

## PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN E TERHADAP KADAR MALONDIALDEHID PLASMA PADA TIKUS YANG DIBERI PAKAN LEMAK TINGGI

### THE EFFECT OF VITAMIN E ON THE PLASMA MALONDIALDEHYDE CONCENTRATION ON RAT FED HIGH FAT DIET

Sapto Yuliani<sup>1</sup>, Wasito<sup>2</sup>, Hastari Wuryastuti<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan

<sup>2</sup>Bagian Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada

<sup>3</sup>Bagian Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada

#### ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian vitamin E terhadap kadar malondialdehid plasma pada tikus Wistar yang diberi pakan lemak tinggi. Tigapuluh ekor tikus umur 3 bulan dengan berat badan berkisar antara 182-250 gram, dibagi secara acak menjadi 6 kelompok masing-masing 5 ekor. Kelompok I diberi pakan basal (kontrol), kelompok II diberi pakan lemak tinggi dan vitamin E 30 IU, kelompok III pakan lemak tinggi dan vitamin E 60 IU, kelompok IV diberi pakan lemak tinggi dan vitamin E 120 IU, kelompok V diberi pakan lemak tinggi dan vitamin E 240 IU, kelompok VI diberi pakan lemak tinggi dan vitamin E 480 IU, *ad libitum* selama 12 minggu. Sebelum perlakuan darah diambil dari semua tikus untuk pemeriksaan kadar MDA plasma dan vitamin E serum. Pemeriksaan darah diulang pada akhir perlakuan. Analisis MDA plasma dilakukan dengan spektrofotometer dan analisis vitamin E serum dengan HPLC. Dari hasil analisis statistik menggunakan pola faktorial yang dilanjutkan dengan uji Dunnet's menunjukkan bahwa pemberian vitamin E sebanyak 120 IU (kel. IV), 240 IU (kel.V) dan 480 IU (kel. VI) menyebabkan penurunan secara signifikan ( $P < 0,05$ ) kadar MDA plasma. Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian vitamin E lebih dari 60 IU setiap hari pada tikus yang diberi lemak tinggi dapat menurunkan kadar MDA plasmanya.

**Kata kunci :** malondialdehid, vitamin E, diet lemak tinggi

#### ABSTRACT

The objective of the research was to study the effect of the vitamin E to plasma malondialdehyde (MDA) concentration on Wistar rat fed high fat. Thirty male Wistar rats, 3 months, 182-250 gram allocated randomly to 6 group of 5 each. The first group was fed normal diet, the second group was fed high fat diet and vitamin E 30 IU, the third group was fed high fat diet and vitamin E 60 IU, the fourth group was fed high fat diet and vitamin E 120 IU, the fifth group was fed high fat diet and vitamin E 240 IU, the sixth group was fed high fat diet and vitamin E 480 IU, *ad libitum*, until 12 weeks. Before feeding experiment, the blood sample was taken from all of rats for measuring plasma MDA and serum vitamin E concentration. The same measured were repeated after 12 weeks. The statistical analyses by factorial design followed Dunnet's test showed that vitamin E 120 IU, 240 IU and 480 IU could decreased significantly ( $P < 0.05$ ) plasma MDA concentration. Based on the result, it can be conclude that feeding vitamin E more than 60 IU on Wistar fed high fat diet can decrease plasma malondialdehid concentration.

**Key words :** malondialdehyde, vitamin E, high fat diet

## PENDAHULUAN

Mekanisme destruksi oksidatif asam lemak tak jenuh ganda yang terbentuk dari proses autokatalitik tidak terkontrol yang menghasilkan pembentukan asam lemak hidroperoksida dan senyawa aldehyd dikatakan sebagai peroksidasi lipid (Cheeseman, 1993). Senyawa aldehyd yang terbentuk diantaranya malondialdehyd (MDA), yang tersusun dari 3 atom karbon yang mempunyai rumus  $C_3H_4O_2$  dimana kelompok karbonil terletak pada posisi C3 dan C1 (Winarno, 1995).

Malondialdehyd merupakan senyawa toksik terhadap sistem kehidupan karena kemampuannya untuk mengubah atau berikatan silang dengan berbagai macam biomolekul seperti, protein, enzim, lipoprotein, aminofosfolipid dan asam amino (Valenzuela, 1991). Dilaporkan juga bahwa MDA terdapat dalam pembentukan pigmen penuaan, menyebabkan penurunan aktifitas cetakan DNA liver dan sebagai inisiator karsinogenik pada kulit tikus. Disamping itu MDA juga merupakan senyawa mutagenik pada beberapa strain *Salmonella typhimurium* dan mutagenik serta sitotoksik pada sel mamalia (Scallany *et al.*, 1984). Kemudian ditambahkan juga oleh Wong *et al.* (1987) bahwa hasil peroksidasi lipid ini dapat menyebabkan penyakit yang bersifat degeneratif seperti aterosklerosis, katarak, rematik, iskemia jantung dan otak, sindroma gangguan pernafasan, gangguan hati dan suhu. Kondisi ini dapat terjadi pada individu yang lebih sering mengkonsumsi lemak tinggi dibanding karbohidrat kompleks. Hal ini disebabkan karena lemak merupakan target potensial untuk dioksidasi.

Vitamin E selama ini dikenal sebagai antioksidan, karena kemampuannya untuk mencegah destruksi oksidatif secara nonenzimatik asam lemak tak jenuh ganda. Kelompok hidroksil yang sifatnya reaktif terhadap cincin fenil dapat mengoksidasi dan menghilangkan elektron atau ion hidrida sehingga terbentuk vitamin E radikal yang bersifat cukup stabil. Radikal tersebut kemudian dioksidasi kembali menjadi senyawa kuinon yang dapat diekskresikan dari tubuh (Linder, 1992).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh vitamin E dalam mencegah terjadinya stres oksidatif yang dapat ditimbulkan oleh pakan lemak tinggi dengan melihat kadar MDA plasma dan vitamin E serum pada tikus Wistar. Diharapkan hasil positif dari penelitian ini dapat menjadi informasi bagi masyarakat pentingnya nutrisi vitamin E untuk

mencegah terjadinya penyakit degeneratif yang dapat ditimbulkan karena konsumsi lemak tinggi.

## MATERI DAN METODE

Tigapuluh ekor tikus jantan galur Wistar, umur 3 bulan, berat badan berkisar antara 183-250 gram digunakan sebagai hewan percobaan. Hewan tersebut diperoleh dari UPHP, UGM. Sebelum penelitian tikus tersebut diadaptasikan lebih dahulu selama 1 minggu dengan diberi pakan basal. Setelah adaptasi, tikus dibagi secara acak menjadi 6 kelompok, masing-masing 5 ekor dan tiap ekor dikandangkan secara terpisah. Sebelum diberi perlakuan, tikus diambil darahnya melalui pleksus retroorbitalis dengan pipet mikrohematokrit sebanyak 2,5 ml untuk pemeriksaan kadar vitamin E dan MDA. Kemudian selama 3 bulan tikus-tikus tersebut diberi perlakuan sebagai berikut : kelompok I diberi pakan basal (kontrol), kelompok II diberi pakan lemak tinggi + 30 IU vitamin E, kelompok III diberi pakan lemak tinggi + 60 IU vitamin E, kelompok IV diberi pakan lemak tinggi + 120 IU vitamin E, kelompok V diberi pakan lemak tinggi + 240 IU vitamin E serta yang terakhir kelompok VI diberi pakan lemak tinggi + 480 IU vitamin E. Vitamin E yang diberikan dicampur dengan pakan. Pemberian pakan 10 % dari berat badannya setiap hari, sedangkan air minum diberikan secara tak terbatas. Setelah 3 bulan sebelum dibunuh, tikus-tikus tersebut diambil kembali darahnya untuk pemeriksaan kadar vitamin E dan MDA. Susunan pakan yang diberikan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel I.

Analisis terhadap kadar MDA plasma dilakukan dengan cara sebagai berikut : sebanyak 50 ul plasma darah dari masing-masing sampel dimasukkan ke dalam tabung polipropilen berukuran 13 ml. Kemudian pada tiap tabung ditambahkan 750 ul asam fosfat dan 50 ul larutan TEP (*1,1,3,3-tetraethoxypropane*) dan divorteks. Selanjutnya 250 ul 40 mM larutan TBA dan 450 ul aquadest ditambahkan dalam setiap tabung. Tabung ditutup rapat-rapat, dipanaskan pada suhu 100 °C selama 1 jam. Sesudah pemanasan tabung dipindahkan ke dalam *ice bath* untuk didinginkan. Warna merah yang terbentuk dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 532 nm.

Kadar vitamin E dianalisis dengan HPLC (Beckman) yang merupakan teknik modifikasi yang dikembangkan oleh Bieri *et al.* (1979) dengan cara sebagai berikut : lima ratus mikroliter serum dipipetkan ke dalam tabung gelas berukuran 12x 75 mm. Ke dalam setiap tabung kemudian ditambahkan

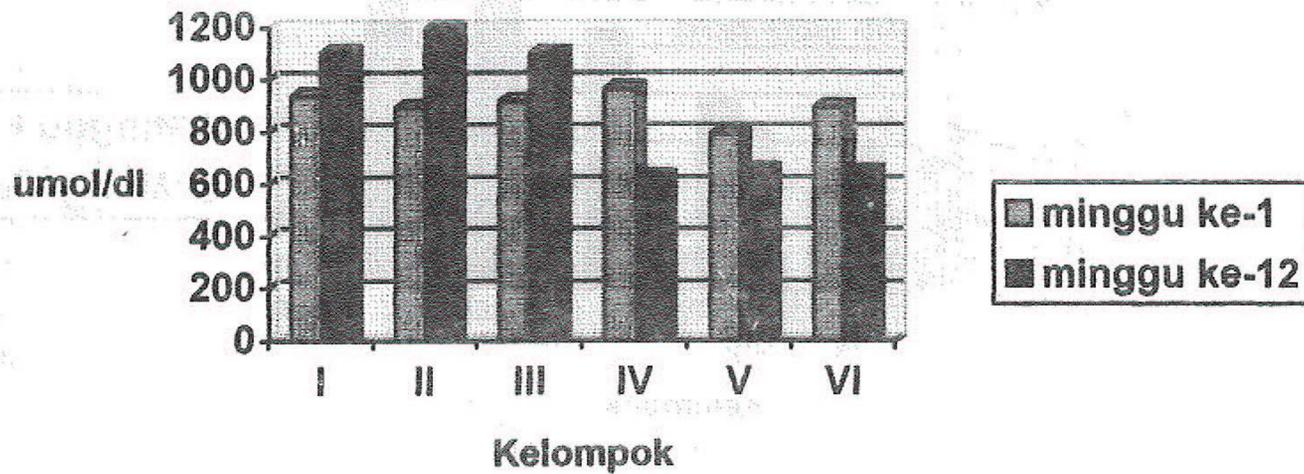
0,5 ml etanol absolut dan divorteks selama 5 detik untuk mendenaturasikan protein. Satu mililiter heksan kemudian ditambahkan ke dalam setiap tabung, divorteks selama 5 detik dan disentrifugasi dengan kecepatan 550xg selama 10 menit. Lapisan heksan yang terdapat di permukaan kemudian diambil dengan

Data yang diperoleh dari pemeriksaan MDA dan vitamin E dianalisis secara statistik dengan *analysis of variance* dengan rancangan percobaan menggunakan *factorial experiment* yang dilanjutkan dengan Dunnet's test (Gomez dan Gomez, 1984).

Tabel 1. Komposisi pakan hewan percobaan

Bahan	Jumlah bahan (%)	
	Pakan basal	Pakan lemak tinggi
Kasein	20	20
Sukrosa	50	30
Tepung Jagung	15	15
Selulosa	5	5
Minyak jagung	5	-
Lemak hewani	-	25
Mineral + vitamin (tanpa vit. E)	4,86	4,2
dl- $\alpha$ -tokoferol asetat	0,14	30 IU-480 IU

### Kadar MDA Plasma



Gambar 1. Grafik rerata hasil pemeriksaan kadar MDA plasma tikus Wistar yang diberi pakan lemak tinggi dan berbagai dosis vitamin E selama 12 minggu

pipet Pasteur secara perlahan-lahan dan disaring dengan filter 0,45  $\mu$ . Larutan hexan yang telah disaring tersebut kemudian diinjeksikan dalam sistem kromatografi. Pemisahan disokratik pada kolom C<sub>18</sub> dengan eluen campuran heksan (*degased hexan*) dan kloroform (85:5) dengan *flow rate* 1,1 ml/menit, tekanan 1500 psi dan dideteksi dengan spektrofotometer ultra violet dengan panjang gelombang 280 nm. Sebagai standar digunakan dl-alfa tokoferol asetat (T3251 – Merck).

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Pemeriksaan Kadar MDA

Metode penentuan produk peroksidasi lipid ini ditentukan dengan *2-thiobarbituric acid (TBA)*. Metode ini tidak mengukur secara langsung lipid peroksida namun malondialdehid (MDA) dan produk degradasi lainnya dari lemak teroksidasi (Shemedes dan Holmer, 1989). Pada metode ini senyawa yang terikat asam lemak barbiturat sebagian besar (90%)

adalah MDA. Hasil pemeriksaan MDA dapat dilihat pada Gambar 1 Tabel 2 berikut ini:

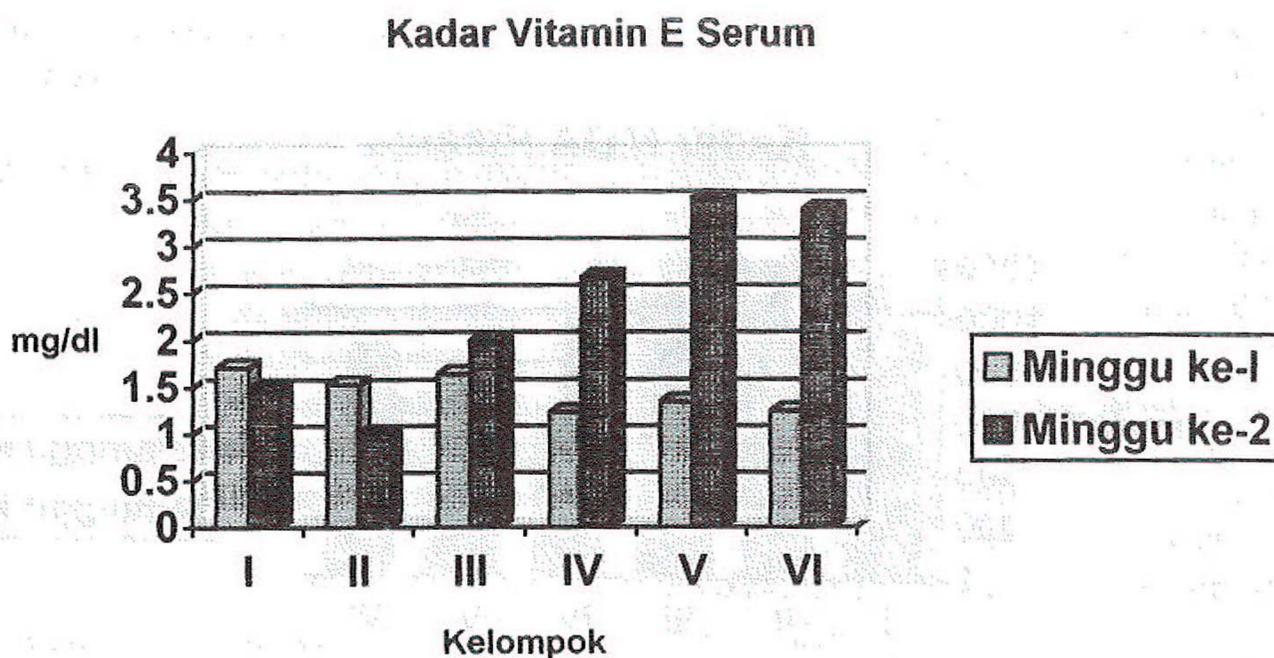
Analisis statistik dengan pola faktorial yang dilanjutkan dengan uji Dunnet's menunjukkan bahwa terdapat penurunan yang signifikan kadar MDA antara

pengaruh negatif akibat konsumsi lemak tinggi dan kalori tinggi.

Chow (1994) melaporkan mengatakan bahwa stres oksidatif di dalam tubuh dapat terjadi karena faktor-faktor seperti tingginya konsumsi lemak, umur

Tabel 2. Rerata hasil pemeriksaan kadar MDA plasma tikus pada minggu ke1 dan ke 12

Kelompok	Kadar MDA (umol/dl)		
	Minggu		
	1	12	selisih
I	935,±58.53	1103.25±37.96	168.25±32.16
II	892.08±32.54	1193.30±49.33	301.22±21.91
III	916.93±24.15	1100.14±28.74	183.21±35.36
IV	963.51±86.03	624.99±31.54	-338.51±57.32
V	790.96±20.13	619.47±10.74	-171.89±14.95
VI	895.18±32.16	596.76±9.46	-298.43±27.83



Gambar 2. Grafik rerata hasil pemeriksaan kadar vitamin E serum tikus Wistar yang diberi pakan lemak tinggi selama 12 minggu

kelompok IV, V dan VI dengan kontrol. Peningkatan yang paling tinggi terjadi pada kelompok yang mendapat lemak tinggi dan vitamin E sebanyak kebutuhan standar tikus tersebut yaitu 30 IU per hari (kelompok II) kemudian diikuti dengan kelompok yang mendapatkan vitamin E sebanyak 60 IU. Hasil ini mengindikasikan bahwa untuk mencegah terjadinya peningkatan kadar MDA plasma yang bersifat toksik di dalam tubuh diperlukan dosis yang lebih besar dari 60 IU. Hal ini sesuai dengan yang dikatakan Dziezak (1986) bahwa pemberian vitamin E sebanyak 100 IU per hari cukup bermanfaat mencegah terjadinya

yang bertambah dan diet anti oksidan dalam jumlah kurang. Keseimbangan antara osidan (radikal bebas) dan antioksidan sangat diperlukan terutama untuk memelihara integritas dan fungsi normal dari membran lipid, protein seluler dan asam nukleat. Malondialdehid merupakan produk sekunder dari peroksidasi lipid yang terbentuk karena reaksi radikal alkoksil alkil peroksil dengan logam transisi Fe 2+ atau Cu2. Pengukuran kadarnya dapat menunjukkan banyaknya lipid peroksida di dalam tubuh.

Pada kelompok II dan III peningkatan kadar MDA terjadi karena asupan vitamin E dalam jumlah terbatas sehingga kurang mampu mencegah proses

peroksidasi lipid dibanding kelompok lainnya.

Vitamin E adalah antioksidan yang dikenal sebagai *scavenger radical* karena mempunyai kemampuan menangkap radikal lemak dengan donasi atom H-nya, sehingga terbentuk senyawa stabil dan memutus reaksi oksidasi selanjutnya. Reaktifitas hidrogen fenolik pada kelompok hidroksil C-6 dan kemampuan sistem cincin kromanol untuk menstabilkan elektron yang tidak berpasangan,

kurang dari 8% dengan VLDL. Apabila dikaitkan dengan sifat metabolisme kolesterol seperti dijelaskan oleh Katar (1995) bahwa nilai katabolit fraksional pada tikus tinggi yakni tikus dapat membersihkan 6 ml. h<sup>-1</sup>, kg<sup>-1</sup> kandungan LDL kolesterolnya (10 kali lebih besar dari manusia), sehingga ada kemungkinan bahwa vitamin E yang ada pada kelompok VI tersebut akan ikut diekskresikan bersama kolesterol, sehingga kandungannya di dalam serum berkurang,

Tabel 3. Rerata hasil pemeriksaan kadar vitamin E serum tikus

Kelompok	Kadar Vitamin E (mg/dl)		
	Minggu-ke		
	1	12	Selisih
I	1.714±0.075	1.714±0.075	-0.248±0.255
II	1.526 ±0.124	1.008±0.119	-0.524±0.108
III	1.644 ±0.126	2.014±0.131	0.37±0.125
IV	1.22±0.15	2.67±0.085	1.45±0.204
V	1.338±0.154	30512±0.051	2.174±0.189
VI	1.228±0.078	3.404±0.084	2.176±0.066

menyebabkan vitamin E mempunyai kemampuan aktivitas antioksidan di dalam membran sel (Gutteridge dan Halliwell, 1990)

#### Pemeriksaan kadar vitamin E

Analisis statistik dengan *factorial experiment* yang dilanjutkan dengan Dunnet's test menunjukkan bahwa terdapat peningkatan yang signifikan kadar vitamin E pada kelompok IV, V dan VI dibanding dengan kontrol. Data hasil pemeriksaan ini dapat dilihat pada Tabel 3 dan Gambar 2 berikut ini :

Terlihat bahwa pada kelompok II terjadi penurunan kadar vitamin E di dalam serumnya. Data ini menguatkan hasil pemeriksaan MDA, dimana pada individu yang mengkonsumsi lemak tinggi apabila hanya mendapat asupan vitamin E dalam jumlah standar, dapat menyebabkan peningkatan kadar MDA di dalam plasmanya dalam jumlah yang lebih banyak sehingga memberikan kemungkinan terjadinya serangan oksidatif pada sel-sel tubuh dan dapat menyebabkan terjadinya kondisi patologis yaitu penyakit degeneratif (Robbin *et al.*, 1989).

Namun dalam penelitian ini pada kelompok VI dimana tikus mendapatkan vitamin E sebanyak 480 IU ternyata justru menunjukkan peningkatan yang lebih rendah dibandingkan dengan tikus yang mendapatkan vitamin E sebanyak 240 IU (kelompok V). Oleh Combs (1992) dikatakan bahwa pada tikus sebagian besar transportasi alfa tokoferol melalui kolesterol yaitu 70%-80% dengan HDL, 18%-22% dengan LDL dan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa penambahan vitamin E lebih besar dari 60 IU per hari dapat menurunkan kadar MDA plasma pada tikus yang diberi pakan lemak tinggi.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada direktorat Pendidikan Tinggi dan *World Bank* yang telah memberikan dana penelitian ini melalui proyek URGE, kepala Laboratorium Pangan dan Gizi PAU-UGM dan stafnya atas fasilitas yang diberikan selama pelaksanaan penelitian ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Biere, J.G., Tolimer, T.J and Catigani, G.L., 1979. Simultaneous of alfa tocoferol and retinol in plasma or red cell by HPLC, *Am. J. Clin. Nutr.* (32):2143-2149
- Cheeseman, K.H., 1993. Lipid Peroxidation and Cancer in DNA and Free Radical. Ellis Harwood Limited Market Cross House, Cooper Street, 199-134
- Chow, C.K. 1994. Vitamin and Related Compounds in Free Radical Defences in Antioxidant and Free Radical, *Proceeding of The XV*

- International Congress of Nutrition, IUMS, Adelaide, 795-798
- Comb, J.F., 1992. The Vitamin, Fundamnetal Aspect in Nutrition and Health, Academic Press, Inc, A Division of Harcourt Brace Company, 179-205
- Dziedzic, L.D., 1986. Antioxidant : The ultimate answer to oxidation, *Food Tech*, 40(9):94-104
- Gomez, K.A. and Gomez, A.A., 1984. Statistical Procedures for Agricultured Research, 2<sup>nd</sup> ed., John Willey and Sons Inc, New York.
- Gutteridge, J.M.C. and Halliwell, B., 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological system, *Trends Biochem, Sci.* (15); 129-135
- Katar, J., 1995. Dietary antioxidant and cigarett smoke induce biomoleculer damage : a complex interaction, *Am. J. Clin. Nutr.*, (62): 1490 – 1498.
- Linder, M.C., 1992. Biokimia Nutrisi dan Metabolisme, UI-Pres, 201-208
- Scallany, A.S., Guan, M.D., Manway, J.D and Adding, P.B., 1984. Free Malondialdehyde Determination in Tissue by HPLC, Dept. of Sci. and Nutr, Univ. of Minnesota, 277-283
- Shemedes, A. and Holmer G., 1989. A new thiobarbituric acid (TBA) methode for determining free malondialdehyde (MDA) and hydroperoxides selectively or a measure of lipid peroxidation, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, (66): 817-818
- Robbins, S.L., Cotran, R.S. and Kumar, V., 1998. Pathology Basic of Disease, 4<sup>th</sup> ed., W.B. Saunders Company, 1451-1460
- Wong, S.H.Y., Kinght, J.A., Hopter, S.M., Zaharia, O., Lech, J.N., and Sunderman, F.W., 1987. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid chromatographic separation of malondialdehyde thiobarbituric acid adduct, *J.Clin. Chem.* (33):212-214.
- Winarno, F.G., 1995. Kimia Pangan dan Gizi, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, hal. 128 – 130.
- Valenzuela, A., 1991. The biological significance of malondialdehyde determination in the assesment of tissue oxidatif stress, *Life Sci.*, (49): 301 – 309.