

Efek Total Antosianin dari Ubi Ungu (*Ipomoea batatas* L) Kultivar Gunung Kawi Terhadap Kadar Total Kolesterol dalam Lemak Viseral Zebrafish (*Danio rerio*) dengan Diet Induce Obesity (DIO)

Maria Karina Jaya Suwana*, Retty Ratnawati**, Edwin Widodo**

ABSTRAK

Lemak viseral merupakan deposit lemak terbesar pada manusia dan merupakan deposit yang patogenik. Hal ini berhubungan dengan faktor resiko penyakit pada jantung dan pembuluh darah yang juga merupakan penyebab kematian terbesar di dunia. Zebrafish dipilih sebagai hewan coba karena biaya pemeliharaannya yang relatif lebih murah, serta proses metabolisme pada tubuhnya yang mirip dengan manusia. Antosianin diketahui memiliki efek antioksidan, antiproliferatif dan menghambat sintesis kolesterol dengan mengaktifkan *Adenosine Monophosphate Protein Kinase* (AMPK) dan menurunkan ekspresi protein pada tingkat faktor transkripsi lipogenik yang salah satunya adalah Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c (SREBP-1c). Ubi ungu mengandung lebih banyak antosianin pada kulit dan dagingnya dibandingkan dengan ubi berwarna lain. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah ekstrak antosianin dari ubi ungu dapat mengambat peningkatan kadar kolesterol pada lemak viseral zebrafish. Dalam penelitian ini terdapat lima kelompok yaitu kontrol positif dengan perlakuan *diet induced obesity* (DIO), kontrol negatif, dan tiga kelompok lainnya yang diberi perlakuan DIO bersamaan dengan pemaparan ekstrak antosianin dengan dosis yang berbeda pada masing – masing kelompok. Variabel yang diukur adalah kadar total kolesterol dalam lemak viseral menggunakan prosedur *colormetric*. Setelah perlakuan selama 40 hari, hasil penelitian ini menunjukkan adanya kecenderungan penurunan kadar total kolesterol pada kelompok perlakuan dengan paparan antosianin, namun tidak terdapat perbedaan antara kelompok kontrol positif dan kelompok negatif yang diduga akibat rentang nilai standart deviasi yang lebar serta adanya pengaruh pemberian tricaine sebagai anestetik secara berulang. Kesimpulan dari penelitian ini adalah antosianin dapat menunjukkan kecenderungan penurunan kadar total kolesterol.

Kata kunci : Zebrafish, antosianin, total kolesterol, ubi ungu

The Effects of Total Anthocyanin from Purple Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L) Gunung Kawi Cultivar on Total Cholesterol Level in Zebrafish (*Danio rerio*) Visceral Fats with Diet Induced Obesity (DIO)

ABSTRACT

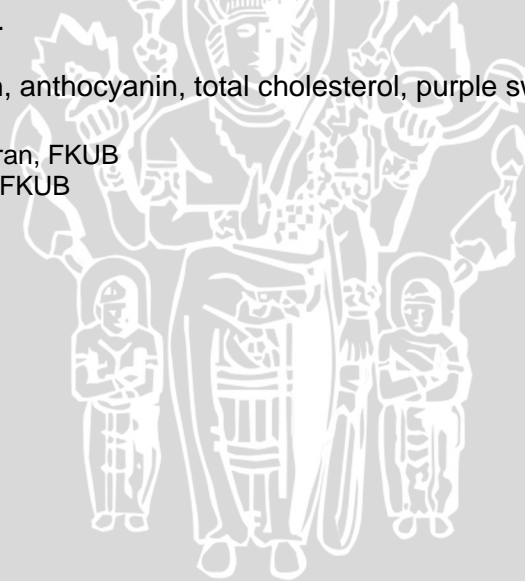
Visceral fats form the largest fats deposit in humans and considered as pathogenic deposit. It is associated with risk factor to heart and vascular disease which are the major cause of death in the world. In this research zebrafish are used because it has relatively low cost for it's maintenance and resembles similar

metabolic processes as human. Anthocyanin is known as antioxidant, antiproliferative, and inhibit cholesterol's synthesis with activate Adenosine Monophosphate Protein Kinase (AMPK) and decreased protein expression in lipogenic transcription factors level which one of it is Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c (SREBP1-c). Purple sweet potato contains more anthocyanine on its skin and flesh rather than other kind of sweet potato. This research aimed to know whether anthocyanin extract from purple sweet potato will inhibit cholesterol level elevation in zebrafish's visceral fats. The samples selected divided into five groups which are, positive control with diet induced obesity (DIO), negative control, and three other groups with DIO and anthocyanin extract given at the same time to each groups on different doses of anthocyanin. The variable measured was total cholesterol on visceral fats using colormetric procedures. After 40 days of treatment, there's tendency of decreased level of total cholesterol on groups with anthocyanin treatment, but there is no difference between control positive group and control negative group, allegedly because there is wide standard deviation and as the effects of tricaine use as anesthetic repeatedly. The conclusion is anthocyanin can lead to decreased tendency of total cholesterol levels.

Key words : Zebrafish, anthocyanin, total cholesterol, purple sweet potato

*Program Studi Kedokteran, FKUB

**Laboratorium Fisiologi FKUB



PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Lemak Viseral merupakan lemak yang berada didalam abdomen, dan merupakan deposit lemak terbesar pada manusia¹ beberapa penelitian menyebutkan bahwa lemak viseral merupakan deposit lemak yang patogenik² Hal ini berkorelasi dengan faktor resiko penyakit pada jantung dan pembuluh darah, penyakit metabolis, dan tanda inflamasi sistemik³, dimana menurut WHO 2014, dari 10 penyebab kematian terbesar di dunia pada tahun 2012, penyakit jantung iskemi menduduki peringkat pertama, dan stroke pada peringkat kedua. Pada pemeriksaan *computerized tomography* lemak viseral, menunjukkan hasil bahwa setiap individu dengan lemak viseral berlebih memiliki karakteristik dari perubahan resiko profil metabolis mereka⁴. Sindrom metabolik didefinisikan sebagai sekelompok faktor risiko serangan jantung paling berbahaya, meliputi diabetes dan peningkatan kadar glukosa darah puasa, obesitas abdomen, kadar kolesterol yang tinggi, dan tekanan darah tinggi⁵. Adanya hubungan kuat antara jumlah dan ukuran dari sel lemak dengan kandungan kolesterol adiposit dikarenakan semakin besar ukuran sel lemak, maka semakin banyak kolesterol yang terkandung didalamnya⁶. Rasio total kolesterol / HDL dapat menjadi pendekatan penilaian sederhana untuk resiko gangguan lipid dimana total kolesterol yang tinggi dapat menjadi penanda untuk lipoprotein aterogenik⁷. Ubi ungu (*Ipomoea batatas* L) memiliki kandungan flavonoid terutama antosianin dan asam fenolat yang lebih tinggi dibanding sayur - sayuran yang umum dijual seperti kubis dan

selada⁸. Antosianin memiliki efek untuk meningkatkan HDL dan menurunkan kadar LDL⁹. Selain itu, antosianin dapat menghambat sintesis kolesterol dengan mengaktifkan AMPK (*Adenosin Monofosfat Protein Kinase*) yang kemudian dapat menghambat HMG-CoA *reduktase*¹⁰. Tidak hanya di ubi ungu, namun antosianin juga banyak ditemukan pada buah - buah beri¹¹, teh hijau¹², dan banyak lagi lainnya. Zebrafish (*Danio rerio*) merupakan hewan bertulang belakang yang memiliki kesamaan struktur dengan manusia seperti organ - organ pencernaan, jaringan lemak, dan otot rangka sehingga dapat menjadi model yang cocok dalam penelitian mengenai penyakit - penyakit pada manusia¹³. Zebrafish merupakan model yang baik untuk metabolisme lemak pada vertebrata. Perawatan ikan ini juga tidak membutuhkan biaya yang besar. *Diet Induced Obesity* (DIO) yang di terapkan pada zebrafish akan menimbulkan jalur patofisiologi obesitas yang umum terjadi pada manusia¹⁴. Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui efek ekstrak antosianin dari ubi ungu (*Ipomoea batatas* L) kultivar Gunung Kawi pada obesitas melalui kadar total kolesterol dalam lemak viseral zebrafish (*Danio rerio*) dengan *Diet Induce Obesity* (DIO).

METODE PENELITIAN

Rancangan Penelitian

Penelitian yang dikerjakan adalah penelitian eksperimental laboratorium, dengan hewan coba zebrafish berusia 8 *mpf* yang dibagi menjadi 5 kelompok.

Total sampel yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah 25 ekor ikan berusia 8 *mpf* yang kemudian dibagi menjadi 5 kelompok, masing

– masing kelompok perlakuan yang terdiri dari 5 ekor ikan dipelihara di dalam 3.4 L akuarium. Kelima kelompok tersebut terdiri dari kelompok DIO, Non DIO, DIO+ 80 ppm/mL/ekor ekstrak antosianin; 120ppm/mL/ekor ekstrak antosianin; dan 160ppm/mL/ekor ekstrak antosianin.

Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tangki akuarium dengan kapasitas 60L, tangki akuarium dengan kapasitas 6.4L, heater, termometer, filter akuarium, aerator, plankton net 120 μ m, scalpel, Kit (*EnzymChromTM AF HDL and LDL/VLDL Assay Kit (E2HL-100)*), Centrifuges, mikropipet, vortex, tabung, label tabung, well reaksi, incubator. Bahan yang digunakan adalah zebrafish (*Danio rerio*) strain *wild-type*, artemia, antosianin, tetramin, akuades, larutan presipitasi, assay buffer, working reagen, tricaine.

Prosedur Penelitian

Zebrafish dibagi kedalam 5 aquarium, masing – masing aquarium berisi 5 ekor zebrafish. Perlakuan dilakukan selama 40 hari dengan kelompok kontrol negatif diberi perlakuan non DIO, kontrol positif perlakuan DIO, dan kelompok perlakuan A, B, dan C diberi DIO ditambah dengan paparan antosianin dengan dosis masing – masing yang berbeda.

Pada hari ke 41, seluruh zebrafish dipuasakan, dan pada hari ke 42 dilakukan pengambilan sampel dengan terlebih dahulu zebrafish di

anastesi menggunakan tricaine. Diseksi dilakukan pada abdomen dan kemudian diambil lemak visceral dan diproses dengan prosedur yang mengacu pada manual kit (*EnzymChromTM AF HDL and LDL/VLDL Assay Kit (E2HL-100)*), My biosource, USA.

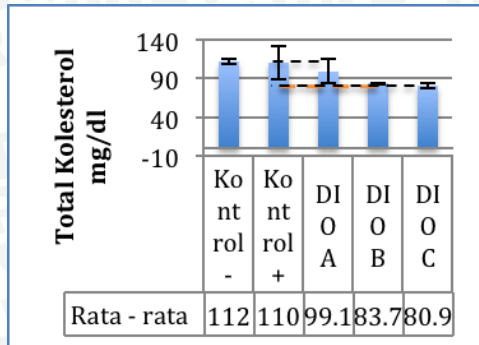
Analisa data

Seluruh data hasil pengukuran dan pengamatan dikumpulkan yang selanjutnya akan dilakukan analisis menggunakan statistik parametrik. Data hasil penelitian akan ditampilkan dalam bentuk $\text{mean} \pm \text{SD}$. Keseluruhan data kemudian dianalisis dengan menggunakan *One – Way Anova*. Syarat analisis ini adalah data harus terdistribusi normal dan homogeny. Untuk uji normalitas digunakan uji *Shapiro-wilk*, dan untuk uji homogenitas digunakan *Levene Test*. Apabila didapatkan perbedaan yang bermakna maka dilakukan uji untuk melihat besar perbedaan nilai tiap kelompok dengan uji *Post-Hoc Tukey* dan diartikan sebagai berbeda bermakna apabila $p < 0.05$.

HASIL PENELITIAN

Hasil analisa data kadar total kolesterol dalam lemak visceral dengan menggunakan uji *One-Way Anova* menunjukkan bahwa paparan antosianin ubi ungu memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kadar total kolesterol zebrafish dengan DIO, dengan nilai signifikansi $p = 0.026$ ($p < 0.05$).

Hasil pengukuran kadar total kolesterol dalam lemak visceral zebrafish disajikan dalam Gambar 1.



Gambar 1. Rata-rata Kadar Total Kolesterol dalam lemak visceral Zebrafish

Kadar Total Kolesterol dalam Lemak Visceral (mg/dL)			
Kelompok	Kadar (mg/dL)	Rata – rata	Standard Deviasi
Kontrol +	97.2644	110.1823	21.5419
	123.1003		
Kontrol –	110.0303	112.31	3.2238
	114.5896		
DIO A	98.1762	99.0881	15.8327
	99.9999		
DIO B	83.2826	83.7386	0.6447
	84.1945		
DIO C	81.9148	80.927	3.2298
	79.9392		

Keterangan :

K (-) : Kelompok kontrol negatif yaitu zebrafish normal

K (+) : Kelompok kontrol positif yaitu zebrafish dengan DIO (diberi artemia *nauplii* 60mg/hari/ekor)

DIO A : Kelompok zebrafish dengan DIO + paparan ekstrak antosianin 80ppm

DIO B : Kelompok zebrafish dengan DIO + paparan ekstrak antosianin 120ppm

DIO C : Kelompok zebrafish dengan DIO + paparan ekstrak antosianin 160ppm

PEMBAHASAN

Perlakuan yang diberikan selama

percobaan ini kepada zebrafish 8 mpf adalah paparan total antosianin ubi ungu dalam 3 konsentrasi yang berbeda yaitu, 80 ppm pada kelompok DIO A, 120 ppm pada kelompok DIO B, dan 160 ppm pada kelompok DIO C. Yang diamati pada penelitian ini adalah perubahan kadar total kolesterol pada zebrafish dengan uji *colormetric* dengan sampel lemak visceral zebrafish yang kemudian hasilnya dibandingkan antara masing – masing kelompok dengan kelompok kontrol.

Berdasarkan hasil penelitian nampak bahwa terdapat kecenderungan penurunan rata – rata kadar total kolesterol dengan hasil penelitian pada kelompok kontrol positif = (110.1824 ± 43.0838) dan kontrol negatif = (112.31 ± 6.4476) . Sedangkan pada kelompok perlakuan, DIO A = (99.0881 ± 31.6654) , DIO B = (83.7386 ± 1.2889) , dan DIO C = (80.9271 ± 6.4596) .

Pemberian dosis antosianin yang berbeda – beda pada tiap kelompok menunjukkan kecenderungan penurunan kadar total kolesterol apabila di bandingkan dengan kelompok kontrol positif dengan hasil sebagai berikut, pada kelompok DIO A ($p = 0.797$), pada kelompok DIO B ($p = 0.261$), dan pada kelompok DIO C ($p = 0.81$).

Adanya perubahan kadar total kolesterol yang cenderung menurun tersebut disebabkan oleh pemberian paparan ekstrak antosianin ubi ungu yang mengandung antosianin¹⁵. Antosianin memiliki efek sebagai antioksidan, antiproliferasi, antiinflamasi¹¹ serta efek menurunkan konsentrasi kolesterol¹⁰.

Perbandingan kadar total kolesterol

pada kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol negatif tidak terdapat perbedaan, hal ini dikarenakan nilai standart error untuk kelompok kontrol positif lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok negatif dengan nilai untuk kelompok kontrol positif sebesar 10.77 dan nilai standard error kelompok kontrol negatif 2.27. Selain itu, paparan pemberian tricaine methanesulfonate berulang (anestetik yang digunakan untuk pengukuran BMI ikan pada hari ke 0, 14, 20, 27, 34, dan 40) dapat mencetuskan peningkatan kadar glukosa darah pada ikan¹⁶ yang diduga juga dapat mempengaruhi metabolisme kolesterol pada ikan.

Hubungan antara pemberian paparan antosianin dengan penurunan kadar total kolesterol pada zebrafish disebabkan karena pemberian antosianin yang memberikan efek menurunkan ekspresi protein pada tingkat faktor transkripsi lipogenik yang salah satunya adalah SREBP-1c (*Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c*)¹⁷ dimana SREBP-1c ini merupakan salah satu kunci dari transkripsi regulator metabolisme kolesterol yang pada awalnya akan bertindak untuk meningkatkan namun kemudian menurunkan kadar kolesterol secara selular¹⁸. Selain itu, antosianin juga dapat mengaktifkan AMPK¹⁹ yang dapat menghambat sintesis kolesterol yang kemudian menyebabkan penurunan kadar kolesterol²⁰. Menurunnya kadar kolesterol tersebut berkaitan dengan menurunnya kadar total kolesterol dalam lemak visceral zebrafish pada seluruh kelompok perlakuan. Perbandingan antara kelompok kontrol positif dengan perlakuan DIO A ($p=0.797$), dengan kelompok

perlakuan DIO B ($p=0.261$), sedangkan pada kelompok DIO C ($p=0.081$). Namun pada ketiga kelompok tersebut, penurunan kadar total kolesterol yang terjadi tidak berbeda signifikan. Hal ini dapat disebabkan karena meskipun antosianin memiliki efek menurunkan kadar kolesterol, dan pada hasil penelitian ini nampak adanya kecenderungan penurunan kadar kolesterol pada kelompok perlakuan, namun data dari pengaruh antosianin pada kadar kolesterol dan kadar TG dapat tidak konsisten²¹.

KESIMPULAN

Pemberian antosianin ubi ungu (*Ipomoea batatas L*) pada zebrafish (*Danio rerio*) 8 mpf dengan *diet-induced obesity* (DIO) memberi hasil yang menunjukkan adanya kecenderungan penurunan kadar total kolesterol.

SARAN

1. Sebaiknya faktor – faktor yang dapat mempengaruhi penelitian seperti tingkat stress hewan coba, penggunaan anestetik (tricaine), serta makanan basal diperhatikan sehingga dapat meminimalkan bias hasil penelitian.
2. Menentukan dosis antosianin yang dapat menurunkan kadar total kolesterol secara signifikan.
3. Melakukan pemeriksaan profil lipid lengkap tidak hanya total kolesterol.
4. Dapat mengidentifikasi zebrafish jantan dan betina sebelum pembedahan sehingga dapat mengurangi bias akibat perbedaan jumlah lemak pada zebrafish jantan dan betina.

DAFTAR PUSTAKA

1. Rosito, G.A., Massaro, J.M., Hoffmann, U., Ruberg, F.L., Mahabadi, A.A., Vasan, R.S., *et al.* 2008. Pericardial fat, visceral abdominal fat, cardiovascular disease risk factors, and vascular calcification in a community-based sample the framingham heart study. *Circulation*, 117(5), pp.605-613.
2. de Vos, A.M., Prokop, M., Roos, C.J., Meijis, M.F., van der Schouw, Y.T., Rutten, A., *et al.* 2007. Peri-coronary epicardial adipose tissue is related to cardiovascular risk factors and coronary artery calcification in post-menopausal women. *European heart journal*.
3. Fox, C.S., Massaro, J.M., Hoffmann, U., Pou, K.M., Maurovich-Horvat, P., Liu, C.Y., *et al.* 2007. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation*, 116(1), pp.39-48.
4. Alberti, K.G.M.M., Zimmet, P. and Shaw, J., 2006. Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A consensus statement from the international diabetes federation. *Diabetic medicine*, 23(5), pp.469-480.
5. International Diabetes Federation. 2006. The IDF Consensus Worldwide Definition of The Metabolic Syndrome. (Online). ([https://www.idf.org/webdata/docs/IDF Meta def final.pdf](https://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Meta_def_final.pdf) / diakses 12 November 2016)
6. Le Lay, S., Ferré, P. and Dugail, I., 2004. Adipocyte cholesterol balance in obesity. *Biochemical Society Transactions*, 32(1), pp.103-106.
7. National Cholesterol Education Program. 2002. Detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). NIH Publication No. 02-5215 (p)3184.
8. Kaur C, and Kapoor HC. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables – The millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 703–725.
9. Qin Y, Xia M, Ma J, Hao YT, Liu J, Mou HY, *et al.* 2009. Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. *Am J Clin Nutr* 2009;90:485–92.
10. Graf, D., Seifert, S., Jaudszus, A., Bub, A. and Watzl, B., 2013. Anthocyanin-rich juice lowers serum cholesterol, leptin, and resistin and improves plasma fatty acid composition in fischer rats. *PLoS one*, 8(6), p.e66690.
11. Bowen-Forbes, C.S., Zhang, Y. and Nair, M.G., 2010. Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of food composition and analysis*, 23(6), pp.554-560.

12. Hasumura, T., Shimada, Y., Kuroyanagi, J., Nishimura, Y., Meguro, S., Takema, Y. and Tanaka, T., 2012. Green Tea Extract Suppresses Adiposity and Affects The Expression of Lipid Metabolism Genes in Diet-induced Obese Zebrafish. *Nutrition & metabolism*, 9(1), p.1.
13. Oka T, Nishimura Y, Zang L, Hirano M, Shimada Y, Wang Z, *et al.* 2010. Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. *BMC Physiology* 10:21.
14. Meguro S, Hasumura T, and Hase T. 2015. Body Fat Accumulation in Zebrafish Is Induced by a Diet Rich in Fat and Reduced by Supplementation with Green Tea Extract. *PLoS ONE* 10(3): e0120142.
15. Teow CC, Truong VD, McFeeters RF, Thompson RL, Pecota KV, Yencho GC. 2007. Antioxidant activities, phenolic and β -carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food chemistry* 103(3):829-38.
16. Carter, K.M., Woodley, C.M. and Brown, R.S., 2011. A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 21(1), pp.51-59.
17. Lee, B., Lee, M., Lefevre, M. and Kim, H.R., 2014. Anthocyanins inhibit lipogenesis during adipocyte differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Plant foods for human nutrition*, 69(2), pp.137-141.
18. Hölttä-Vuori, M., Salo, V.T., Nyberg, L., Brackmann, C., Enejder, A., Panula, P., *et al.* 2010. Zebrafish: gaining popularity in lipid research. *Biochemical Journal*, 429(2), pp.235-242.
19. Takikawa, M., Inoue, S., Horio, F. and Tsuda, T., 2010. Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *The Journal of nutrition*, 140(3), pp.527-533.
20. Towler, M.C. and Hardie, D.G., 2007. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circulation research*, 100(3), pp.328-341.
21. Basu, A., Rhone, M. and Lyons, T.J., 2010. Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutrition reviews*, 68(3), pp.168-177.