bolwell, C. Gerrish, and C. Rice-Evans. 1996. Differential distribution of ferulic acid to the major plasma constituents in relation to its potential as an antioxidant. *J. Biochem.* 316: 691-694.
- Coward, L., M. Smith, M. Kirk, and S. Barnes. 1998. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *Am. J. Clin. Nutr.* 68(Suppl): 1486S-1491S.
- Chow, C.K. 1988. *Cellular Antioxidant Defense Mechanism.* Vol III. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Clarkson, P.M, and H.S. Thompson. 2000. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health ? *Am. J. Clin. Nutr.* 72 (Suppl): 637S-646S.
- Fujii, J., Y. Iuchi, S. Matsuki, and T. Ishii. 2003. Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian J. Androl.* 5: 231-242.
- Gitawati, R. 1995. Radikal bebas – sifat dan peran dalam menimbulkan kerusakan/ kematian sel. *Cermin Dunia Kedok.* 102:33-36
- Geva, E., J.B. Lessing, L. Lerner-Geva, and A. Amit. 1998. Free radical, antioxidant and human spermatozoa : clinical implications. *Hum. Reprod.* 13(6): 1415-1424.
- Gordon, M.H. 1990. *The Mechanism of Antioxidants Action In Vitro.* Di dalam Hudson, B.J.F. (Ed.). *Food Antioxidants.* Elsevier Applied Science London-New York.
- Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge. 1990. Role of free radical and catalytic logam ions in humans disease : An overview. *Meth. Enzymol.* 186: 1-83.
- Halliwell, B. And J.M.C. Gutteridge. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 3<sup>th</sup> Ed. Oxford University Press, Inc., New York.
- Heim, K.E., A.R. Tagliaferro, and D.J. Bobilya. 2002. Flavonoid: chemistry, metabolism and structure-activity

- relationship. *J. Nutr. Biochem.* 13: 572-584.
- Indiana Soybean Board. 1998. Isoflavone Concentration in Soy Foods [www.soyfood.com.nutrition/isoflavoneconcentration.html](http://www.soyfood.com.nutrition/isoflavoneconcentration.html).
- Jadhav, S.J., S.S. Nimbalkar, A.D. Kulkarni, and D.L. Madhavi. 1996. Lipid Oxidation in Biological and Food Systems. Di dalam Madhavi, D.L., S.S. Deshpande, and D.K. Salunkhe (Eds.). *Food Antioxidants, Technological, Toxicological and Health Perspectives*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Langseth, L. 2000. Antioxidants and Their Effect on Health. Di dalam: Schmidl M.K. and T.P. Labuza (Eds.). *Essentials of Functional Foods*. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.
- Lee, J., N. Koo, and D.B. Min. 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Compre Rev. in Food Sci. and Food Safety*. 3: 21-33.
- Kuhlmann, W.D. 1984. *Immuno Enzyme Techniques in Cytochemistry*. Basel: Verlag Chemie.
- Nabet, F.B. 1996. Zat gizi antioksidan penangkal senyawa radikal pangan dalam sistem biologis. Di dalam Zakaria, F.R., R. Dewanti, dan S. Yasni (Ed.) : *Prosiding Seminar Senyawa Radikal dan Sistem Pangan : Reaksi Biomolekuler, Dampak terhadap Kesehatan dan Panangkalan*. Kerjasama Pusat Studi Pangan dan Gizi IPB dengan Kedutaan Perancis, Jakarta.
- Naim, M.B., Gestetner, S. Zilkah, Y. Bilk, and A. Bondi. 1974. Soybean isoflavone, characteristic, determination and antifungal activity. *J. Agric. Food Chem.* 22(5): 806-809.
- Nijveldt, R.J. *et al.* 2001. Flavonoids : a review of probable mechanism of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74:418-425.
- Oteiza, P.I., K.L. Olin, C.G. Fraga, and C.L. Keen. 1995. Zinc deficiency causes oxidative damage to proteins, lipids and DNA in rat testes. *J. Nutr.* 125: 823-929
- Oteiza, P.I., A.G. Erlejman, S.V. Verstraeten, C.L. Keen, and C.G. Fraga. 2005. Flavonoid-membrane interactions : A protective role of flavonoids at the membrane surface ? *Clin. & Dev. Immunol.* 12(1): 19-25.
- Peltola, V., I. Huhtaniemi, and M. Ahotupa. 1992. Antioxidant enzyme activity in the maturing rat testis. *J. Androl.* 13(5): 450-455.
- Permana, V.A. 2007. *Profil Imunohistokimia Antioksidan Copper,Zinc-Superoxide Dismutase (Cu,Zn-SOD) pada Jaringan Ginjal Tikus dengan Pemberian Isoflavon Kedelai, Vitamin E dan Mineral Zn*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Pokorny, J., N. Yanishlieva, and M. Gordon. 2001. *Antioxidant in Food*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Saija, A. *et al.* 1995. Flavonoids as antioxidant agents : importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic. Biol. & Med.* 19(4): 481-486.

- Saleh, R.A. and A. Agarwal. 2002. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J. Androl.* 23(6):737-752.
- Sanmugapriya, E. and S. Venkataraman. 2006. Studies on hepatoprotective and antioxidant actions of *Strychnos potatorium* Linn. seeds on CCl<sub>4</sub> induced acute hepatic injury in experimental rats. *J. Ethnopharmacol.* 105(1-2): 154-160.
- Sikka, S.C., M. Rajasekaran, and W.J.G. Hellstrom. 1995. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J. Androl.* 16(6): 464-468.
- Sikka, S.C. 2004. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J. Androl.* 25(1): 5-18.
- Supari, F. 1996. Radikal Bebas dan Patofisiologi Beberapa Penyakit. Di dalam Zakaria F.R., R. Dewanti, dan S. Yasni (Edt.). Di dalam : Prosiding Seminar Senyawa Radikal dan Sistem Pangan : Reaksi Biomolekuler, Dampak terhadap Kesehatan dan Penangkalan. Kerjasama Pusat Studi Pangan dan Gizi IPB dengan Kedutaan Perancis. Jakarta.
- Suryohudoyo, P. 2007. Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekuler. CV Sagung Seto, Jakarta.
- Schild, M.K. and T.P. Labuza. 2001. Essentials of Functional Foods. Aspen Publisher, Inc. Gaithersburg, Maryland.
- Wang, H. and P.A. Murphy. 1994. Isoflavone content in commercial soybeans foods. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1666-1673.
- Wang W., L.Q. Liu, C.M. Higuchi, and H. Chen. 1998. Induction of NADPH : quinone reductase by dietary phytoestrogens in colonic Colo205 cells. *Biochem. Pharmacol.* 56: 189-195.
- Wresdiyati, T., S. Astuti, M. Irvan, and M. Astawan. 2008. Pengaruh pemberian isoflavon kedelai, mineral Zn dan vitamin E terhadap profil antioksidan superoksida dismutase (SOD) hati tikus. Prosiding Seminar dan Lokakarya Perkembangan Terkini tentang Tempe : Teknologi, Standardisasi dan Potensinya dalam Perbaikan Gizi serta Kesehatan. Kerjasama Forum Tempe Indonesia (FTI), Yayasan Tempe Indonesia, Pergizi Pangan Indonesia, dan ASA International Marketing, Bogor.
- Zubik, L. and M. Meydani. 2003. Bioavailability of soybean isoflavon from aglycone and glucoside form in american women. *Am. J. Clin. Nutr.* 77: 1459-1465.