

KOMBINASI KACANG MERAH DAN KULIT KACANG HITAM PADA TIKUS WISTAR MODEL DIABETES MELITUS TIPE 2

*Combination of Red Beans and Black Beans Coat in Wistar Rats Type 2
Diabetes Mellitus Model*

Pratiwi Wulandari¹, Adi Magna Patriadi Nuhriawangsa², Tri Nugraha Susilawati³

¹ Postgraduate Program, Nutritional Science, Universitas Sebelas Maret, Surakarta, Indonesia.

² Department of Animal Science, Faculty of Animal Science, Universitas Sebelas Maret, Surakarta, Indonesia.

³ Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Universitas Sebelas Maret, Surakarta, Indonesia.

*Email: pratiwi_wulandari@student.uns.ac.id

ABSTRACT

*Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) is a metabolic disease that require pharmacological and non-pharmacological therapies. Consuming functional foods that are high in antioxidants and fiber such as red beans and black beans beneficial to patients with T2DM. The study aimed to examine the effect of the combination of red beans (*Phaseolus vulgaris* L.) flour and black beans (*Phaseolus vulgaris*) coat extract on body weight, blood glucose, insulin level and pancreatic tissue of T2DM model rats. This randomized controlled trial involved 36 male Wistar rats divided into 6 groups consisted of non-diabetic rats (Group I) and nicotinamide-streptozotocin induced diabetic rats (Group II-VI). Group II was negative control; Group III-V were given a combination with the proportion of flavonoid/ fiber in each kgBW as follows: 22.5 mg/0.25 g; 45 mg/0.5 g; and 90 mg/1 g. Group VI was the positive control. Data on body weight, fasting blood glucose levels and insulin levels were analyzed using Two-Way Anova, while pancreatic histopathology scoring data used Kruskal-Wallis. There was a significant difference between the dose and duration of intervention on body weight, fasting blood glucose and insulin levels ($p=0.001$). The intervention groups showed there were no pancreatic histopathology change as good as the positive control ($p>0.05$). The combination of flavonoids and fiber at a dose of 45 mg/0.5 g per kgBW was proven to gain weight, reduce fasting blood glucose levels, increase insulin levels and no pancreatic histopathology change in T2DM rats models as well as the positive control group.*

Keyword: blood glucose, black beans, insulin, pancreas, red beans

ABSTRAK

Diabetes Melitus Tipe 2 (DMT2) merupakan penyakit metabolik yang memerlukan terapi farmakologis dan non-farmakologis. Konsumsi pangan fungsional yang tinggi antioksidan dan serat seperti kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dan kacang hitam (*Phaseolus Vulgaris*) bermanfaat pada pasien DMT2. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi tepung kacang merah dan ekstrak kulit kacang hitam terhadap berat badan, glukosa darah, kadar insulin dan histopatologi pankreas tikus model DMT2. Uji acak terkontrol menggunakan 36 tikus Wistar jantan yang dibagi dalam 6 kelompok yang terdiri dari tikus non-diabetes (Kelompok I) dan tikus diabetes yang diinduksi *nicotinamide-streptozotocin* (Kelompok II-VI). Kelompok II adalah kontrol negatif; kelompok III-V diberi kombinasi dengan proporsi flavonoid/ serat masing-masing per kgBB yaitu: 22,5 mg/0,25 g; 45 mg/0,5 g; dan 90 mg/1 g. Kelompok VI adalah

kelompok kontrol positif. Data berat badan, kadar glukosa darah puasa dan kadar insulin dianalisis dengan *Two-Way Anova*, sedangkan data skoring histopatologi pankreas menggunakan *Kruskal-Wallis*. Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara dosis dan lama pemberian perlakuan terhadap berat badan, kadar glukosa darah puasa dan insulin ($p=0,001$). Kelompok perlakuan dan kontrol positif menunjukkan tidak adanya perubahan pada histopatologi pankreas ($p>0,05$). Kombinasi flavonoid dan serat pada dosis 45 mg/0,5 g per kgBB terbukti menambah berat badan, menurunkan kadar glukosa darah, meningkatkan kadar insulin dan tidak adanya perubahan histopatologi pankreas pada tikus model DMT2 sama baiknya dengan kelompok kontrol positif.

Kata Kunci: glukosa darah, insulin, kacang hitam, kacang merah, pankreas

PENDAHULUAN

Diabetes Mellitus Tipe 2 (DMT2) merupakan kelompok penyakit metabolik berupa hiperglikemi yang menyebabkan gangguan pada sekresi dan atau kerja insulin serta berhubungan dengan disfungsi jaringan dan organ dalam jangka panjang [1]. Penyandang diabetes di dunia diperkirakan akan mencapai 13,7 juta di tahun 2030 dan di Indonesia mencapai 21,3 juta tahun 2030 [2]. Besarnya jumlah penyandang DMT2 diikuti dengan risiko komplikasi baik makrovaskular maupun mikrovaskular. Terapi yang umum dilakukan dengan farmakologi berupa obat antihiperglikemi oral dan injeksi.[3] Terapi menggunakan obat-obatan diketahui dapat menimbulkan efek samping berupa anemia defisiensi B12, hipoglikemik, ketosis, edema, asidosis asam laktat dan meningkatkan risiko kanker [2], [4]. Alternatif terapi yang dapat dilakukan untuk pengobatan penyakit dan komplikasinya yaitu dengan gaya hidup dan pola diet [5]. Perlakuan diet yang dapat dilakukan yaitu dengan pangan fungsional yang kaya antioksidan (polifenol), serat, dan protein nabati [6].

Pangan fungsional yang mengandung tinggi antioksidan dan serat diantaranya adalah kacang-kacangan seperti kacang merah dan kacang hitam [7]. Kacang merah memiliki kandungan antioksidan berupa flavonoid (antosianin 0,07 mg/g) dan serat larut air yang dapat berperan sebagai antidiabetik [8],[9]. Penelitian pada hewan coba dengan menggunakan ekstrak kulit kacang merah yang tinggi antioksidan diketahui dapat menurunkan kadar glukosa darah puasa pada dosis 400 mg/kgBB [10]. Penelitian lain menggunakan tepung kacang merah pada hewan coba terbukti dapat menurunkan kadar glukosa darah [11]. Kacang merah diketahui mengandung serat larut air yang akan difermentasikan oleh mikrobiota usus menjadi asam lemak rantai pendek (SCFA) [12]. SCFA akan memicu hormon usus untuk mengendalikan berat badan dan kadar glukosa darah [13]. Selain itu, SCFA akan menginduksi sel β untuk memproduksi insulin [14].

Kacang hitam memiliki kandungan antioksidan paling tinggi pada kulitnya berupa flavonoid (*quercetin* 0,91 mg/g dan *kaemferol* 0,44 mg/g) yang dapat meningkatkan berat badan, mengontrol kadar glukosa darah dan kadar insulin pada hewan coba [15]. Penelitian berupa pemberian ekstrak kacang hitam yang mengandung flavonoid dapat meningkatkan toleransi glukosa darah dan memperbaiki sel β pankreas [16]. Hiperglikemi yang terjadi pada DMT2 meningkatkan proses inflamasi (IL-1 β , IL-6, TNF- α) dan stress oksidatif pada sel β yang menyebabkan terjadi resistensi insulin [17]. Flavonoid memiliki mekanisme untuk memperbaiki mitokondria sel β pankreas dari proses stres oksidatif, sehingga insulin dapat diproduksi dan terjadi perbaikan pada resistensi insulin [18].

Penelitian menggunakan kacang merah dan kacang hitam sudah dilakukan, namun kombinasi yang paling efektif terhadap tikus model diabetes tipe 2 belum dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh flavonoid dan serat yang terkandung

dalam kombinasi tepung kacang merah dan ekstrak kacang hitam terhadap berat badan, kadar glukosa darah, kadar insulin dan histopatologi pankreas tikus diabetes.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan uji acak terkontrol. Rangkaian penelitian berupa pembuatan tepung kacang merah, ekstrak kulit kacang hitam, uji kandungan, pemeliharaan dan perlakuan hewan coba dilakukan di Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Penelitian dilaksanakan dari Oktober hingga Desember 2022. Pemeriksaan histopatologi dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret. Protokol penelitian ini telah mendapatkan surat kelaikan etik nomor 116/UN27.06.11/KEP/EC/2022 yang dikeluarkan oleh Komite Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret.

Desain Penelitian

Hewan coba yang sudah diacak dikelompokkan menjadi 6 kelompok dan masing-masing terdiri 6 tikus Wistar. Semua kelompok diberi pakan standar dan minum *ad libitum*. Berikut kelompok yang dibentuk:

- Kelompok I (KN) : *non-diabetic* (Kontrol Normal) tanpa perlakuan tambahan
- Kelompok II (K(-)) : tikus *diabetic* (Kontrol Negatif) tanpa perlakuan tambahan
- Kelompok III (P1) : tikus *diabetic* dengan flavonoid/ serat per kgBB (22,5 mg/0,25 g)
- Kelompok IV (P2) : tikus *diabetic* dengan flavonoid/ serat per kgBB (45 mg/0,5 g)
- Kelompok V (P3) : tikus *diabetic* dengan flavonoid/ serat per kgBB (90 mg/1 g)
- Kelompok VI (K(+)) : tikus *diabetic* dengan glibenklamid 0,45 mg/kg (Kontrol Positif)

Dosis yang diberikan berdasarkan kandungan serat pada tepung kacang merah dan flavonoid pada ekstrak kulit kacang hitam. Penentuan dosis kombinasi berdasarkan perhitungan dengan P1 setengah kali dosis, P2 satu kali dosis dan P3 dua kali dosis dari hasil konversi yang telah ditetapkan. Perlakuan diberikan secara oral menggunakan sonde sekali sehari selama 28 hari.

Hewan Coba Penelitian

Tiga puluh enam tikus Wistar jantan sehat (berat badan 150-200 g; rerata usia 8 minggu) digunakan dalam penelitian ini [19]. Hewan coba diadaptasikan selama 7 hari sebelum penelitian. Kandang dalam ruang polypropylene higienis dengan suhu $23\pm 3^{\circ}\text{C}$. Pengaturan gelap terang 12/12 jam dan kelembapan 30-70% [20]. Hewan coba mendapat pakan standar Bravo 512 kemasan *Comfeed* dan akses air minum *Reverse Osmosis* (RO) *ad libitum* [21].

Induksi Hewan Coba Model Diabetes Melitus Tipe II

Tikus Wistar yang sudah diadaptasikan diambil acak 6 ekor untuk tidak diinduksi. Sebanyak 30 tikus Wistar diinduksi dengan *streptozotocin* dan *nicotinamide* [22]. *Nicotinamide* dilarutkan dalam larutan natrium 0.9% hingga konsentrasi 230 mg/ml. Timbang 32.5 mg *streptozotocin* dalam tabung mikrosentrifugasi 1.5 ml dan tutup tabung dengan aluminium foil. Satu tabung untuk satu tikus Wistar dan dipersiapkan buffer sitrat [19]. *Nicotinamide* 230 mg/kg (1 ml/kg) disuntikkan dengan spuit 1 ml dan jarum 23-G. Injeksi *nicotinamide* ini dilakukan 15 menit sebelum injeksi *Streptozotocin* [22]. Larutan *streptozotocin* dalam 50Mm buffer natrium sitrat (pH 4,5) hingga konsentrasi akhir 32.5 mg/ml. Larutan *streptozotocin* diinjeksi dengan spuit 1 ml jarum 25 G pada 65 mg/kg (2 ml/kg). Setelah 72 jam, hewan coba dengan kadar glukosa darah puasa > 150 mg/dl dianggap menderita diabetes dan dipilih untuk dilakukan penelitian [19].

Persiapan Ekstrak Kulit Kacang Hitam

Kulit kacang hitam dikupas secara manual dari biji, kemudian kulit kacang hitam diblender dan diayak [13]. Hasil ayakan kemudian dimaserasi dengan larutan etanol 96% dan dipisahkan dengan *rotary evaporator* [23]. Pembuatan dilakukan dengan melakukan ekstraksi pada 1 kg kulit kacang hitam dan didapatkan 30 g ekstrak kental kulit kacang hitam. Perlakuan berupa ekstrak pekat kulit kacang hitam yang diberikan berdasarkan perhitungan kandungan flavonoid yang dibutuhkan untuk mengendalikan metabolisme glukosa pada pasien dewasa (500 mg/hari) [24]. Ekstrak kulit kacang hitam pada penelitian ini memiliki kandungan flavonoid sebanyak 1,17%. Hasil tersebut kemudian dikonversikan sesuai kebutuhan berdasarkan berat badan pada hewan coba.

Persiapan Tepung Kacang Merah

Kacang merah yang telah direndam 24 jam, dikupas kulitnya [11]. Setelah dikupas, kemudian dikeringkan dan digiling menggunakan alat *grinder* Retsch ZM 200 Ultra Centrifugal dengan kecepatan 12.000 rpm dan ayakan 0,5 mm [25]. Kandungan serat pada tepung kacang merah didapatkan sebanyak 6,48%. Hasil tersebut kemudian dikonversikan pada hewan coba sesuai dengan dosis kebutuhan serat larut pada orang dewasa sebanyak 10 g/hari [2].

Persiapan Sampel

Pemeriksaan glukosa darah puasa dan kadar insulin dilakukan pada hari ke-0, hari ke-14 dan hari ke-28. Pada akhir penelitian hari ke-28, tikus Wistar di puasakan selama satu malam dan dilakukan anestesi sebelum pengambilan sampel darah [26]. Sampel darah diambil serumnya dengan disentrifugasi pada 3000 rpm selama 20 menit dan digunakan untuk uji gula darah puasa dan kadar insulin [26], [27]. Pada akhir penelitian tikus diterminasi dengan ketamine overdosis [28]. Pankreas diambil dari masing-masing tikus dan segera disimpan dalam formalin 10% untuk dilakukan pemeriksaan histopatologi [29].

Penentuan Berat Badan

Penimbangan berat badan dilakukan untuk pengambilan data ADG (*Average Daily Gain*) [30]. Penimbangan pada hari ke-0, ke-7, ke-14 dan ke-28. Penimbangan berat badan tikus Wistar dilakukan setiap minggu menggunakan timbangan digital dengan satuan gram dan ketelitian 1 gram [31].

Penentuan Kadar Glukosa Darah Puasa

Sampel darah diambil dari vena orbitalis tikus yang dipuasakan masing-masing satu malam pada saat sebelum induksi, hari ke-0 (72 jam setelah induksi), ke-14 dan ke-28 (akhir penelitian). Konsentrasi glukosa darah diperiksa dari sampel darah yang diambil dari vena sinus orbitalis dengan dianestesi ketamine 10% 0.1 ml [26]. Darah yang didapatkan dimasukkan dalam tabung EDTA dan kemudian disentrifus untuk diambil serumnya. Serum darah dianalisis menggunakan alat Enzymatic Colorimetric Test GOD-PAP (Glucose Oxidase Phenol 4-Aminiphenazone) untuk mengetahui nilai gula darah puasa dengan cara membandingkan hasil serapan larutan uji dan kadar glukosa standar [32].

Penentuan Kadar Insulin

Sampel darah yang diperiksa diambil dari hari ke-0, ke-14 dan ke-28 penelitian. Darah yang didapatkan akan dijadikan serum bersama dengan pemeriksaan glukosa darah [27]. Serum dianalisis menggunakan *rat insulin* ELISA kit (Zenix-520 Automated Elisa Processor, PT. Sumifin, Indonesia) untuk mengetahui kadar insulinnya dengan cara memasukkan sampel pada tabung yang kemudian ditambah reagen, enzim, *solution A*, *solution B*, *stop solution* dan dilanjutkan menggunakan perhitungan [26].

Pemeriksaan Histopatologi

Pankreas difiksasi dengan larutan formalin netral 10% dan ditanam dalam paraffin. Dibuat ketebalan 5 μm dari blok jaringan dan diwarnai dengan HE (Hematoksin-Eosin) [29]. Pemeriksaan preparat dilakukan oleh spesialis Patologi Anatomi dengan mikroskop cahaya untuk melihat morfologi pulau pankreas. Analisis morfometri slide jaringan diperiksa menggunakan mikroskop cahaya yang dilengkapi dengan kamera digital warna resolusi tinggi [33]. Pulau dipilih secara acak perbagian untuk menilai keadaan sel, jumlah sel, batas pulau Langerhans, sel nekrotik dan perubahan bentuk sel. Setelah penilaian kemudian dilakukan skoring. Perbedaan dianggap signifikan secara statistik jika $p < 0,05$ [34].

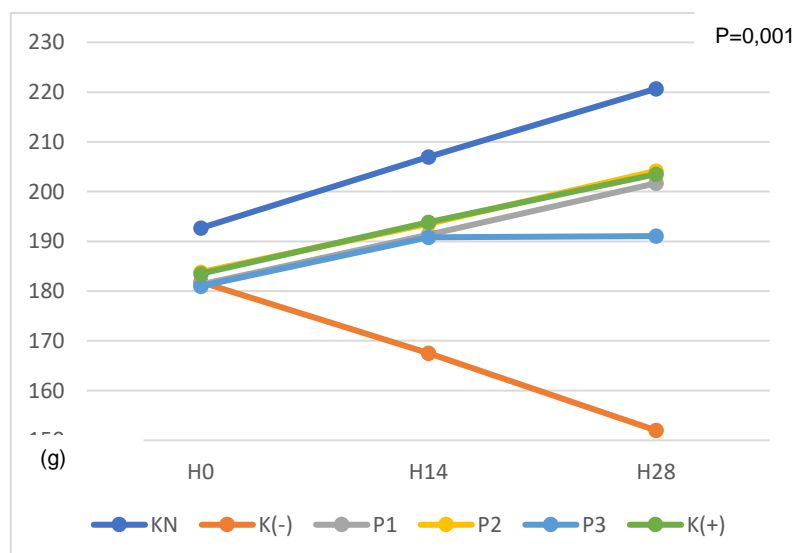
Analisis Statistik

Hasil yang diperoleh dilakukan analisis statistik menggunakan perangkat lunak SPSS v25.0. Data berat badan, glukosa darah puasa dan insulin diolah menggunakan *Two-Way ANOVA* dan *Uji Pos-Hoc Tukey HSD* [34]. Data skoring histopatologi pankreas dianalisis dengan *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan *Uji Post-Hoc Pairwise Comparisons* [35].

HASIL

Berat Badan

Gambar 1 menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara dosis dan lama pemberian perlakuan terhadap berat badan tikus DMT2 ($p=001$). Uji lanjutan yang dilakukan menunjukkan perbedaan berat badan yang bermakna antar KN dan K(-), namun tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara P1, P2, P3 dan K(+). Kelompok P1, P2, P3 dan K(+) diketahui mengalami peningkatan berat badan yang setara pada hari ke-14 dan hari ke-28 dibanding K(-). Kelompok K(-) mengalami penurunan berat badan dari hari pertama hingga hari-28 dibandingkan KN, P1, P2, P3 dan K(+). Peningkatan berat badan P1-P3 dan K(+) masih dibawah KN, sehingga belum mampu menyamai KN. Tidak ada perbedaan bermakna pada kelompok P1-P3 dan K(+), namun rerata pertambahan berat badan pada kelompok P3 lebih rendah dari kelompok perlakuan yang lain.

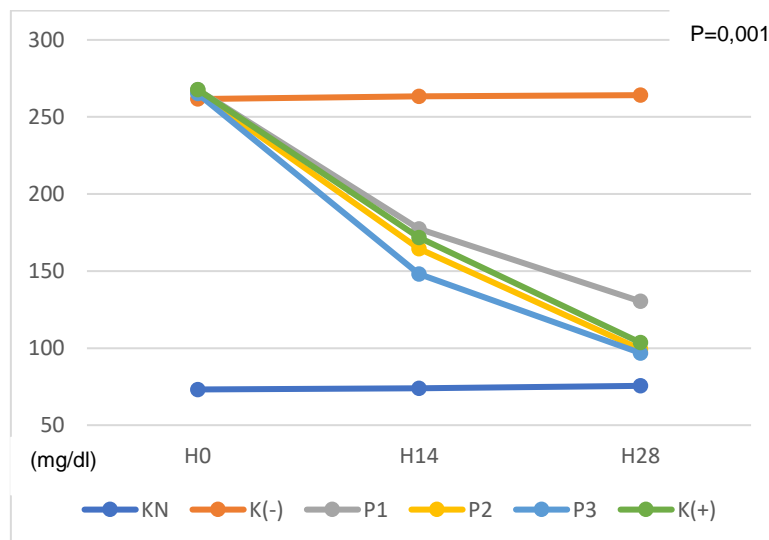


Keterangan: KN (Kontrol Normal), K(-) (Kontrol Negatif), P1 (Perlakuan 1), P2 (Perlakuan 2), P3 (Perlakuan 3), K(+ (Kontrol Positif).

Gambar 1. Pengaruh Dosis dan Lama Pemberian Tepung Kacang Merah dan Ekstrak Kulit Kacang Hitam terhadap Berat Badan Tikus DMT2

Kadar Glukosa Darah Puasa

Hasil pemeriksaan kadar glukosa darah puasa pada Tabel 2 menyatakan hasil yang signifikan terhadap dosis dan lama pemberian ($p=0,001$). Glukosa darah puasa KN dan K(-) mengalami peningkatan setelah perlakuan selama 28 hari. Peningkatan kadar glukosa darah pada kelompok KN masih dalam rentang normal, sedangkan kelompok K(-) tidak. Hasil berlawanan terjadi pada P1, P2, P3 dan K(+) yang mengalami penurunan kadar glukosa darah puasa. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada penurunan glukosa darah puasa antara P1, P2, P3 dan K(+). Hasil menunjukkan semakin lama perlakuan yang dilakukan pada kelompok P1-P3 dan K(+), maka semakin turun glukosa darah puasa hingga mencapai kadar dengan kategori normal. Kategori normal yang dicapai selama 28 hari oleh kelompok P1-P3 dan K(+) masih diatas kadar normal kelompok KN, sehingga belum bisa menyamai KN.

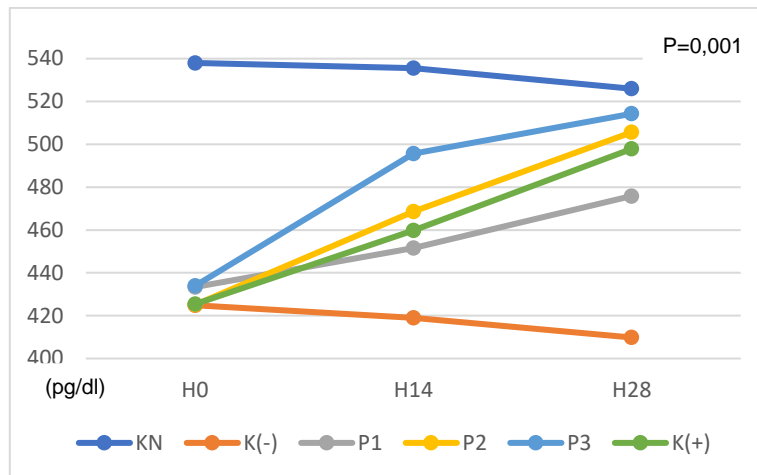


Keterangan: KN (Kontrol Normal), K(-) (Kontrol Negatif), P1 (Perlakuan 1), P2 (Perlakuan 2), P3 (Perlakuan 3), K(+) (Kontrol Positif).

Gambar 2. Pengaruh Dosis dan Lama Pemberian Tepung Kacang Merah dan Ekstrak Kulit Kacang Hitam terhadap Glukosa Darah Puasa Tikus DMT2

Kadar Insulin

Hasil pada Gambar 3 menyatakan terdapat perbedaan yang bermakna antara dosis dan lama pemberian terhadap kadar insulin ($p=0,001$). Uji lanjutan yang dilakukan menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara KN, K(-) dan P3, sedangkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada P2, P3 dan K(+). Kelompok KN dan K(-) menunjukkan penurunan kadar insulin, sedangkan kelompok P1-P3 dan K(+) menunjukkan peningkatan kadar insulin. Kelompok K(-) berbeda secara bermakna dengan P3, hal tersebut mempertegas bahwa K(-) mengalami penurunan kadar insulin sedangkan P3 mengalami peningkatan. Penurunan kadar insulin pada kelompok KN masih dalam rentang nilai normal dan peningkatan kadar insulin pada kelompok P1-P3 dan K(+) selama 28 hari nilainya masih dibawah kelompok KN. Hasil tersebut menunjukkan semua kelompok perlakuan belum mampu menyamai nilai kadar insulin kelompok KN. Kelompok P1-P3 dan K(+) yang mengalami peningkatan kadar insulin, namun nilai pada kelompok P1 masih dibawah nilai perlakuan yang lain dan berbeda bermakna dengan kelompok P2. Hasil tersebut menunjukkan bahwa perlakuan pada kelompok P2 lebih baik daripada kelompok P1.



Keterangan: KN (Kontrol Normal), K(-) (Kontrol Negatif), P1 (Perlakuan 1), P2 (Perlakuan 2), P3 (Perlakuan 3), K(+) (Kontrol Positif).

Gambar 3. Pengaruh Dosis dan Lama Pemberian Tepung Kacang Merah dan Ekstrak Kulit Kacang Hitam terhadap Kadar Insulin Tikus DMT2

Histopatologi Pankreas

Preparat pankreas diperiksa secara histopatologis dengan hasil skoring sebagai berikut:

Tabel 1. Skoring Histopatologi Pankreas

No.	Kelompok	Nomer Sampel	Skor
1.	Kelompok Kontrol Normal	KN_1	1
		KN_2	1
		KN_3	1
		KN_4	1
		KN_5	1
		KN_6	1
2.	Kelompok Kontrol Negatif	K(-)_1	3
		K(-)_2	4
		K(-)_3	2
		K(-)_4	3
		K(-)_5	3
		K(-)_6	3
3.	Kelompok Perlakuan 1	P1_1	1
		P1_2	2
		P1_3	2
		P1_4	2
		P1_5	1
		P1_6	1
4.	Kelompok Perlakuan 2	P2_1	1
		P2_2	2
		P2_3	2
		P2_4	1
		P2_5	2
		P2_6	1
5.	Kelompok Perlakuan 3	P3_1	2
		P3_2	1
		P3_3	2
		P3_4	1
		P3_5	2

No.	Kelompok	Nomer Sampel	Skor
6.	Kelompok Kontrol Positif	P3_6	1
		K(+)_1	2
		K(+)_2	2
		K(+)_3	2
		K(+)_4	1
		K(+)_5	2
		K(+)_6	1

Tabel 1 menunjukkan hasil skoring semua preparat pada kelompok kontrol normal adalah 1, sedangkan pada kelompok perlakuan masing-masing 3 preparat mendapat skor 1 dan 3 preparat mendapat skor 2. Kelompok kontrol positif menunjukkan 4 preparat mendapat skor 2 dan 2 preparat mendapat skor 1, hasil berbeda pada kelompok kontrol negatif yang menunjukkan 4 preparat mendapat skor 3 serta 2 preparat sisanya mendapat skor 2 dan 4. Skoring yang diperoleh dari pembacaan preparat kemudian dilakukan analisis data dengan hasil sebagai berikut:

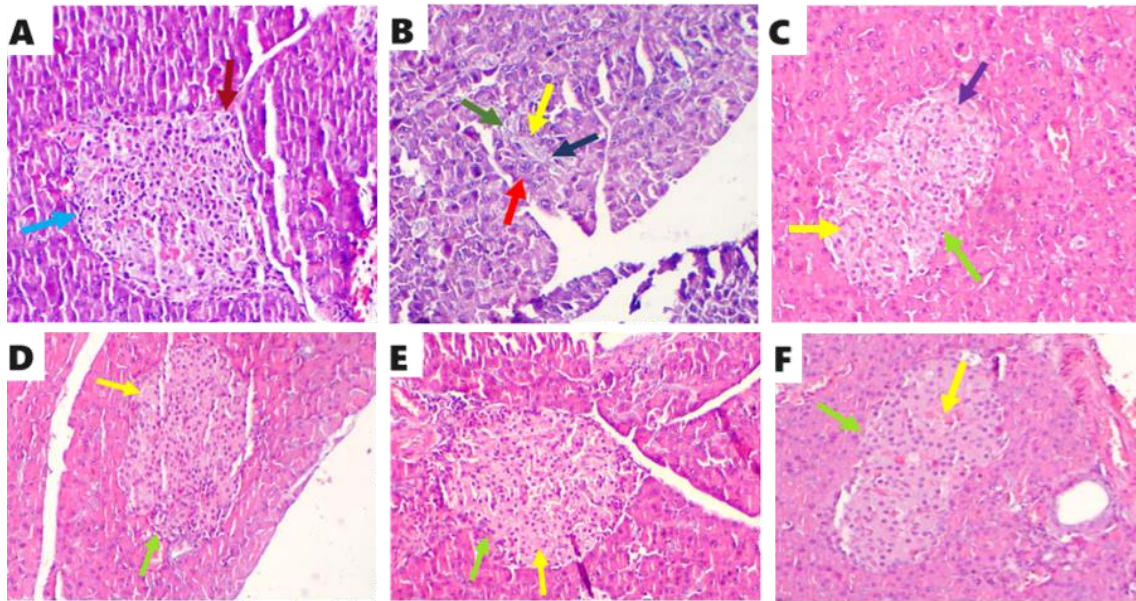
Tabel 2. Hasil Uji Lanjut

Kelompok			Sig.	P	Kemaknaan
KN	vs	P ₁	1.000	>0,05	Tidak Signifikan
KN	vs	P ₂	1.000	>0,05	Tidak Signifikan
KN	vs	P ₃	1.000	>0,05	Tidak Signifikan
KN	vs	K(+)	0.946	>0,05	Tidak Signifikan
KN	vs	K(-)	0.000	<0,05	Signifikan
P ₁	vs	P ₂	1.000	>0,05	Tidak Signifikan
P ₁	vs	P ₃	1.000	>0,05	Tidak Signifikan
P ₁	vs	K(+)	1.000	>0,05	Tidak Signifikan
P ₁	vs	K(-)	0.072	>0,05	Tidak Signifikan
P ₂	vs	P ₃	1.000	>0,05	Tidak Signifikan
P ₂	vs	K(+)	1.000	>0,05	Tidak Signifikan
P ₂	vs	K(-)	0.072	>0,05	Tidak Signifikan
P ₃	vs	K(+)	1.000	>0,05	Tidak Signifikan
P ₃	vs	K(-)	0.072	>0,05	Tidak Signifikan
K(+)	vs	K(-)	0.279	>0,05	Tidak Signifikan

Sumber: Data Primer (2023).

Keterangan: KN (Kontrol Normal), K(-) (Kontrol Negatif), K(+), (Kontrol Positif), P₁ (Perlakuan 1), P₂ (Perlakuan 2), P₃ (Perlakuan 3).

Hasil histopatologi pada Tabel 2 menunjukkan kelompok P₁-P₃ tidak mengalami perubahan bentuk histopatologi pankreas dan tidak berbeda secara bermakna dengan kontrol positif ($p > 0,05$). Tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok P₁-P₃ dan K(+) dengan kelompok kontrol normal ($p > 0,05$). Sebaliknya, terdapat perbedaan bermakna antara gambaran histologi kelompok KN dengan kelompok K(-) ($p = 0,001$). Kelompok KN semua preparat memiliki skor 1 yang menunjukkan tidak ada perubahan batas pulau *Langerhans*, jumlah sel mulai berkurang tetapi tidak terjadi nekrotik dan perubahan bentuk sel. Kelompok K(-) menunjukkan batas pulau *Langerhans* tidak jelas, jumlah banyak berkurang, sel banyak mengalami nekrotik dan bentuk sel sudah tidak normal. Hasil histopatologi kelompok P₁-P₃ dan K(+) menunjukkan hasil skoring yang sama, yaitu skor 1-2.



Gambar 4. Pulau *Langerhans* Pankreas dengan Pewarnaan Hematoxylin-Eosin perbesaran 20x

A. Kelompok tikus non-diabetic; **B.** Kelompok tikus diabetic; **C, D, E.** Kelompok perlakuan flavonoid/ serat per kgBB (22,5 mg/0,25 g; 45 mg/0,5 g; 90 mg/1 g); **F.** Kelompok perlakuan glibenklamid.

Keterangan: Batas pulau tegas (➡), mulai tidak jelas (➤), sangat tidak jelas (➦), jumlah sel berkurang (➤), degenerasi sel (➤), bentuk sel normal (➤), bentuk sel tidak normal (➤) dan hampir seluruh sel nekrotik (➤).

Gambar 4 menunjukkan morfologi pulau *Langerhans* pankreas pada kelompok kontrol normal (**A**) memiliki batas pulau yang tegas dan bentuk sel yang normal, sedangkan pada kelompok perlakuan (**C,D,E**) dan kontrol positif (**F**) mulai menunjukkan jumlah sel yang berkurang dan batas yang mulai tidak jelas. Hasil berbeda pada kelompok kontrol negatif (**B**) yang sudah menunjukkan batas pulau yang sangat tidak jelas, bentuk sel tidak normal dan hampir seluruh sel mengalami nekrotik.

PEMBAHASAN

Hiperglikemi merupakan tanda dari DMT2 yang disebabkan oleh kurangnya produksi hormon insulin dan/atau adanya resistensi sel terhadap insulin [2]. Patogenesis DMT2 menunjukkan adanya hubungan saling mempengaruhi antara penurunan berat badan, peningkatan kadar glukosa darah, penurunan kadar insulin dan kerusakan sel β pankreas [36]. Induksi *streptozotocin-nicotinamide* pada tikus diketahui dapat menyebabkan penurunan fungsi sel β pankreas [37]. Disfungsi sel β pankreas menyebabkan penurunan sekresi hormon insulin sehingga terjadi hiperglikemia [38].

Pemberian kombinasi flavonoid-serat per kgBB (22,5 mg/0,25 g; 45 mg/0,5 g; 90 mg/1 g) dari tepung kacang merah dan ekstrak kulit kacang hitam pada penelitian ini diketahui dapat memperbaiki histopatologi pankreas sama baiknya dengan kelompok K(+) pada tikus wistar model DMT2 (Tabel 2). Kelompok P1-3 diketahui tidak berbeda secara bermakna dengan kelompok KN, sehingga kelompok perlakuan memiliki efek perbaikan histopatologi pankreas setara dengan kelompok KN. Flavonoid diketahui akan menghambat stres oksidatif yang disebabkan induksi *streptozotocin* [37], [39]. Penghambatan stres oksidatif akan mengurangi disfungsi dari mitokondria sel β pankreas [18]. Penelitian dengan menggunakan ekstrak kacang hitam Adzuki yang tinggi flavonoid pada dosis 0,2 mg/ml diketahui dapat memperbaiki sel β pankreas [16]. Mekanisme flavonoid dalam memperbaiki sel β pankreas yaitu dengan menstimulasi

proliferasi sel pulau *Langerhans* dan meningkatkan produksi insulin dengan mengaktifasi jalur sinyal *Cyclic adenosine monophosphate* (cAMP)/PKA (Protein Kinase) [40].

Peningkatan kadar insulin akan sejalan dengan penurunan kadar glukosa darah puasa (Gambar 2 dan 3). Hal tersebut sejalan dengan penelitian yang menggunakan 400 mg/kgBB ekstrak kulit kacang hitam diketahui dapat memperbaiki morfologi pulau pankreas, meningkatkan kadar insulin darah dan menurunkan kadar glukosa darah puasa [15]. Kelompok P1 dapat meningkatkan kadar insulin, namun nilainya masih dibawah kelompok P2, P3 dan K(+). Hasil tersebut menunjukkan pada dosis kombinasi terendah belum mampu meningkatkan kadar insulin sebaik kelompok K(+). Kelompok P2-P3 diketahui dapat menurunkan kadar glukosa darah puasa dan meningkatkan kadar insulin yang tidak berbeda secara bermakna dengan kelompok K(+), namun masih belum setara dengan kelompok KN. Hal tersebut karena kelompok KN merupakan kelompok yang tidak diinduksi, sehingga memiliki fungsi endokrin yang baik [41]. Penelitian menggunakan ekstrak kacang hitam yang kaya flavonoid selain dapat memperbaiki kadar glukosa darah puasa juga dapat meningkatkan berat badan [15]. Flavonoid diketahui dapat menghambat glukogenolisis, glukoneogenesis, enzim pencernaan dan enzim metabolisme karbohidrat [39]. Hewan coba berupa tikus model DMT2 yang tidak mendapat perlakuan akan mengalami penurunan berat badan >10% [42]. Flavonoid berupa *quercetin* diketahui dapat mengontrol berat badan dengan mempengaruhi mekanisme metabolik melalui adiponektin dan leptin [43].

Tepung kacang merah mengandung serat larut air dan serat tak larut air. Serat larut air akan berperan sebagai prebiotik yang kemudian difermentasi oleh mikrobiota usus menjadi asam lemak rantai pendek (SCFA) [12]. Asam lemak rantai pendek yang dihasilkan berupa asetat, propionat dan butirir yang diketahui dapat menginduksi sel β pankreas untuk memproduksi insulin, menjaga kadar glukosa darah dan homeostasis energi [14]. Penelitian dengan konsumsi kacang merah rebus yang tinggi serat menunjukkan peningkatan asam butirir [44]. Asam butirir diketahui dapat memperbaiki sel islet pada pankreas dengan menghambat kelebihan ROS (*Reactive Oxygen Spesies*) dan NO (*Nitrit Oxide*), sehingga stres oksidatif yang terjadi juga terhambat dan akan meningkatkan produksi insulin [45]. Penelitian menggunakan 6.5 g/kgBB tepung kacang merah diketahui dapat mengontrol kadar glukosa darah pada hewan coba [11]. Asam lemak rantai pendek berupa asetat akan memicu sekresi glukagon dan peptide YY usus yang akan mempengaruhi nafsu makan, lipolisis, tingkat sitokin pro-inflamasi dan oksidasi lemak, sehingga dapat mengontrol kadar glukosa darah dan berat badan [46]. Gambar 1 pada kelompok P1-P3 menunjukkan peningkatan berat badan yang tidak berbeda secara bermakna dengan K(+), namun peningkatan berat badan pada kelompok P3 paling sedikit jika dibandingkan dengan dosis kombinasi yang lebih rendah (P1-P2). Hal tersebut dapat terjadi karena kelompok P3 mengandung kombinasi serat tertinggi, sedangkan diet tinggi serat diketahui dapat menurunkan berat badan pada pasien diabetes [47]. Pasien diabetes juga diketahui memiliki mikrobiota yang berbeda dengan orang normal. Flavonoid dapat berperan dalam meningkatkan mikrobiota baik dalam usus dan meningkatkan bioaktivitasnya terhadap DMT2, sehingga kombinasi diet flavonoid dan serat dengan dosis yang tepat akan sangat baik untuk penderita DMT2 [39].

SIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa kombinasi flavonoid dan serat yang terdapat pada tepung kacang merah dan ekstrak kulit kacang hitam memiliki aktivitas antidiabetik yang kuat pada tikus Wistar yang diinduksi dengan *nicotinamide-streptozotocin*. Penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan berat badan, penurunan kadar glukosa darah puasa, peningkatan kadar insulin dan tidak adanya perubahan pada pulau *Langerhans* selama

28 hari dengan dosis kombinasi flavonoid dan serat paling baik pada 45 mg/0,5 g per kgBB. Penelitian ini belum melakukan pemeriksaan uji toksisitas bahan intervensi dan indikator aktivitas perbaikan kerusakan oksidatif, sehingga disarankan pada peneliti selanjutnya untuk melakukan pemeriksaan tersebut.

DAFTAR RUJUKAN

- [1] J. Harreiter and M. Roden, "Diabetes Mellitus: Definition, Classification, Diagnosis, Screening and Prevention (Update 2023)," *Cent. Eur. J. Med.*, vol. 135, no. 2023, pp. 7–17, 2023, doi: 10.1007/s00508-022-02122-y.
- [2] P. E. Indonesia, "Pedoman Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 Dewasa di Indonesia 2021," in *Perkeni*, 2021, p. 46.
- [3] S. Padhi, A. K. Nayak, and A. Behera, "Type II Diabetes Mellitus: A Review on Recent Drug Based Therapeutics," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 131, no. 2020, pp. 1–23, 2020, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110708.
- [4] A. Chaudhury *et al.*, "Clinical Review of Antidiabetic Drugs: Implications for Type 2 Diabetes Mellitus Management," *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 8, no. 2017, pp. 1–12, 2017, doi: 10.3389/fendo.2017.00006.
- [5] M. Uusitupa, T. Khan, E. Viguiouk, and H. Kahleova, "Prevention of Type 2 Diabetes by Lifestyle Change: A Systematic Review and Meta-Analysis," *Nutrients*, vol. 11, no. 2611, pp. 1–22, 2019.
- [6] I. Medina-Vera *et al.*, "A Dietary Intervention with Functional Food Reduce Metabolic Endotoxaemia and Attenuates Biochemical abnormalities by Modifying Faecal Microbiota in people with Type 2 Diabetes," *Diabetes Metab.*, vol. 45, no. 2, pp. 122–131, 2019, doi: 10.1016/j.diabet.2018.09.004.
- [7] S. Xu, L. Qin, M. Mazhar, and Y. Zhu, "Functional Components Profile and Glycemic Index of Kidney Beans," *Front. Nutr.*, vol. 9, no. 2022, pp. 1–10, 2022, doi: 10.3389/fnut.2022.1044427.
- [8] C. Chávez-Mendoza and E. Sánchez, "Bioactive Compounds from Mexican Varieties of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Implications for Health," *Molecules*, vol. 22, no. 8, pp. 1–32, 2017, doi: 10.3390/molecules22081360.
- [9] N. Y. Lindawati and S. H. Ma'ruf, "Penetapan Kadar Total Flavonoid Ekstrak Etanol Kacang Merah (*Phaseolus Vulgaris* L.) dengan Metode Kompleks Kolorimetri Secara Spektrofotometri Visibel," *J. Ilm. Manuntung*, vol. 6, no. 1, pp. 83–91, 2020, doi: 10.51352/jim.v6i1.312.
- [10] M. F. Almuaigel, M. A. Seif, H. W. Albuali, O. Alharbi, and A. Alhawash, "Hypoglycemic and Hypolipidemic Effects of Aqueous Extract of *Phaseolus vulgaris* Pods in Streptozotocin-Diabetic Rats," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 94, no. 2017, pp. 742–746, 2017, doi: 10.1016/j.biopha.2017.07.135.
- [11] W. . Y. I. Widyasari, Moerfiah, "Pengaruh Pemberian Tepung Kacang Merah (*Phaseolus Vulgaris* L.) Terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus Galur Sprague-Dawley," *ANZDOC*, vol. 1, no. 2018, pp. 21–30, 2018, doi: 10.1002/ejoc.201200111.
- [12] J. Jayamanohar, P. B. Devi, D. Kavitate, V. B. Priyadarisini, and P. H. Shetty, "Prebiotic Potential Of Water Extractable Polysaccharide From Red Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris* L.)," *Lwt*, vol. 101, no. 2019, pp. 703–710, 2019, doi: 10.1016/j.lwt.2018.11.089.
- [13] M. A. G. Hernández, E. E. Canfora, J. W. E. Jocken, and E. E. Blaak, "The Short-Chain Fatty Acid Acetate in Body Weight Control and Insulin Sensitivity," *Nutrients*, vol. 11, no. 8, pp. 1–32, 2019, doi: 10.3390/nu11081943.
- [14] C. H. Kim, "Microbiota Or Short-Chain Fatty Acids: Which Regulates Diabetes?, Cellular And Molecular Immunology," *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 15, no. 2, pp. 88–91, 2018, doi: 10.1038/cmi.2017.57.
- [15] J. Y. Wang *et al.*, "Extracts Of Black Bean Peel And Pomegranate Peel Ameliorate Oxidative Stress-Induced Hyperglycemia In Mice," *Exp. Ther. Med.*, vol. 9, no. 1, pp. 43–

- 48, 2015, doi: 10.3892/etm.2014.2040.
- [16] M. Kim, D. K. Kim, and Y. S. Cha, "Black Adzuki Bean (*Vigna angularis*) Extract Protects Pancreatic β Cells and Improves Glucose Tolerance in C57BL/6J Mice Fed a High-Fat Diet," *J. Med. Food*, vol. 19, no. 5, pp. 442–449, 2016, doi: 10.1089/jmf.2015.3598.
- [17] K. Luc, A. Schramm-Luc, T. J. Guzik, and T. P. Mikolajczyk, "Oxidative Stress and Inflammatory Markers in Prediabetes and Diabetes," *J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 70, no. 6, pp. 809–824, 2019, doi: 10.26402/jpp.2019.6.01.
- [18] T. Hussain *et al.*, "Flavonoids And Type 2 Diabetes : Evidence Of Efficacy In Clinical And Animal Studies And Delivery Strategies To Enhance Their Therapeutic Efficacy," *Pharmacol. Res.*, vol. 152, no. 2020, pp. 1–75, 2020, doi: 10.1016/j.phrs.2020.104629.
- [19] B. L. Furman, "Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats," *Curr. Protoc.*, vol. 1, no. 4, pp. 1–21, 2021, doi: 10.1002/cpz1.78.
- [20] M. J. Huerkamp, "Management of Laboratory Animals," *MSD Manual Veterinary Manual*, vol. 22, no. October. p. <https://www.msdsvetmanual.com/exotic-and-laboratory>, 2023.
- [21] L. Fitria, F. Lukitowati, and D. Kristiawati, "Nilai Rujukan Untuk Evaluasi Fungsi Hati Dan Ginjal Pada Tikus (*Rattus Norvegicus Berkenhout, 1769*) Galur Wistar," *J. Pendidik. Mat. dan IPA*, vol. 10, no. 2, pp. 243–258, 2019, doi: 10.26418/jpmipa.v10i2.34144.
- [22] F. Husna, F. D. Suyatna, W. Arozal, and E. H. Purwaningsih, "Model Hewan Coba pada Penelitian Diabetes," *Pharm. Sci. Res.*, vol. 6, no. 3, pp. 131–141, 2019, doi: 10.7454/psr.v6i3.4531.
- [23] B. E. Prasetyo, D. Rafika, L. Laila, and F. Aminah, "Physical Evaluation and Anti-Aging Effect of Red Bean Ethanolic Extract (*Vigna angularis* (Wild.) Ohwi & Ohashi) Peel-Off Gel Mask," *Open Access Maced. J. Med. Sci.*, vol. 7, no. 22, pp. 3907–3910, 2019, doi: 10.3889/oamjms.2019.531.
- [24] K. Liu, M. Luo, and S. Wei, "The bioprotective effects of polyphenols on metabolic syndrome against oxidative stress: Evidences and perspectives," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2019, no. 2019, pp. 1–16, 2019, doi: 10.1155/2019/6713194.
- [25] H. A. Pangastuti, D. R. Affandi, and D. Ishartani, "Karakterisasi Sifat Fisik dan Kimia Tepung Kacang Merah (*Phaseolus Vulgaris* L.) dengan Beberapa Perlakuan Pendahuluan," *J. Teknosains Pangan Januari J. Teknosains Pangan*, vol. 2, no. 2, pp. 20–29, 2013.
- [26] V. S. Harikrishnan, A. K. Hansen, K. S. P. Abelson, and D. B. Sørensen, "A Comparison of Various Methods of Blood Sampling in Mice and Rats: Effects on Animal Welfare," *Lab. Anim.*, vol. 52, no. 3, pp. 253–264, 2018, doi: 10.1177/0023677217741332.
- [27] D. Carper, M. Coué, C. Laurens, D. Langin, and C. Moro, "Reappraisal of The Optimal Fasting Time for Insulin Tolerance Tests in Mice," *Mol. Metab.*, vol. 42, no. 2020, pp. 1–9, 2020, doi: 10.1016/j.molmet.2020.101058.
- [28] A. V. M. Association, *American Veterinary Medical Association Guidelines For The Euthanasia of Animals: 2020 Edition*. 2020.
- [29] J. Sy and L. C. Ang, "Microtomy: Cutting formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Sections," *Methods Mol. Biol.*, vol. 1897, no. 2019, pp. 269–278, 2019, doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5_23.
- [30] M. Brower, M. Grace, C. M. Kotz, and V. Koya, "Comparative Analysis of Growth Characteristics of Sprague Dawley Rats Obtained From Different Sources," *Lab. Anim. Res.*, vol. 31, no. 4, pp. 166–173, 2015, doi: 10.5625/lar.2015.31.4.166.
- [31] A. Ghasemi, S. Jeddi, and K. Kashfi, "The Laboratory Rat: Age and Body Weight Matter," *EXCLI J.*, vol. 20, no. 2021, pp. 1431–1445, 2021, doi: 10.17179/excli2021-4072.
- [32] Subiyono, M. A. Martsiningsih, and D. Gabrela, "Gambaran Kadar Glukosa Darah Metode GOD-PAP (Glucose Oksidase – Peroxidase Aminoantipirin) Sampel Serum dan Plasma EDTA (Ethylene Diamin Terta Acetat)," *J. Teknol. Lab.*, vol. 5, no. 1, pp. 45–48, 2016.
- [33] C. K. Sun *et al.*, "Slide-Free Imaging of Hematoxylin-Eosin Stained Whole-Mount

- Tissues Using Combined Third-Harmonic Generation and Three-Photon Fluorescence Microscopy,” *J. Biophotonics*, vol. 12, no. 2019, pp. 1–21, 2019, doi: 10.1002/jbio.201800341.
- [34] Sugiyono, *Statistik untuk Penelitian*. 2019.
- [35] D. Setyawan, *Statistika untuk Kedokteran dan Kesehatan*. 2019.
- [36] N. Rachdaoui, “Insulin: The Friend and The Foe in The Development of Type 2 Diabetes Mellitus,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 5, pp. 1770–1790, 2020, doi: 10.3390/IJMS21051770.
- [37] A. Al-Awar *et al.*, “Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models,” *J. Diabetes Res.*, vol. 2016, no. 2016, pp. 1–12, 2016, doi: 10.1155/2016/9051426.
- [38] J. S. Skyler *et al.*, “Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis,” *Diabetes*, vol. 66, no. 2, pp. 241–255, 2017, doi: 10.2337/db16-0806.
- [39] J. Xiao, “Recent Advances in Dietary Flavonoids for Management of Type 2 Diabetes,” *Curr. Opin. Food Sci.*, vol. 44, no. 2022, pp. 1–6, 2022, doi: 10.1016/j.cofs.2022.01.002.
- [40] B. Dinda, M. Dinda, A. Roy, and S. Dinda, *Dietary Plant Flavonoids in Prevention of Obesity and Diabetes*, vol. 120. Elsevier Ltd, 2020.
- [41] S. M. Marshall, “The Pancreas In Health and In Diabetes,” *Diabetologia*, vol. 63, no. 10, pp. 1962–1965, 2020.
- [42] Y. Wang-Fischer and T. Garyantes, “Improving The Reliability and Utility of Streptozotocin-Induced Rat Diabetic Model,” *J. Diabetes Res.*, vol. 2018, no. 2018, pp. 1–14, 2018, doi: 10.1155/2018/8054073.
- [43] A. Hosseini, B. M. Razavi, M. Banach, and H. Hosseinzadeh, “Quercetin and Metabolic Syndrome: A review,” *Phyther. Res.*, vol. 35, no. 10, pp. 5352–5364, 2021, doi: 10.1002/ptr.7144.
- [44] M. Tanaka, Y. Honda, S. Miwa, R. Akahori, and K. Matsumoto, “Comparison of The Effects of Roasted and Boiled Red Kidney Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on Glucose/Lipid Metabolism and Intestinal Immunity in a High-Fat Diet-Induced Murine Obesity Model,” *J. Food Sci.*, vol. 84, no. 5, pp. 1180–1187, 2019, doi: 10.1111/1750-3841.14583.
- [45] S. Hu, R. Kuwabara, B. J. de Haan, A. M. Smink, and P. de Vos, “Acetate and Butyrate Improve β -cell Metabolism and Mitochondrial Respiration under Oxidative Stress,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 4, pp. 1–17, 2020, doi: 10.3390/ijms21041542.
- [46] D. Fonseca Hernández, L. Mojica, M. A. Berhow, K. Brownstein, E. Lugo Cervantes, and E. Gonzalez de Mejia, “Black and Pinto Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Unique Mexican Varieties Exhibit Antioxidant and Anti-Inflammatory Potential,” *Food Res. Int.*, vol. 169, no. 2022, pp. 1–14, 2023, doi: 10.1016/j.foodres.2023.112816.
- [47] A. N. Reynolds, A. P. Akerman, and J. Mann, “Dietary Fibre and Whole Grains in Diabetes Management: Systematic Review and Meta-Analyses,” *PLoS Med.*, vol. 17, no. 3, pp. 1–22, 2020, doi: 10.1371/journal.pmed.1003053.