

Profil Fitoestrogen Kacang Gude (*Cajanus cajan*) dalam Darah, Urin dan Feses pada Tikus Putih Betina

CN Primiani[✉], Pujiati

Pendidikan Biologi FPMIPA IKIP PGRI Madiun, Indonesia

Info Artikel

Sejarah Artikel:
Diterima 11 Januari 2017
Disetujui 23 Maret 2017
Dipublikasikan 1 April 2017

Keywords:
phytoestrogens profile;
pigeon pea; daidzein;
metabolism

Abstrak

Pengembangan kacang gude sebagai sumber fitoestrogen merupakan salah satu upaya pelestarian keragaman hayati. Tujuan penelitian ini untuk menganalisis metabolisme fitoestrogen kacang gude dalam tubuh dan retensinya dalam jaringan. Hewan coba menggunakan sembilan ekor tikus putih betina galur Sprague Dawley umur 6-7 bulan, dan dikelompokkan menjadi 3 kelompok. Kelompok I kontrol (P1), kelompok II diberi larutan kacang gude perbandingan 24g : 24ml (P2) dan kelompok III diberi larutan kacang gude perbandingan 8g : 24ml (P3). Pemberian larutan kacang gude menggunakan sonde, dimasukkan dalam lambung. Darah, urin, dan feses dikoleksi pada jam ke-8, ke-16, dan ke-24 (fraksi I, fraksi II, dan fraksi III) setelah pemberian kacang gude. Analisis fitoestrogen daidzein dalam darah, urin, dan feses dilakukan menggunakan high performance liquid chromatography (HPLC). Hasil analisis menunjukkan kadar daidzein kacang gude di darah lebih tinggi daripada di urin dan feses. Kadar daidzein meningkat pada fraksi II dan menurun pada fraksi III. Daidzein mengalami absorpsi, distribusi, ekskresi, dan retensi di dalam jaringan. Retensi fitoestrogen daidzein dalam jaringan sebesar 95,472%.

Abstract

The purpose of this research to analyze the metabolism of phytoestrogens pigeon pea in the body and its retention in the tissues. Animals used nine female Sprague-Dawley rats 6-7 months. The rats were grouped into 3 treatment groups. The first group was the control (P1), the second group contained those given a solution of pigeon pea seeds under the ratio of 24g : 24ml (P2) and the third group was given a solution of pigeon pea seeds under 8g : 24ml ratio (P3). The provision of pigeon pea solution by gavage using a sonde into the stomach. Blood, urine, and feces were collected on the hour all 8 hours of the 16th, and the 24th hour (fractions I, II fractions and fractions III). Analysis of phytoestrogen daidzein in the blood, urine, and feces was performed using high performance liquid chromatography (HPLC). The analysis showed that the levels of daidzein pigeon pea in the blood is higher than the levels in the urine and feces. Daidzein levels increased in the second fraction and decreases in fraction III. Daidzein experiencing absorption, distribution, excretion and retention in the tissues. Retention phytoestrogen daidzein in tissue 95.472%

© 2017 Universitas Negeri Semarang

[✉] Alamat korespondensi:
E-mail: primiani@ikippgrmadiun.ac.id

ISSN 0215-9945

PENDAHULUAN

Berbagai spesies tumbuhan sebagai bagian dari keanekaragaman hayati, dapat tumbuh baik di wilayah Nusantara. Keragaman spesies sebagian besar tumbuhan lokal sangat berpotensi untuk dikembangkan sebagai tumbuhan obat. Eksplorasi tumbuhan yang berpotensi dikembangkan sebagai bahan obat herbal sebagai salah satu kekayaan budaya bangsa belum dilakukan secara optimal. Bahan obat sintesis menjadi pilihan utama masyarakat dalam pencegahan dan pengobatan penyakit, karena dianggap lebih efektif dan efisien. Salah satu bahan sintesis dalam bidang kesehatan adalah penggunaan terapi hormon estrogen.

Penggunaan bahan sintesis dalam bidang kesehatan menjadi pilihan masyarakat, karena dianggap lebih praktis dan lebih cepat memberikan kesembuhan. Tenaga kesehatan selalu merekomendasikan penggunaan bahan sintesis sebagai bahan pencegahan dan pengobatan penyakit. Masyarakat belum mengerti efek samping yang ditimbulkan akibat penggunaan bahan obat sintesis. Penggunaan bahan sintesis dalam waktu lama dapat memberikan efek samping dalam sistem tubuh. Hasil penelitian Primiani (2015) menunjukkan bahwa pemberian bahan sintesis daidzein menyebabkan nekrosis dan degenerasi melemak pada hati dan ginjal tikus.

Analisis farmakokinetik dan farmakodinamik pada bahan sintesis lebih mudah dibandingkan pada bahan alam karena mekanismenya berdasarkan satu senyawa aktif. Metabolisme satu bahan aktif dalam proses absorpsi, distribusi dan ekskresi lebih cepat dibandingkan senyawa kompleks. Bahan alam mengandung kompleksitas senyawa, sehingga proses metabolismenya menjadi lebih kompleks dan waktunya lebih lama. Senyawa multi komponen bahan alam berinteraksi dalam sistem tubuh, sehingga memberikan sifat lebih stabil, meskipun dalam waktu lama. Senyawa bahan alam bekerja saling berinteraksi dan bersinergi, memberikan efek fisiologis yang sangat efektif (Xiang *et al.* 2011).

Salah satu bahan alam yang mempunyai struktur senyawa kompleks mirip hormon estrogen adalah kacang gude (*Cajanus cajan*). Kacang gude merupakan salah satu Leguminoceae

lokal yang belum optimal dimanfaatkan sebagai tumbuhan estrogenik. Berdasarkan struktur senyawa kimianya, maka kacang gude sering disebut fitoestrogen. Struktur kimia fitoestrogen mirip hormon estrogen, sehingga efeknya terhadap tubuh juga mirip hormon estrogen. Masyarakat belum mengenal kacang gude, karena pembudidayaannya tidak secara meluas seperti kedelai. Kacang gude ditanam di pekarangan rumah, sehingga produksinya masih terbatas untuk sayuran.

Pengembangan kacang gude sebagai fitoestrogen diperlukan pengujian terus menerus, secara preklinis dan klinis. Usaha mengembangkan kacang gude sebagai bahan obat herbal merupakan salah satu upaya pelestarian keragaman hayati. Tujuan penelitian adalah untuk menganalisis metabolisme fitoestrogen kacang gude dalam tubuh dan retensinya dalam jaringan, diharapkan kacang gude menjadi salah satu alternatif bahan estrogen alami yang lebih efektif dan efisien.

METODE

Hewan coba menggunakan sembilan ekor tikus putih betina Sprague Dawley 6-7 bulan, 160-200 gram, dipelihara di laboratorium Biosains Universitas Brawijaya. Hewan coba dikelompokkan 3 perlakuan. Pra perlakuan dilakukan aklimatisasi selama 7 hari, diletakkan dalam kandang kelompok sesuai masing-masing perlakuan. Perlakuan uji metabolisme, hewan coba dipindahkan dalam kandang metabolit selama 24 jam pertama. Kelompok I kontrol (P_0) kelompok II diberi larutan kacang gude perbandingan 24g:24ml (P_2) dan kelompok III diberi larutan kacang gude perbandingan 8g:24ml (P_3). Pemberian larutan kacang gude menggunakan sonde, dimasukkan ke dalam lambung. Darah, urin, dan feses dikoleksi pada jam ke-8, jam ke-16, dan jam ke-24 (fraksi I, fraksi II, dan fraksi III) setelah perlakuan. Analisis fitoestrogen daidzein dalam darah, urin, dan feses dilakukan menggunakan metode *high performance liquid chromatography* (HPLC).

Analisis darah, urin, dan feses metode HPLC diadopsi dan dikembangkan dari Murphy (1980) dan Idridge (1982)

associates, Deerfield, IL) untuk dianalisis dengan HPLC Shimadzu.

Preparasi sampel darah

Sampel darah diambil sebanyak 50 μ l ditempatkan dalam erlenmeyer bertutup, ditambahkan 10 ml asetonitril, 2 ml HCl 0,1 M dan 5 ml akuades, selanjutnya diaduk menggunakan *stirer* selama 2 jam pada suhu ruang. Larutan disaring menggunakan kertas saring Whatmann No.42 dan diambil filtratnya. Filtrat dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu < 30° C. Residu hasil evaporasi dilarutkan dengan 10 ml metanol grade HPLC 80% dalam air, kemudian disaring menggunakan perangkat saring dengan filter 0,45 μ m *polytetrafluoroethylene* (Alltech associates, Deerfield, IL) untuk dianalisis dengan HPLC Shimadzu.

Preparasi sampel urin

Sampel urin diambil sebanyak 0,5 ml ditempatkan dalam erlenmeyer bertutup, ditambahkan 10 ml asetonitril, 2 ml HCl 0,1 M dan 5 ml aquades, selanjutnya diaduk menggunakan *stirer* selama 2 jam pada suhu ruang. Larutan disaring menggunakan kertas saring Whatmann No.42 dan diambil filtratnya. Filtrat dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* suhu < 30° C. Residu hasil evaporasi dilarutkan menggunakan 10 ml metanol grade HPLC 80% dalam air, kemudian disaring menggunakan perangkat saring dengan filter 0,45 μ m *polytetrafluoroethylene* (Alltech associates, Deerfield, IL) untuk dianalisis dengan HPLC Shimadzu.

Preparasi sampel feses

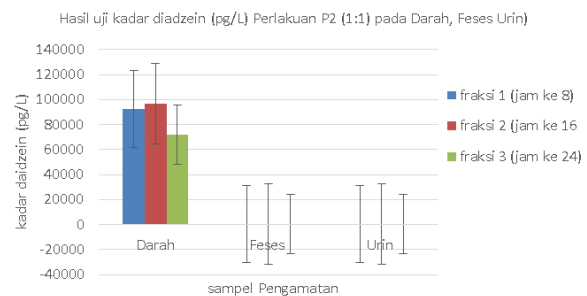
Sampel feses diambil sebanyak 0,5 g ditempatkan dalam erlenmeyer bertutup, ditambahkan 10 ml asetonitril, 2 ml HCl 0,1 M dan 5 ml aquades, selanjutnya diaduk menggunakan *stirer* selama 2 jam pada suhu ruang. Larutan disaring menggunakan kertas saring Whatmann No.42 dan diambil filtratnya. Filtrat dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu < 30° C. Residu hasil evaporasi dilarutkan dengan 10 ml metanol grade HPLC 80% dalam air, kemudian disaring menggunakan perangkat saring dengan filter 0,45 μ m *polytetrafluoroethylene* (Alltech

Analisis HPLC

HPLC yang digunakan spesifikasi C18, larutan fase gerak menggunakan asam asetat glasial 0,1% dalam air dan 0,1% asam asetat glasial dalam asetonitril. Injeksi sampel 20 μ l Kecepatan alir larutan 1 ml/menit, detektor photodiode pada τ 255 – 300 nm, temperatur kolom 25°C, *flow rate* 0,8 ml/menit, *wavelength* 255 nm, *running time* 40 menit, *post running time* 15 menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

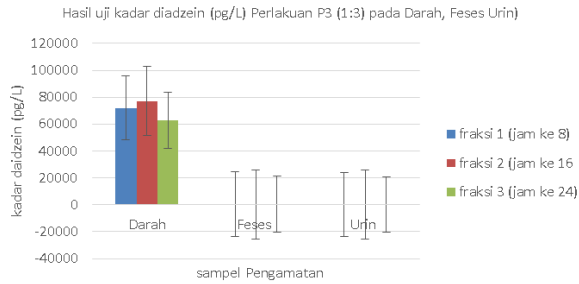
Hasil analisis HPLC menunjukkan bahwa kadar isoflavon daidzein dalam darah, urin, dan feses pada tiga fraksi I, II, dan III dalam perlakuan larutan kacang gude 24g : 24ml (Gambar 1).



Gambar 1. Kadar daidzein darah, urin, dan feses perlakuan larutan kacang gude 24g : 24ml (P₂)

Kadar daidzein dalam darah lebih tinggi daripada dalam urin dan feses. Kadar daidzein dalam darah, urin, dan feses pada fraksi I meningkat, mencapai optimum pada fraksi II, kemudian menurun pada fraksi III.

Hasil analisis HPLC menunjukkan bahwa kadar isoflavon daidzein dalam darah, urin, dan feses pada tiga fraksi I, II, dan III dalam perlakuan larutan kacang gude 8g:24ml (P₃) (Gambar 2).



Gambar 2. Kadar Daidzein Darah, Urin, dan Feses Perlakuan Larutan Kacang Gude 8g : 24ml (P₃)

Kadar daidzein dalam darah lebih tinggi daripada dalam urin dan feses. Kadar daidzein dalam darah, urin, dan feses pada fraksi I meningkat, mencapai optimum pada fraksi II, kemudian menurun pada fraksi III.

Metabolisme daidzein terjadi dalam plasma darah, urin, dan feses sebagai hasil biotransformasi oleh mikroorganisme usus. Absorpsi daidzein tergantung dari enzim spesifik pada vili-vili usus halus *enterocytes* yang menghidrolisis struktur gula. Daidzein kemungkinan diabsorpsi secara langsung atau dimetabolisme lebih lanjut oleh mikroflora usus. Berdasarkan Gambar 1 dan Gambar 2, proses absorpsi, distribusi dan ekskresi daidzein terjadi dalam 8 jam, hal ini dapat diamati bahwa pada fraksi 1, 2 dan 3 daidzein dapat dianalisis melalui metode HPLC.

Isoflavon daidzein merupakan salah satu komponen senyawa kimia kacang gude yang akan mengalami proses absorpsi dan distribusi dalam sistem tubuh. Pemberian larutan kacang gude merupakan suatu perlakuan menggunakan bahan alam, sehingga tidak hanya daidzein saja yang berperan. Proses absorpsi terjadi di dalam darah, kadar daidzein pada perlakuan P₂ meningkat mulai

dari fraksi I (92773,474 pg/l), mencapai kadar optimum pada fraksi II (96766,278 pg/l), dan menurun pada fraksi III (72033,062 pg/l). Demikian juga kadar daidzein pada perlakuan P₃ meningkat mulai dari fraksi I (72033,062 pg/l), mencapai kadar optimum pada fraksi II (77165,830 pg/l), dan menurun pada fraksi III (62819,248 pg/l).

Distribusi terjadi di dalam jaringan, fitoestrogen akan berikatan dengan reseptor estrogen, sehingga terjadi perubahan terhadap struktur jaringan. Retensi isoflavon daidzein di jaringan/organ dapat dianalisis dengan menghitung selisih antara retensi total dengan retensi daidzein dalam darah. Proses metabolisme isoflavon daidzein dilanjutkan dengan proses ekskresi, kadar isoflavon daidzein dapat dianalisis melalui urin dan feses.

Berdasarkan Gambar 1 dan Gambar 2, kadar isoflavon daidzein dalam urin dan feses lebih rendah dibandingkan dalam darah. Kebutuhan estrogen dalam jaringan/organ tinggi, sehingga jumlah estrogen yang diekskresikan lebih rendah daripada kadarnya dalam darah. Struktur kimia daidzein mirip estrogen, seperti halnya estrogen endogen, daidzein mengalami sirkulasi enterohepatik yang disekresikan dalam empedu dan diekskresikan secara lambat melalui urin dan feses (Pottenger 2000; Kim *et al.* 2008). Perubahan struktur jaringan akibat proses metabolisme kacang gude dalam tubuh, dapat dianalisis adanya jumlah retensi kacang gude (isoflavon daidzein) dalam jaringan jaringan pada fraksi I, II, dan III (Tabel 1).

Tabel 1. Analisis Retensi Daidzein dalam darah dan Organ pada Fraksi I, II, dan III

Bahan	Fraksi ke-	Jumlah intake (µg)	Jumlah yang dikeluarkan urin (µg)	Jumlah yang dikeluarkan feses (µg)	Jumlah yang dikeluarkan (µg)	Retensi (µg)	Kandungan dalam darah (µg)	Retensi dalam darah (%)	Retensi dalam jaringan (%)
P ₂	1	29,776	0,001	0,002	0,003	29,773	0,906	3,044	98,021
	2	29,776	0,001	0,002	0,002	29,774	0,945	3,175	97,883
	3	29,776	0,000	0,001	0,001	29,774	0,835	2,807	97,192
P ₃	1	12,193	0,000	0,001	0,002	12,191	0,703	5,772	94,837
	2	12,193	0,000	0,001	0,001	12,192	0,748	6,135	93,864
	3	12,193	0,000	0,001	0,001	12,192	0,613	5,034	94,966

Ket: larutan biji kacang gude 24g : 24ml (P₂); larutan biji kacang gude 8g : 24ml (P₃)

Tabel 1 menunjukkan bahwa retensi isoflavon daidzein dalam darah mengalami penurunan pada fraksi III. Isoflavon daidzein yang diekskresikan melalui urin dan feses sangat sedikit, dibandingkan dengan jumlah *intake* (Tabel 1). Proses sirkulasi dan distribusi isoflavon daidzein ke jaringan, menyebabkan adanya retensi senyawa di dalam darah dan jaringan. Hasil analisis retensi isoflavon daidzein dalam darah dan jaringan menunjukkan bahwa isoflavon daidzein mengalami proses absorpsi, kemudian terdistribusi di seluruh jaringan. Struktur kimia daidzein mirip estrogen, sehingga di dalam sel, daidzein berikatan dengan reseptor estrogen. Ikatan dengan reseptor estrogen akan memberikan potensi estrogenik di jaringan. Fitoestrogen mempunyai afinitas ikatan dengan reseptor estrogen serta memiliki aktivitas mirip estrogen (Jagla 2010; Milligan & Kalita 2010; Orhan *et al.* 2011).

Isoflavon merupakan salah satu metabolit sekunder yang tersebar di berbagai tumbuhan sebagai bentuk glikosida *6''-O-malonyl-7-O-β-D-glucoside* dan *6''-O-acetyl-7-O-β-D-glucosida* yang secara biologis inaktif (Brown & Setchell 2001; Wiseman *et al.* 2002). Absorpsi efektif isoflavon membutuhkan konversi bentuk glikosida menjadi bioaktif aglikon dengan bantuan β glikosidase yang berasal dari bakteri intestinum tenue dan intestinum crassum (Ioku *et al.* 1998; Setchell 2000). Mikroflora usus berperan penting dalam mendegradasi isoflavon sehingga memberi kontribusi dalam bioavailabilitas. Menurut Zhang *et al.* (1999) mikroflora usus berperan penting dalam mendegradasi isoflavon sehingga memberi kontribusi dalam bioavailabilitas. Isoflavon sangat baik diabsorpsi meskipun prosesnya sangat lambat (Shelnutt *et al.* 2000). Menurut Watanabe *et al.* (1998) isoflavon dalam bentuk glikosida tidak diabsorpsi secara utuh oleh sirkulasi intestinal. Ditemukan adanya bukti bahwa bentuk glikosidanya mengalami hidrolisa oleh β glukosidase, yang berperan dalam bioavailabilitas.

SIMPULAN

Kacang gude dalam sistem organ mengalami proses metabolisme. Kadar fitoestrogen daidzein

dalam darah lebih tinggi dibandingkan kadarnya dalam urin dan feses. Retensi isoflavon daidzein dalam darah P₂ adalah 3,008% dan P₃ adalah 5,647%. Retensi isoflavon daidzein dalam jaringan P₂ adalah 97,698% dan P₃ adalah 94,556%. Retensi isoflavon daidzein dalam jaringan tinggi, sehingga kacang gude mempunyai potensi baik pada organ. Proses metabolisme dan potensi estrogenik kacang gude dalam organ, memungkinkan kacang gude dapat dikembangkan sebagai bahan estrogen alami.

DAFTAR PUSTAKA

- Brown NM & Setchell. 2001. Animal models Impacted by phytoestrogens in commercial chow: implications for pathways influenced by hormones. *Lab Invest* 81:735-747.
- Idridge AC. 1982. High Performance Liquid Chromatography Separation of Soybean Isoflavones and Their Glucosides. *J Chromatogr.* 234:494-496.
- Ioku K, Pongpiriyadacha Y, Konishi Y, Takei Y, Nakatani N & Terao J. 1998. B-glucosidase activity in the rat small intestine toward quercetin monoglucosides. *Biosci Biotechnol Biochem.* 62:1428-1431.
- Jagla F, Riečansky L & Pilsakova L. 2010. The physiological actions of isoflavone phytoestrogens. *Physiol Res.* 59:651-664.
- Kim M, Han J, & Kim SU. 2008. Isoflavone daidzein: chemistry and bacterial metabolism. *J Appl Biol Chem.* 51(6):253-261.
- Milligan SR & Kalita JC. 2010. In vitro estrogenic potency of phytoestrogen-glycosides and some plant flavanoids. *Indian J Sci Technol* 3(12):1142-1147.
- Murphy PA. 1980. Separation of genistin, daidzin, and their aglycones and coumestrol by gradient high performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 211:166-169
- Orhan LE, Tosun F, Tamer U, Duran A, Alan B. & Kok AF. 2011. Quantification of genistein and daidzein in two endemic genista species and their antioxidant activity. *J Serb Chem Soc.* 76(1):35-42.
- Pottenger LH, Domoradzki JY, Markham DA, Hansen SC, Cagen SZ & Waechter JM. 2000. The relative bioavailability and metabolism of bisphenol a in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol. Sci.* 54:3-28.
- Primiani CN. 2015. Pemanfaatan bahan alam lokal bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) dan alpukat (*persea americana mill*) terhadap struktur

- jaringan hati dan ginjal tikus putih. Prosiding Seminar Nasional Biologi, 6 Agustus 2015. pp. 21-26, Universitas Diponegoro.
- Shelnutt SR, Cimino CO & Wiggins PA. 2000. Urinary pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9:413-419.
- Setchell KDR. 2000. Absorption and metabolism of soy Isoflavones from food to dietary supplements and adults to infants. *J Nutr.* 130:654S-655S.
- Watanabe S, Yamaguchi M, Sobue T, Takashi T, Miura T, Arai Y, Mazur W, Wahala K & Adlercrutz H. 1998. Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (Kinako). *J Nutr* 128: 1710-1715.
- Wiseman H, Casey K, Clarke DB, Barnes KA, Bowey E. 2002. Isoflavone aglycon and glucoconjugate content of high- and low-soy U.K. foods used in nutritional studies. *J Agric Food Chem.* 50:1404-1410.
- Xiang C, Qiao X, Wang Q, Li R, Miao W, Guo D & Ye M. 2011. From single compounds to herbal extract: a synergy to systematically characterize the metabolites of licorice in rats. *Drug Met Deposition.* 39(9):1597-1608.
- Zhang Y, Wang GJ, Song TT, Murphy PA, & Hendrich S. 1999. Urinary disposition of the soybean isoflavones daidzein, genistein, and glycitein differs among with moderate fecal isoflavone degradation activity. *J Nutr.* 129:957-962.