BAB V
PEMBAHASAN

Sebelum dilakukan analisa profil protein, beras hitam (*Oryza sativa L.*) dan beras merah (*Oryza Nivara*) diukur kadar proteinnya dengan metode kjeldahl. Setelah itu dilakukan analisa profil protein beras hitam (*Oryza sativa L.*) dan beras merah (*Oryza Nivara*) dengan kontrol berupa beras putih (*Oryza Sativa*) dilakukan dengan menggunakan *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Elektroforesis*(SDS-PAGE) dan Bioinformatika. Sampel yang digunakan adalah beras hitam (*Oryza sativa L.*) dan beras merah (*Oryza Nivara*) yang telah ditepungkan. Isolasi dan presipitasi protein dilakukan denganmetode *salting out*. Kosentrasi isolat protein yang didapatkan dihitung dengan menggunakan metode Bradford. Setelah diketahui konsentrasi isolat protein, kemudian dilakukan analisa dengan SDS-PAGE dan bioinformatika. Profil protein yang dicari dalam penelitian ini adalah profil protein yang berperan dalam penurunan kadar gula darah.

Beras merupakan bahan pangan pokok masyarakat Indonesia. Secara umum, beras mengandung makro nutrien berupa karbohidrat (74,9-77,8%), protein (7,1-8,3%), dan lemak (0,5-0,9%). Karbohidrat utama di dalam beras adalah pati, yaitu mencapai 85-90% dari jumlah total karbohidrat. Beras dapat dibedakan berdasarkan sifat fisikokimianya yang dipengaruhi oleh proporsi kandungan amilosa dan amilopektin yang menyusun pati di dalam beras tersebut. Selain itu, beras juga dapat dibedakan berdasarkan warnanya, seperti beras beras putih, beras merah, dan beras hitam (Setiawan, 2005).

Dua pigmen beras yang paling dikenal di Indonesia adalah beras hitam dan merah. Pigmen beras dikenal luas sebagai nasi yang diperkaya dengan rasa yang unik dan dapat meningkatkan kesehatan manusia. Pada pengobatan tradisional China, pigmen beras digunakan dalam meningkatkan fungsi ginjal, mengobati anemia, meningkatkan sirkulasi darah dan mengobati diabetes (Chanu, 2015).

Beras hitam (*Oryza sativa L.)* dan beras merah (*Oryza nivara*) merupakan varietas beras yang memiliki bran/kulit bewarna hitam dan merah yang melapisi endosperm. Endosperm beras hitam akan berubah menjadi warna ungu sangat tua ketika dimasak. Beras hitam membutuhkan waktu pemasakan yang lebih lama dan memiliki tekstur lebih lengket dibandingkan beras putih dan merah. Kandungan pigmen antosianin yang tinggi pada beras hitam dibanding beras merah dan putih, yang mengakibatkan beras hitam mempunyai aktivitas yang tinggi, dan pigmen tersebut berperan dalam pengaturan gula darah.Kandungan fenolik beras putih, beras merah, dan beras hitam secara berturut-turut adalah 124.8 mg/ 100 g, 460.32–725.69 mg/100 g, dan 417.11–687.24 mg/100 g. Kandungan fenolik yang paling besar terdapat pada beras merah dan hitam dibanding beras putih. Kandungan fenoltersebut merupakan antioksidan yang berperan dalam pengaturan gula darah. Kandungan fenolik pada pigmen beras lebih besar karena sebagian besar kandungan fenolik berasal dari kapsulnya dan bukan endosperm (Chanu, 2015).

5.1.Kadar Protein dengan Metode Kjeldahl

Prinsip analisis Kjeldahl ini adalah dengan mendekstruksi bahan atau sampel dengan asam sulfat pekat. Kemudian amonia yang terbentuk sebagai hasil dekstruksi dan destilasi, ditampung dan dititrasi dengan bantuan indikator. Penentuan dengan metode Kjeldahl ini tidak 100% merupakan protein murni, jadi dapat disebut dengan penentuan kadar protein kasar (*crude protein*). Metode ini dikatakan sebagai protein kasar karena nitrogen yang dihitung tidak hanya nitrogen yang dikandung oleh suatu protein, melainkan nitrogen non–protein juga ikut terhitung, sehingga metode ini menghasilkan persentase protein yang lebih besar dari seharusnya (Winarno, 1992). Berdasarkan Tabel 5., dapat dilihat hasil kadar protein yang dihasilkan pada masing-masing sampel beras. Hasil kadar protein tersebut tidak sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Raghuvans *et al*. (2017) yang menemukan kandunganprotein kasar pada beras putih adalah 7,6% dan beras merah adalah 10,49%. Sementara, Sompong *et al.* (2011) menemukan kandungan protein kasar pada beras hitam *China* dan beras merah *China* adalah 8,44% dan 9,72%. Selain itu, Sompong *et al.* (2011) juga menemukan kadar

protein beberapa varietas di Thailad dan Sri Lanka memiliki kadar protein yang lebih tinggi dibandingkan hasil penelitian ini.

Perbedaan yang cukup signifikan tersebut dapat disebabkan karena beberapa faktor. Menurut Rehman *et al.* (2016) dan Cheng-Wei Liu *et al.*(2014), varietas tanaman, penggunaan pupuk organik dan anorganik, kondisi tanah, serta tingginya kandungan nitrogen dalam tanah dan pupuk dapat mempengaruhi produktivitas tanaman dan kandungan nitrogen di dalam tanaman. Kandungan nitrogen yang tinggi pada tanah serat pupuk yang digunakan dapat meningkatkan kandungan nitrogen di dalam tanaman, sehingga kandunganprotein kasar juga akan meningkat. Namun penggunaan pupuk dengan kandungan nitrogen terlalu tinggi dapat menyebabkan akumulasi nitrat dalam jumlah tinggi di dalam tanaman, sehingga crude protein akan menurun. Kandungan nitrat tersebut dapat dipecah menjadi asam amino yang bermanfaat dengan tingginya intensitas sumber cahaya alami seperti matahari dibandingkan *artificial light*.Selain itu, Hatfield *et al.* (2015) juga mengatakan, bahwa perbedaan temperatur (lebih hangat) serta perubahan iklim dapat mempengaruhi produktivitas tanaman.

5.2. Konsentrasi Isolat Protein dengan Metode Bradford

Berdasarkan pendapat Triyono (2010), isolasi protein adalah proses untuk memisahkan protein dari komponen lain yang tidak diharapkan untuk mendapatkan isolat protein, dimana isolat protein adalah protein berkonsentrasi tinggi hasil dari proses ekstraksi dan presipitasi.Presipitasi protein yang digunakan pada penelitain ini adalah presipitasi dengan metode *salting out.* Metode *salting out* menurut Tan shiu che (2009) adalah metode yang mengendapkan protein dan substansi lain dengan memecah membran sel menggunakan garam konsentrasi tinggi. Proses pengendapan protein pada metode *salting out* dapat terjadi karena adanya persaingan antara garam dan protein dalam mengikat air. Penambahan ammonium sulfat menyebabkan tertariknya molekul air yang berikatan dengan protein oleh ion garam. Hal ini karena densitas muatan ion garam lebih besar daripada densitas muatan protein. Semakin tinggi konsentrasi garam yang ada, maka semakin kuat molekul air yang terikat pada ion garam tersebut. Berkurangnya molekul air di dalam protein menyebabkan gaya tarik menarik antar protein menjadi

lebih kuat (hidrofobik), apabila dibandingkan ikatan antara protein dan air. Hal ini menyebabkan protein mengalami pengendapan.

Isolat protein yang didapatkan dilanjutkan menuju metode *Bradford*. Metode *Bradford* merupakan metode untuk menentukan kadar asam amino atau protein dalam suatu larutan dengan kolorimetri menggunakan penambahan reagen *Bradford*. Apabila dalam suatu larutan mengandung asam amino maka larutan akan berubah menjadi biru ungu apabila ditambahkan reagen *Bradford*. Namun, jika dalam suatu larutan tidak mengandung asam amino maka larutan akan berubah menjadi merah coklat apabila ditambahkan reagen *Bradford* (Bradford, 1976).

Dari penelitian dilihat bahwa dilakukan analisa kadar protein dengan metode Bradford. Kadar protein yang dihasilkan pada berbagai beras dapat dilihat pada Tabel 5Berdasarkan data pada Tabel 5 tersebut dapat disimpulkan bahwa kadar protein terbanyak terdapat pada beras merah, dilanjutkan dengan beras hitam, dan kemudian beras putih. Hasil data kadar protein pada beras dengan metode Bradford pada penelitian ini kurangsesuai dengan hasil kadar protein metode Bradford yang disampaikan oleh Freire*et al*. (2013) yang dapat dilihat pada Tabel 2. Kadar protein metode Bradford pada beras *O. glumaepatula*memiliki nilai yang berkisar antara 8,65-14,94% yang menunjukan hasil yang lebih tinggi dibandingkan kadar protein metode Bradford pada penelitian ini. Perbedaan tersebut dapat disebabkan oleh pernyataan Rehman *et al.* (2016) dan Cheng-Wei Liu *et al*. (2014) pada subab sebelumnya. Sari *et al*. (2018) menambahkan, perbedaan kadar protein yang diperoleh disebabkan karena setiap varietas beras memiliki total protein penyusun yang spesifik yang mempengaruhi karakter dari metabolisme beras dan metabolit yang dihasilkan serta warna pericarp beras.

5.3. Perbandingan Konsentrasi Protein Metode Bradford dengan Metode Kjeldahl

Dari penelitian dilihat bahwa dilakukan analisa kadar protein dengan metode Bradford pada semua varietas Beras berkisar antara 3,012-6,045%, sedangkan analisa kadar protein dengan metode Kjeldahl menghasilkan kadar protein pada semua varietas beras

berkisar antara 5,20-6,50%. Hal ini menunjukan bahwa pengukuran konsentrasi protein dengan metode kjeldahl memiliki hasil yang lebih tinggi dibandingkan metode Bradford.Umumnya metode kjeldahl digunakan sebagai metode standar untuk perbandingan dengan metode lain. Keuniversalannya, presisi tinggi dan reproduktifitasnya yang baik menjadikannya metode utama untuk estimasi protein dalam makanan. Namun, itu cenderung melebih-lebihkan konsentrasi protein apabila dibandingkan dengan uji Bradford. Kandungan protein dari Bradford relatif kurang dari dari metode kjeldahl untuk semua sampel. Hal ini karena metode kjeldahl mengukur kandungan protein berdasarkan kandungan nitrogennya sedangkan mungkin ada biomolekul lain yang mengandung nitrogen juga, misalkan asam nukleat dan senyawa nitrogen lainnya. Metode *Bradford* merupakan metode untuk menentukan kadar asam amino atau protein dalam suatu larutan dengan kolorimetri menggunakan penambahan reagen *Bradford*. Apabila dalam suatu larutan mengandung asam amino maka larutan akan berubah menjadi biru ungu apabila ditambahkan reagen *Bradford*. Namun, jika dalam suatu larutan tidak mengandung asam amino maka larutan akan berubah menjadi merah coklat apabila ditambahkan reagen *Bradford* (Bradford, 1976). Metode Bradford lebih cepat dan lebih mudah untuk dilakukan dibandingkan dengan uji kjeldahl yang memerlukan waktu lama selama pengujiannya. Kedua metode dapat digunakan untuk memperkirakan kandungan protein dengan mempertimbangkan ruang lingkup penggunaan dan keterbatasannya untuk menghasilkan hasil yang diinginkan (Kumar & Koirala, 2018).

5.4. Profil Protein dengan SDS-PAGE

Pada penelitian ini dilakukan pencarian profil protein dengan metode separasi SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), dimana tujuan metode ini adalah untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekul dan mengetahui profil proteinnya. Metode SDS-PAGE adalah metode elektroforesis untuk memisahkan campuran protein dengan menggunakan matrix penyangga berupa *polyacrylamide gel* dan detergen SDS (*sodium dodecyl sulfate*). Sampel SDS-PAGE diambil dari isolat protein yang dihasilkan dari metode Bradford. Proses elektroforesis SDS-PAGE ini diawali dari sampel yang bergerak dari *stacking gel* menuju ke

separating gel. Setelah proses elektroforesis selesai, maka pita protein yang terdapat di dalam gel dapat dilihat dengan dilakukan proses *staining* dengan *silver* atau *coomasive brillian blue*. *Staining* dengan *coomasive brillian blue* dapat mendeteksi protein dengan 0.1 µg, sedangkan untuk *silver* dapat mendeteksi protein dengan 0.02 µg (Bollag & Edelstein, 1991).

Dari penelitian ini maka dapat dilihat bahwa pada Beras Putih Pandan Wangi (C1) dan Beras Putih Denuk (C2) memiliki 9 pita protein dengan berat molekul masing-masing pita yaitu 90,07 kDa; 84,33 kDa; 69,25 kDa; 60,64 kDa; 56,83 kDa; 35,86 kDa; 32,49 kDa; 24,16 kDa; dan 20,50 kDa. Pada Beras Merah wangi (A) dan Beras Merah Mandel (B) memiliki 10 pita protein dengan berat molekul masing-masing pita yaitu 90,07 kDa; 84,33 kDa; 69,25 kDa; 60,64 kDa; 56,83 kDa; 42,27 kDa; 35,86 kDa; 32,49 kDa; 24,16 kDa; dan 20,50 kDa. Pada Beras Hitam Cempo (C) dan Beras Hitam Arang (D) memiliki 6 pita protein dengan berat molekul masing-masing pita yaitu 69,25 kDa; 60,69 kDa; 56,83 kDa; 42,27 kDa; 35,86 kDa; dan 24,16 kDa.

Hasil pada penelitian ini berbeda jauh dengan hasil penelitian Sari *et al.*(2018) yang telah dijelaskan pada bab sebelumnya (Tabel 4). Pada penelitian Sari *et al.* (2018), jumlah pita protein yang didapat lebih banyak daripada penelitian ini, sehingga dapat disimpulkan profil protein yang dapat diidentifikasi juga lebih banyak. Perbedaan tersebut dapat disebabkan oleh pernyataan Rehman *et al.* (2016) dan Cheng-Wei Liu *et al.* (2014) pada subab sebelumnya. Sari *et al.* (2018) menambahkan, perbedaan profil protein yang diperoleh disebabkan karena setiap varietas beras memiliki pita protein spesifik yang mempengaruhi karakter dari metabolisme beras dan metabolit yang dihasilkan serta warna pericarp beras.

5.4.1. Profil Protein Beras Putih

Dari penelitian ini ditemukan bahwa beras putih memiliki 9 profil protein, yaitu diantaranya adalah NBS-LRR-like resistance protein, Calcineurin-related phosphoesterase-like, *Uncharacterized protein*, Putative cytochrome P450 71E1, Auxin

response factor, Os05g0480000 protein, Sugar phosphate isomerase/epimerase, Coatomer subunit delta, dan Os05g0480000 protein.

NBS-LRR-like resistance protein dengan berat molekul90,068 kDa memiliki fungsi pengikat ADP. Pengikatan ADP ini akan meningkatkan jumlah ADP yang dihasilkan. Dengan meningkatnya jumlah ADP/ATP yang dihasilkan secara otomatis akan menyebabkan terhambatnya *ATPsensitive* K^+*channel* sehingga terjadi depolarisasi membran plasma. Selanjutnya, terjadi pembukaan *voltage-gated* Ca^{2+} *channel* bersamaan dengan masuknya Ca^{2+} ekstrasel yang memiliki fungsi dalam aktivasi eksositosis granul-granul dan sekresi insulin. Peningkatan ADP ini juga baik bagi penderita obesitas dan hiperglikemia. Pada penderita obesitas dan hiperglikemia, akan terjadi eksresi *uncoupling protein-2* (UCP-2) yang berlebihan pada sel beta sehingga secara otomatis terjadi peningkatan produksi superoksida pada mitokondria yang menyebabkan penggunaan ATP menjadi boros dan proses sekresi insulin menjadi menurun (Banjarnahor & Wangko, 2012).

Calcineurin-related phosphoesterase-like dengan berat molekul84,333 kDa berperan dalam aktivitas hidrolisis.*Calcineurin* berperan dalam mengaktifkan ERK ½ dan faktor kunci dalam mediasi glukosa *induced* transkrip gen insulin. ERK ½ diatur oleh insulin *secretagogues* dan berperan dalam membantu mempertahankan fungsi sel beta pankreas. Dengan mempertahakan sel beta pankreas, otomatis sintesis insulin juga tetap terjaga. Hal ini karena, insulin disintesis dan dikeluarkan oleh sel beta pankreas (Duan & Cobb, 2010).

Uncharacterized protein dengan berat molekul69,228 kDa berperan dalam merusak DNA pengikat dan Aktivitas DNA polymerase. Dengan adanya fungsi aktivitas DNA polymerase maka, protein *Uncharacterized protein* dengan berat molekul 69,228 kDa memiliki peran dalam penurunan Diabetes Mellitus. Hal ini karena DNA polymerase merupakan enzim yang berperan dalam sintesis molekul DNA. Keberadaan DNA polymerase ini akan digunakan untuk melengkapi DNA rantai tunggal menjadi rantai

ganda yang dikenal dengan DNA komplementer (c-DNA) yang merupakan gen yang digunakan dalam sintesis insulin (Heuson & Legros, 1971).

Putative cytochrome P450 71E1memiliki berat molekul60,694 kDa dan memiliki fungsi sebagai heme *binding*, mengikat ion besi, aktivitas oksidoreduktase, bekerja pada donor yang dipasangkan, dengan penggabungan atau pengurangan oksigen molekuler, NAD(P)H sebagai salah satu donor, dan penggabungan satu atom oksigen, serta proses biosintesis metabolit sekunder.Pada Protein Putative cytochrome P450 71E1 belum ditemukan penelitian yang menjelaskan fungsinya dalam menurunkan diabetes dalam tubuh.

Auxin response factor memiliki berat molekul56,829 kDa dan berfungsidalam mengikat DNA, auxin-activated signaling pathway, pengaturan transkripsi, dan DNA-templated.Salah satu fungsi pengikatan DNA ini memiliki hubungan dalam fungsi insulin dalam tubuh. Pancreatic-duodenal homoeobox factor-1 (PDX1) memiliki peran dalam mengkaitkan metabolisme glukosa yang ada pada sel beta pankreas dengan transkripsi gen insulin. Glukosa tersebut akan mengaktifkan aktivitas pengikatan DNA PDX1 dan aktivitas promoter insulin yang berkaitan dengan protein kinase. Di dalam gen protein kinase ini terdapat gen rpoC1 yang berperan dalam pengikatan DNA untuk mengaktivasi PDX1 yang berperan dalam jalur pensinyalan insulin dalam tubuh (Wu *et al.,* 1999).

Os05g0480000 protein merupakan protein dengan berat molekul35,857 kDa dan memiliki fungsi dalam pengikat ATP dan aktivitas protein kinase. Pengikatan ATP ini akan meningkatkan jumlah ATP yang dihasilkan. Dengan meningkatnya jumlah ADP/ATP yang dihasilkan secara otomatis akan menyebabkan terhambatnya *ATP sensitive* K^+*channel* sehingga terjadi depolarisasi membran plasma. Selanjutnya, terjadi pembukaan *voltage-gated* Ca^{2+} *channel* bersamaan dengan masuknya Ca^{2+} ekstrasel yang memiliki fungsi dalam aktivasi eksositosis granul-granul dan sekresi insulin. Peningkatan ADP ini juga baik bagi penderita obesitas dan hiperglikemia. Pada penderita obesitas dan hiperglikemia, akan terjadi eksresi *uncoupling protein-2* (UCP-2)

yang berlebihan pada sel beta sehingga secara otomatis terjadi peningkatan produksi superoksida pada mitokondria yang menyebabkan penggunaan ATP menjadi boros dan proses sekresi insulin menjadi menurun (Banjarnahor & Wangko, 2012). Aktivitas Protein Kinase ini berperan penting dalam mencegah penyakit Diabetes Mellitus. Diabetes Mellitus adalah salah satu masalah kesehatan masyarakat yang paling cepat berkembang di seluruh dunia yang dihasilkan dari faktor lingkungan dan genetik. Hal ini ditandai dengan metabolisme glukosa dan lipid yang abnormal karena sebagian resistensi terhadap tindakan insulin di otot skeletal, hati, dan lemak. Ini mungkin merupakan hasil dari adaptasi yang tidak sesuai terhadap perubahan lingkungan (misalnya, ketidakseimbangan antara asupan energi dan pengeluaran energi). Activated protein kinase adalah serin/threonin protein kinase bertindak sebagai integrator dari sinyal regulasi yang memantau status energi sistemik dan seluler. Kesadaran tumbuh bahwa protein kinase mengatur koordinasi anabolik (sintesis dan penyimpanan glukosa dan asam lemak) dan proses metabolisme katabolik (oksidasi glukosa dan asam lemak) merupakan target terapi yang menarik untuk intervensi dalam banyak kondisi keseimbangan energi yang tidak teratur. Bukti terbaru bahwa aktivasi farmakologi dari protein kinase meningkatkan homeostasis glukosa darah, profil lipid, dan tekanan darah pada tikus yang resisten terhadap insulin, menjadikan protein kinase ini sebagai target terapi baru dalam pengobatan penyakit diabetes mellitus (Viollet *et al.*, 2009).

Uncharacterized protein dengan berat molekul35,857 kDamemiliki aktivitas acetylglucosaminyl transferase serta berperan sebagai protein glycosylation bila dipandang dari sudut biologi. Sugar phosphate isomerase/epimerase dengan berat molekul 32,487 kDaberfungsi dalam aktivitas isomerase. Coatomer subunit delta dengan berat molekul 24,163 kDa berperan dalam transportasi protein dan transportasi yang dimediasi vesikel-retroes. Berdasarkan data Uniprot sebagai bank data protein, Os02g0197500 protein dengan berat molekul 20,498 kDa belum diketahui fungsi protein tersebut.Pada protein *Uncharacterized protein* dengan berat molekul 35,857 kDa, Sugar phosphate isomerase/epimerase, Coatomer subunit delta, dan Os02g0197500 proteinbelum ditemukan penelitian yang menjelaskan fungsinya dalam menurunkan diabetes dalam tubuh.

5.4.2. Profil Protein Beras Merah

Dari penelitian ini ditemukan bahwa beras merah memiliki 10 profil protein, yaitu diantaranya adalah *Uncharacterized protein* dengan berat molekul90,068 kDa, *Uncharacterized protein* dengan berat molekul 69,228 kDa, *Uncharacterized protein* dengan berat molekul 84,333 kDa, Protein disulfide-isomerase, Mevalonate kinase, *Uncharacterized protein* dengan berat molekul 35,857 kDa, *Uncharacterized protein* dengan berat molekul 32,487 kDa, *Uncharacterized protein* dengan berat molekul 24,163 kDa, dan *Uncharacterized protein* dengan berat molekul 20,497.

Uncharacterized protein dengan berat molekul69,228 kDa berperan dalam proses pengikatan ATP dan memiliki aktivitas protein kinase katalitik terhadap proses histone-lysine N-methyltransferase,dan mengikat ion zinc.Pengikatan ATP ini akan meningkatkan jumlah ATP yang dihasilkan. Dengan meningkatnya jumlah ADP/ATP yang dihasilkan secara otomatis akan menyebabkan terhambatnya *ATP sensitive* K^+*channel* sehingga terjadi depolarisasi membran plasma. Selanjutnya, terjadi pembukaan *voltage-gated* Ca^{2+} *channel* bersamaan dengan masuknya Ca^{2+} ekstrasel yang memiliki fungsi dalam aktivasi eksositosis granul-granul dan sekresi insulin. Peningkatan ADP ini juga baik bagi penderita obesitas dan hiperglikemia. Pada penderita obesitas dan hiperglikemia, akan terjadi eksresi *uncoupling protein-2* (UCP-2) yang berlebihan pada sel beta sehingga secara otomatis terjadi peningkatan produksi superoksida pada mitokondria yang menyebabkan penggunaan ATP menjadi boros dan proses sekresi insulin menjadi menurun (Banjarnahor & Wangko, 2012). Aktivitas Protein Kinase ini berperan penting dalam mencegah penyakit Diabetes Mellitus. Diabetes Mellitus adalah salah satu masalah kesehatan masyarakat yang paling cepat berkembang di seluruh dunia yang dihasilkan dari faktor lingkungan dan genetik. Hal ini ditandai dengan metabolisme glukosa dan lipid yang abnormal karena sebagian resistensi terhadap tindakan insulin di otot skeletal, hati, dan lemak. Ini mungkin merupakan hasil dari adaptasi yang tidak sesuai terhadap perubahan lingkungan

(misalnya, ketidakseimbangan antara asupan energi dan pengeluaran energi). Activated protein kinase adalah serin/threonin protein kinase bertindak sebagai integrator dari sinyal regulasi yang memantau status energi sistemik dan seluler. Kesadaran tumbuh bahwa protein kinase mengatur koordinasi anabolik (sintesis dan penyimpanan glukosa dan asam lemak) dan proses metabolisme katabolik (oksidasi glukosa dan asam lemak) merupakan target terapi yang menarik untuk intervensi dalam banyak kondisi keseimbangan energi yang tidak teratur. Bukti terbaru bahwa aktivasi farmakologi dari protein kinase meningkatkan homeostasis glukosa darah, profil lipid, dan tekanan darah pada tikus yang resisten terhadap insulin, menjadikan protein kinase ini sebagai target terapi baru dalam pengobatan penyakit diabetes mellitus (Viollet *et al.*, 2009).

Protein disulfide-isomerase memiliki berat molekul56,829 kDa dan berfungsi mengkatalisis proses penyusunan kembali ikatan –S-S- di protein. Selain itu, dalam lingkup molekular, protein ini memiliki aktivitas protein disulfida isomerase. Sedangkan dalam lingkup biologis, protein ini berfungsi untuk membantu pertumbuhan endosperm, sel redoks homeostatis, *protein folding* di endoplasmic reticulum. Untuk sintesis insulin, prekursor proinsulin diterjemahkan pada retikulum endoplasma (ER), lipatan untuk memasukkan tiga ikatan disulfida aslinya, dan diekspor ke sekret sekretori untuk pemrosesan dan sekresi. Protein disulfide isomerase (PDI) sudah lama diasumsikan membantu proinsulin dalam proses ini (Rajpal *et al.*, 2012).

Mevalonate kinase merupakan protein dengan berat molekul42,267 kDa. Mevalonate kinase memiliki fungsi mengkatalisis proses atau reaksi biosintesis isopentenyl diphosphate melalui mevalonate pathway. Proses reaksi yang dikatalisis oleh Mevalonate kinase adalah ATP + (R)-mevalonate = ADP + (R)-5-phospgomevalonate. Selain itu, mevalonate kinase memiliki fungsi molekuler, yaitu mengikat ATP, memiliki aktivitas mevalonate kinase, dan aktivitas transferase. Dalam aspek biologis, protein ini berperan dalam proses biosintesis isopentenyl diphosphate melalui mevalonate pathway, biosintesis lipid, lipid metabolism, biosintesis steroid, steroid metabolisme, biosintesis sterol, dan sterol metabolisme. Menurut Abramovits & Oquendo (2013), adalah enzim kedua dalam mevalonate pathway dalam sintesis kolestrol. Kekurangan mevalonate

kinase (MKD) menghasilkan penurunan level dari metabolit downstream. Dengan terhambatnya mevalonate kinase menyebabkan peningkatan sekresi IL-1β. Produksi IL-1β yang berlebih sangat tidak baik karena dapat meningkatkan resistensi insulin. Dengan peningkatan resistensi insulin ini akan menyebabkan tubuh tidak dapat menerima insulin dengan baik dan meningkatkan penyakit diabetes mellitus. Oleh karena itu keberadaan enzim mevalonate kinase sengat dibutuhkan untuk menurunkan atau menghambat IL-1β sehingga dapat meningkatkan sensivitas dari insulin.

Uncharacterized protein dengan berat molekul90,068 kDa memiliki fungsi katalitik terhadap proses histone-lysine N-methyltransferase dan mengikat ion zinc.NAD(P)H-hydrate epimerase memiliki berat molekul 60,694 kDa dan memiliki fungsi mengkatalisis proses epimerasi bentuk S- dan R- dari NAD(P)HX. Prosesnya membutuhkan kofaktor ion potasium pada setiap subunitnya.*Uncharacterized protein* dengan berat molekul 35,857 kDamemiliki aktivitas acetylglucosaminyl transferase serta berperan sebagai protein glycosylation bila dipandang dari sudut biologi. *Uncharacterized protein* dengan berat molekul 32,487 kDaberfungsi membantu proses biologis dalam pertumbuhan multiseluler dari kondisi awal ke konsdisi selanjutnya, seperti pertumbuhan zigot menuju embrio. Berdasarkan data Uniprot sebagai bank data protein,*Uncharacterized protein* dengan berat molekul 84,333 kDa,*Uncharacterized protein* dengan berat molekul 24,163 kDa,dan *Uncharacterized protein* dengan berat molekul 20,497 kDa belum diketahui fungsi protein tersebut.Pada Protein*Uncharacterized protein* dengan berat molekul 90,068 kDa,NAD(P)H-hydrate epimerase, *Uncharacterized protein* dengan berat molekul 35,857 kDa, *Uncharacterized protein* dengan berat molekul 32,487 kDa, *Uncharacterized protein* dengan berat molekul 84,333 kDa,*Uncharacterized protein* dengan berat molekul 24,163 kDa, dan *Uncharacterized protein* dengan berat molekul 20,497 kDa belum ditemukan penelitian yang menjelaskan fungsinya dalam menurunkan diabetes dalam tubuh.

5.4.3. Profil Protein Beras Hitam

Dari penelitian ini ditemukan bahwa beras hitam memiliki 6 profil protein, yaitu diantaranya adalah *Uncharacterized protein* dengan berat molekul69,228 kDa, *Uncharacterized protein* memiliki berat molekul 66,988 kDa, Auxin Response Factor, Mevalonate kinase, *Uncharacterized protein* dengan berat molekul 35,857 kDa, dan *Uncharacterized protein* dengan berat molekul 24,163 kDa.Dari ketiga beras, pada beras hitam didapatkan profil protein lebih kecil dibanding beras merah dan putih, hal ini sesuai dengan kadar protein yang dianalisa dengan metode kjeldalh.

Uncharacterized protein dengan berat molekul69,228 kDa berperan dalam proses pengikatan ATP dan memiliki aktivitas protein kinase. Pengikatan ATP ini akan meningkatkan jumlah ATP yang dihasilkan. Dengan meningkatnya jumlah ADP/ATP yang dihasilkan secara otomatis akan menyebabkan terhambatnya *ATP sensitive* K^+*channel* sehingga terjadi depolarisasi membran plasma. Selanjutnya, terjadi pembukaan *voltage-gated* Ca^{2+} *channel* bersamaan dengan masuknya Ca^{2+} ekstrasel yang memiliki fungsi dalam aktivasi eksositosis granul-granul dan sekresi insulin. Peningkatan ADP ini juga baik bagi penderita obesitas dan hiperglikemia. Pada penderita obesitas dan hiperglikemia, akan terjadi eksresi *uncoupling protein-2* (UCP-2) yang berlebihan pada sel beta sehingga secara otomatis terjadi peningkatan produksi superoksida pada mitokondria yang menyebabkan penggunaan ATP menjadi boros dan proses sekresi insulin menjadi menurun (Banjarnahor & Wangko, 2012). Aktivitas Protein Kinase ini berperan penting dalam mencegah penyakit Diabetes Mellitus. Diabetes Mellitus adalah salah satu masalah kesehatan masyarakat yang paling cepat berkembang di seluruh dunia yang dihasilkan dari faktor lingkungan dan genetik. Hal ini ditandai dengan metabolisme glukosa dan lipid yang abnormal karena sebagian resistensi terhadap tindakan insulin di otot skeletal, hati, dan lemak. Ini mungkin merupakan hasil dari adaptasi yang tidak sesuai terhadap perubahan lingkungan (misalnya, ketidakseimbangan antara asupan energi dan pengeluaran energi). Activated protein kinase adalah serin/threonin protein kinase bertindak sebagai integrator dari sinyal regulasi yang memantau status energi sistemik dan seluler. Kesadaran tumbuh bahwa protein kinase mengatur koordinasi anabolik (sintesis dan penyimpanan glukosa

dan asam lemak) dan proses metabolisme katabolik (oksidasi glukosa dan asam lemak) merupakan target terapi yang menarik untuk intervensi dalam banyak kondisi keseimbangan energi yang tidak teratur. Bukti terbaru bahwa aktivasi farmakologi dari protein kinase meningkatkan homeostasis glukosa darah, profil lipid, dan tekanan darah pada tikus yang resisten terhadap insulin, menjadikan protein kinase ini sebagai target terapi baru dalam pengobatan penyakit diabetes mellitus (Viollet *et al.*, 2009).

Auxin Response Factor memiliki berat molekul56,830 kDa dan berfungsi dalam mengikat DNA, auxin-activated signaling pathway, pengaturan transkripsi, dan DNA-templated.Salah satu fungsi pengikatan DNA ini memiliki hubungan dalam fungsi insulin dalam tubuh. *Pancreatic-duodenal homoeobox factor-1* (PDX1) memiliki peran dalam mengkaitkan metabolisme glukosa yang ada pada sel beta pankreas dengan transkripsi gen insulin. Glukosa tersebut akan mengaktifkan aktivitas pengikatan DNA PDX1 dan aktivitas promoter insulin yang berkaitan dengan protein kinase. Di dalam gen protein kinase ini terdapat gen rpoC1 yang berperan dalam pengikatan DNA untuk mengaktivasi PDX1 yang berperan dalam jalur pensinyalan insulin dalam tubuh (Wu *et al.*, 1999).

Mevalonate kinase merupakan protein dengan berat molekul42,267 kDa. Mevalonate kinase memiliki fungsi mengkatalisis proses atau reaksi biosintesis *isopentenyl diphosphate* melalui *mevalonate pathway*. Proses reaksi yang dikatalisis oleh Mevalonate kinase adalah ATP + (R)-mevalonate = ADP + (R)-5-phospgomevalonate. Selain itu, mevalonate kinase memiliki fungsi molekuler, yaitu mengikat ATP, memiliki aktivitas mevalonate kinase, dan aktivitas transferase. Dalam aspek biologis, protein ini berperan dalam proses biosintesis isopentenyl diphosphate melalui mevalonate pathway, biosintesis lipid, lipid metabolism, biosintesis steroid, steroid metabolisme, biosintesis sterol, dan sterol metabolisme. Menurut Abramovits & Oquendo (2013), adalah enzim kedua dalam mevalonate pathway dalam sintesis kolestrol. Kekurangan mevalonate kinase (MKD) menghasilkan penurunan level dari metabolit downstream. Dengan terhambatnya mevalonate kinase menyebabkan peningkatan sekresi IL-1β. Produksi IL-1β yang berlebih sangat tidak baik karena dapat meningkatkan resistensi insulin.

Dengan peningkatan resistensi insulin ini akan menyebabkan tubuh tidak dapat menerima insulin dengan baik dan meningkatkan penyakit diabetes mellitus. Oleh karena itu keberadaan enzim mevalonate kinase sengat dibutuhkan untuk menurunkan atau menghambat IL-1β sehingga dapat meningkatkan sensivitas dari insulin.

Uncharacterized protein memiliki berat molekul66,988 kDa dan memiliki fungsi mengikat ion zinc.Berdasarkan data Uniprot sebagai bank data protein, *Uncharacterized protein* dengan berat molekul 35,857 kDa dan *Uncharacterized protein* dengan berat molekul 24,163 kDa belum diketahui fungsi protein tersebut.Pada Protein *Uncharacterized protein* memiliki berat molekul 66,988 kDa, *Uncharacterized protein* dengan berat molekul 35,857 kDa, dan *Uncharacterized protein* dengan berat molekul 24,163 kDa belum ditemukan penelitian yang menjelaskan fungsinya dalam menurunkan diabetes dalam tubuh.

5.5. Asam Amino yang berperan dalam menurunkan *Diabetes Mellitus*

Insulin merupakan hormon yang diproduksi oleh β-sel di dalam pankreas dan berperan penting dalam metabolisme tubuh. Di dalam pankreas terdapat cluster sel yang disebut islet dan di dalam islet terdapat β-sel yang berfungsi untuk melepaskan insulin ke dalam darah. Pada pencernaan manusia, karbohidrat komplek seperti pati akan dipecah menjadi bentuk yang lebih sederhana, yaitu glukosa. Glukosa akan memasuki aliran darah dan dengan bantuan insulin, sel akan mampu menyerap glukosa di dalam darah dan mengubahnya menjadi energi (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK), 2012).

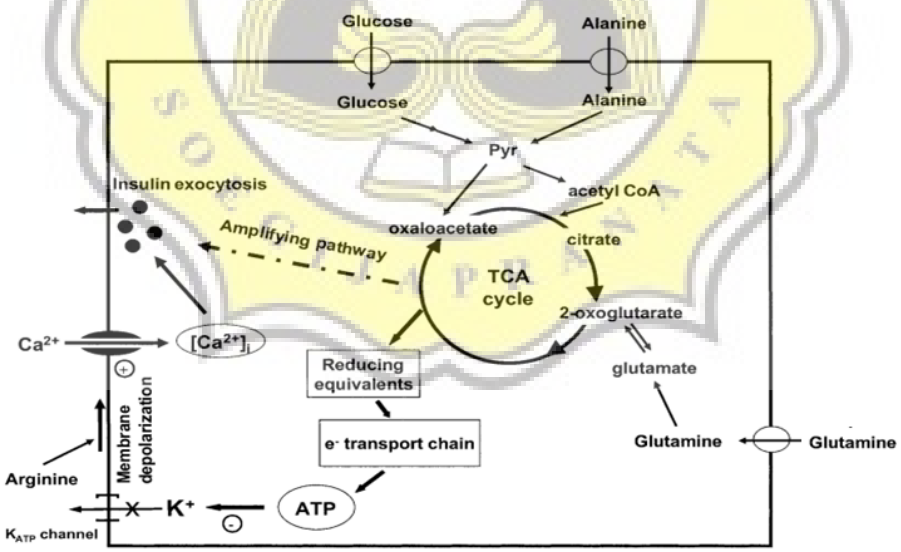
Penyakit diabetes melitus atau *type 2 diabetes mellitus* (T2DM) merupakan penyakit atau kelainan metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia kronis yang dihasilkan akibat terganggunya proses sekersi insulin atau tubuh mengalami *insulin resistance* (IR) (Kharroubi,2015). *Insulin resistance* merupakan kondisi dimana tubuh dapat memproduksi insulin dalam jumlah cukup tetapi tidak dapat mengenali atau menggunakanya secara efektif. Insulin resistance akan menyebabkan glukosa dalam darah sangat tinggi karena glukosa tidak dapat diserap oleh sel, dan ini merupakan

indikasi awal penyakit T2DM. Pada kondisi insulin resistance, sel otot, lemak, dan hati tidak dapat merespon insulin dengan tepat, sehingga glukosa dalam darah tidak mudah terserap. Oleh sebab itu, tubuh memerlukan insulin dalam jumlah yang lebih tinggi untuk membantu mendorong glukosa masuk ke dalam sel, sehingga β-sel di dalam pankreas akan berkerja lebih keras untuk menghasilkan insulin dalam jumlah lebih. Selama β-sel mampu memproduksi insulin yang cukup untuk mengatasi insulin resistance, gula darah dalam tubuh tetap pada kondisi yang baik. Kondisi ini disebut dengan *Compensatory hyperinsulinaemia*.Namun β-sel yang bekerja terlalu keras dalam jangka panjang dapat menyebabkan penurunan fungsi bahkan kerusakan yang fatal, sehingga terjadi penurunan jumlah atau kegagaln produksi insulin. Tanpa adanya insulin dalam jumlah yang cukup, glukosa dalam darah akan meningkat signifikan dan menyebabkan seseorang menderita penyakit diabetes melitus kronis dan penyakit komplikasi lainnya (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK), 2012).

Stimulus utama dalam sekresi insulin oleh β-sel adalah peningkatan kadar glukosa dalam darah. Dua stimulus utama lainnya adalah asam amino seperti arginin dan glutamin, serta asam lemak. Metabolisme campuran nutrisi atau senyawa stimulus ini akan menghasilkan metabolic coupling factors (MCFs) yang sangat esensial dalam menginduksi insulin eksositosis. Komponen MCFs utama dalam β-sel antara lain ATP, NADPH, rantai panjang acyl coenzyme, glutamate, diasilgliserol. Kekurangan jumlah dan kegagalan pembentukan MCFs akan menyebabkan kegagalan sekresi insulin oleh β-sel pada penderita T2DM. Oleh sebab itu, segala nutrisi yang dibutuhkan β-sel untuk mensekresi insulin harus tersedia dalam jumlah yang sesuai (Newsholme, 2012).

Mekanisme sekresi insulin oleh β-sel diawali dari proses GSIS (*glucose-stimulated insulin secretion*) terhadap β-sel di pankreas. Kemudian glukosa memasuki sel melalui GLUT transport, fosforilasi oleh glukokinase terjadi dan piruvat dihasilkan melalui proses glikolisis. Selain itu, piruvat juga dapat dihasilkan oleh metabolisme asam amino alanin. Kemudian piruvat akan diubah menjadi asetil Co-A. Selanjutnya, asetil Co-A akan memasuki *tricarboksilat acid cycle* (siklus TCA). Di dalam siklus TCA, proses

utama yang terjadi adalah perubahan asetil Co-A akan menjadi asam sitrat kemudian 2-oxoglutarat dan selanjutnya oksaloasetat. Asam glutamin yang memasuki sel dapat diubah menjadi glutamat yang selanjutnya dapat diubah menjadi 2-oxoglutarat. Ini merupakan salah satu jalan pintas agar siklus TCA dapat berlangsung meski tanpa kehadiran piruvat dan dapat berlangsung lebih cepat. Setelah terbentuk oksaloasetat, siklus TCA akan dilanjutkan dengan proses transport elektron yang menghasilkan ATP. Peningkatan jumlah ATP menyebabkan penutupan pintu K_{ATP} dan depolarisasi sel membran, menghasilkan tegangan yang cukup kuat untuk membuka pintu arus Ca^{2+}. Proses masuknya ion kalsium ke dalam sel diikuti dengan pelepasan insulin. Pada proses ini, asam amino arginin berperan penting dalam mendorong depolarisasi sel membran hingga terbukanya pintu Ca^{2+}, sehingga semakin banyak jumlah asam amino arginin, maka proses depolarisasi membran semakin sering dan dalam rentang waktu yang lebih panjang, sehingga pintu ion kalsium dapat terbuka lebih sering dan menyebabkan semakin banyak insulin yang dilepaskan. Selama proses depolarisasi membran, asam amino arginin dapat mendorong Gambar 7(Newsholme *et al.*,2006).



Gambar 7. Mekanisme Sekresi Insulin dari B-sel (Newsholme, 2006)

Glukosa dan nutrisi lainnya seperti asam amino dan asam lemak akan membantu mendorong proses sekresi insulin melalui berbagai metabolisme di dalam β-sel yang mampu menghasilkan MCFs, termasuk peningkatan jumlah ATP yang akan

menyebabkan sekresi insulin semakin optimum. Beberapa asam amino memiliki peran sangat penting dalam metabolisme mitokondria karena mampu mengomptimalkan pembentukan ATP. Paparan asam amino dalam jangka panjang dapat mempengaruhi ekspresi gen di β-sel yang kemudian dapat berdampak pada sekresi insulin. Beberapa asam amino utama yang paling berpengaruh terhadap sekresi insulin adalah arginin, glutamin, glutamat, dan alanin (Newsholme *et al.*,2012).

Penyakit diabetes melitus terdiri atas 2 tahap, yaitu *resistance insulin* pada tahap awal dan kerusakan β sel pada tahap akhir. *Resistance insulin* terjadi ketika tubuh tidak dapat mengenali insulin meskipun jumlahnya mencukupi, sehingga glukosa tidak dapat diserap otot dan mengakibatkan kadar gula dalam darah akan melambung tinggi. Mekanisme insulin yang mentimulasi penyerapan glukosa di otot dan jaringan adipose terjadi di endotelium vaskular (Gambar 8). Seluruh mekanisme tersebut bertujuan agar vasodilatasi dan vasoconstrictor dapat terjadi, sehingga glukosa dapat diserap otot dalam jumlah tinggi. Dalam mencapai proses vasodilatasi, insulin yang memasuki endotelium vaskular akan melewati mekanisme PI3-kinase dan menghasilkan Akt yang secara langsung meningkatkan aktivitas eNOS (*endothelial NO synthase*), sehingga produksi NO meningkat. Peningkatan NO akan mendorong proses vasodilatasi. Peranan NO sebagai *critical mediator transendhotelial* dalam transport insulin ke interstitial (seperti sel otot), akan mendorong penyerapan glukosa secara langsung (Amy M. Jonk *et al.*,2007 dan Joyce M. Richey, 2013).

Sedangkan, untuk mencapai tahap vasoconstrictor, insulin yang memasuki endotelium vaskular akan diubah menjadi ET-1 (*peptide endothelin*-1) melalui *MAP-kinase signaling pathway* dan *extracellular signal-regulated kinase-1/2* (ERK1/2). Dalam proses ini, tidak ada proses produksi NO. Antara kedua proses tersebut, vasodilatasi dan vasoconstriktor, akan terjadi secara bersamaan dan harus dalam jumlah seimbang untuk memaksimalkan penyerapan glukosa. Dalam kondisi normal, vasodilatasi akan berjumlah lebih banyak daripada vasoconstriktor. Namun pada penderita T2DM, proses vasoconstriktor akan berjumlah lebih banyak dan mengakibatkan gagalnya penyerapan glukosa oleh sel otot. Hal tersebut dapat terjadi karena kemampuan penderita T2DM

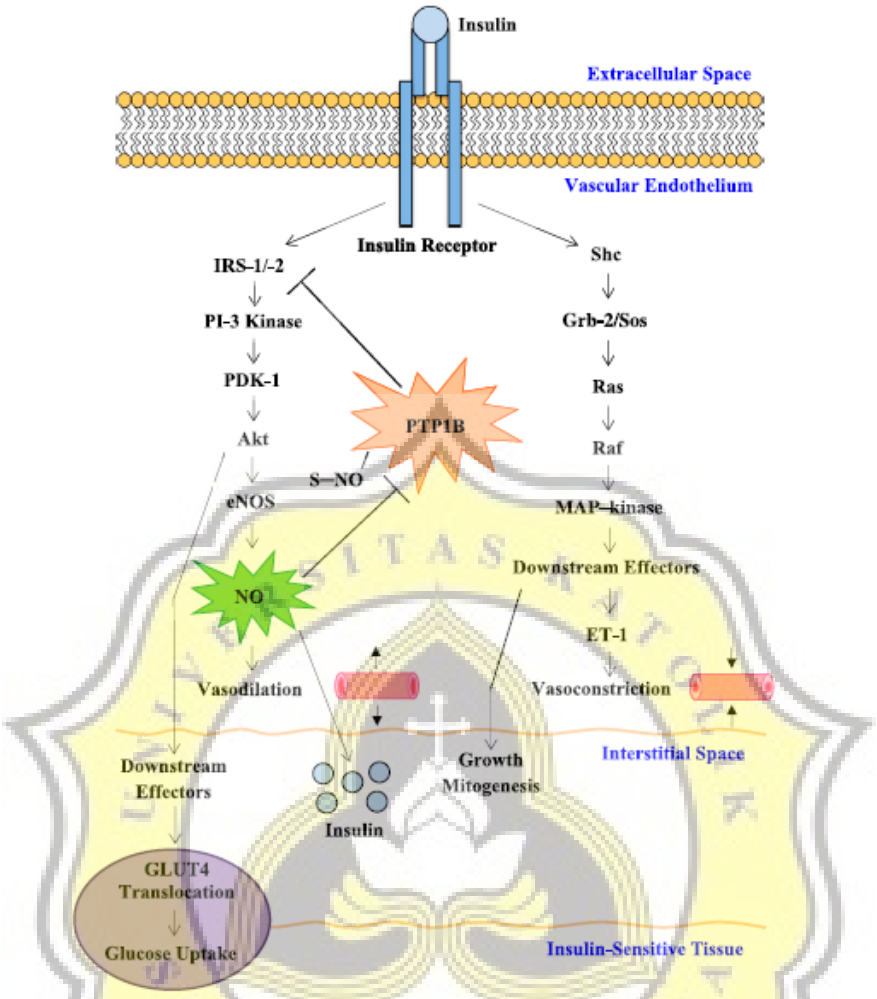
memproduksi NO menurun drastis. Oleh sebab itu, pada penderita T2DM, produksi NO dalam jumlah besar sangatlah diperlukan. NO dapat meningkatkan transport insulin melalui PTB1B (*protein-tyrosine phosphatase* 1B), sehingga tahap vasodilatasi lebih cepat tercapai (Amy M. Jonk *et al*.,2007 dan Joyce M. Richey, 2013).

Dalam penelitiannya Wang *et al*.(2013) menggunakan endotelium sapi untuk melihat hubungan insulin dengan NO. Yang pertama, NO secara langsung mendorong penyerapan dan transport insulin di sel endotelium. NO donors seperti *sodium nitroprusside* dan L-arginin meningkatkan transport dan penyerapan insulin sedangkan treatment dengan NO synthase inhibitor L-NAME (L-NG-*nitro-L-arginine methyl ester*) akan menghambat penyerapan. NO dapat meningkatkan transport insulin dengan menambah jumlah protein S-nitrosilasi, seperti PTB1B.

Asam amino arginin diketahui dapat menstimulasi pelepasan insulin melalui transport elektrogenik ke β-sel menggunakan *mCAT2A amino acid transpoter*, menghasilkan depolarisasi membran dan terbukanyan pintu arus ion kalsium dan terjadi sekresi insulin. Arginin juga dapat dikonversi menjadi L-glutamat, sehingga dapat mempengaruhi sekresi insulin dengan menghasilkan lebih banyak MCFs. Berdasarkan penelitian Krause *et al*. (2011), diketahui beberapa pengaruh positif arginin terhadap metabolisme β-sel antara lain, menstimulasi sekresi insulin oleh β-sel, sebagai antioksidan dan pelindung, meningkatkan konsumsi glukosa, serta mendorong sintesis glutamat. Selain itu, arginin menjadi prokusor utama dalam produksi *Nitric Oxide* (NO) di tubuh. Seseorang penderita T2DM akan memiliki sistem produksi NO yang sudah berubah, sehingga NO yang dihasilkan sangat sedikit. Jumlah NO yang kurang akan mempengaruhi sensitifitas tubuh terhadap insulin dan memicu penyakit diabetic neforophaty atau peenyakit ginjal yang disebabkan karena diabetes melitus kronis. Arginin akan diubah atau dikonversi menjadi NO oleh NOS (*Nitric Oxide Synthase*). Selanjutnya NO dilepaskan dari endotelium pembuluh darah dengan bantuan eNOS enzyme, sehingga vasodilatasi oleh cGMP (*cyclic guanosine monophosphate*) dapat terjadi. Peningkatan vasodilatasi akan menyebabkan peningkatan laju filtasi glomerular (GFR) dan penigkatan GFR akan memperlambat kerusakan ginjal. Peningkatan

vasodilatasi berbanding lurus dengan jumlah NO yang dihasilkan, oleh sebab itu semakin tinggi asam amino arginin, maka semakin banyak NO yang dihasilkan, kerusakan ginjal semakin terhambat dan sensitifitas insulin meningkat (Taylor Claybaugh, 2014).

Krause *et al.*(2012), mengungkapkan bahwa inkubasi β-sel yang mengandung *proinflammatory cytokines* tanpa kehadiran argininn dapat menyebabkan kematian β-sel, sedangkan peningkatan konsentrasi arginin mampu mempertahankan fungsi dan aktivitas β-sel. Oleh sebab itu, arginin merupakan asam amino yang memiliki peran sangat penting dalam menjaga fungsi β-sel dalam sekresi insulin dan mencegah kerusakan ginjal pada penderita T2DM. Sehingga dapat disimpulkan bahwa arginin sangat berperan dalam meningkatkan produksi NO. Kandungan arginin dalam beras putih memiliki konsentrasi yang paling tinggi dibandingkan dengan beras merah dan hitam, yaitu 297,10. Sedangkan beras hitam memiliki kandungan yang paling rendah, yaitu 168,2 dan beras merah mengandung arginin sebanyak 274,34.



Gambar 8. Bagan Mekanisme Transport Insulin di Endotelium Vaskular

Rata-rata konsentrasi L-glutamin di ekstraseluler adalah 0,7mmol/L. Asam amino L-glutamin dapat dikonsumsi dengan cepat oleh islet maupun β-sel. Selain itu, L-glutamin mudah diserap dan dimetabolisme oleh islet, meskipun tanpa bantuan asam amino dan MCFs lainnya, L-glutamin tidak dapat menstimulasi sekresi insulin dan mendorong terjadinya *glucose-induced insulin secretion*. Aktivasi GDH (*glutamate dehydrogenase*) dengan penambahan leusin dapat mendorong sekresi insulin dengan meningkatkan jumlah glutamin karbon yang masuk ke siklus TCA. Berdasarkan skema ini, diketahui bahwa glutamin akan dimetabolisme menjadi GABA (*γ-aminobutyric acid*) dan L-aspartat dengan melepaskan CO_2 dari L-[U-^{14}C] glutamin selama proses.

Berdasarkan penelitian Henquin (2000), ditemukan bahwa produk utama metabolisme L-[1,2^{13}C] glutamin adalah L-[1,2-^{13}C] glutamat dan L-aspartat pada C1 dan C4 di β-sel. L-asparat terbentuk setelah L-glutamat masuk ke dalam siklus TCA. Sedangkan L-glutamat dihasilkan ketika glutamin memasuki siklus γ-glutamyl yang menghasilkan peningkatan produksi glutathione. Glutathione merupakan salah satu tripeptide yang mengandung asam amino utama berupa asam glutamat, sistein, dan glisin. Dalam tubuh, glutathione merupakan antioksidan terbaik yang dapat mencegah dan mengobati berbagai penyakit kronis, salah satunya T2DM, sehingga keberadaan glutathione ini sangat penting di dalam tubuh. Kekurangan glutathione dalam tubuh penderita T2DM dapat mengganggu respon sitokin. Penelitian terbaru menemukan bahwa L-glutamat akan dilepaskan dari β-sel ke medium ekstraseluler. Pelepasan glutamat dalam jumlah sangat besar dapat menyebabkan aktivasi glutamat reseptor dan desensitisasi sel untuk meningkatkan sinyal sekresi insulin, mewakili mekanisme autokrin baru untuk pengaturan fungsi β-sel. Memang konsentrasi subletal pro-inflamasi sitokin secara signifikan mampu meningkatkan konsumsi glukosa dan pelepasan glutamat dari clonal β-sel line, sehingga hal ini dapat menjelaskan mekanisme *cytokine-dependent inhibition* dari sekresi insulin. Sitokin merupakan protein yang akan berinteraksi dengan sistem imun untuk mengatur respon sistem imun terhadap penyakit atau infeksi. Namun jumlah sitokin yang berlebih dapat memicu sitokin TNF-α yang dapat menghambat sensitifitas tubuh terhadap insulin dan menurunkan GSIS sehingga mempengaruhi jumlah sekresi insulin. Glutamat diketahui sebagai penghambat sekresi glukagon dari alfa sel pankreas, glutamat yang dilepaskan dari β-sel mungkin akan mempengaruhi mekanisme paracrine (mekanisme pelepasan hormon) dari pankreas. Berdasarkan penelitian ini, ditemukan bahwa beras merah memiliki kandungan glutamin paling tinggi, yaitu 196,77. Sedangkan beras hitam memiliki kandungan glutamin paling rendah, yaitu 145,97.

Menurut Maechelar dan Wolheim (1999), L-glutamat berperan dalam menstimulus terbentuknya MCFs, sebagai faktor tambahan yang memperkuat proses GSIS. Namun masih terdapat perdebatan mengenai fungsi glutamate dalam meningkatkan sekresi insulin. Sebuah penelitian yang dilakukan Broca C*et al*., (2003), mengatakan bahwa total jumlah glutamat dalam sel dapat meningkatkan GSIS dalam β-sel manusia dan

tikus, sedangkan menurut penelitian MacDonald *et al* (2000), menunjukkan jumlah glutamat di dalam sel tidak mempengaruhi sekresi insulin. Penemuan bahwa aktivasi mitokondria di dalam permeabilisasi β-sel secara langsung menstimulasi eksositosis atau sekresi insulin, hal ini mengawali dugaan asam glutamat sebagai *intracellular messenger*. Asam glutamat diduga akan dipindah ke dalam *secretory granules*, sehingga dapat mendorong terbukanya pintu ion kalsium dan meningkatkan sekresi insulin. Hal ini didukung oleh Gammelsaeter *et al.* (2011) bahwa transporter glutamat di secretory granules telah mendemonstrasikan manfaat glutamat dalam menstimulus sekresi insulin. Beras merah mengandung asam amino glutamat paling tinggi, yaitu 282,74, sedangkan beras hitam memiliki kandungan asam glutamat terendah.

Penambahan 10mmol/L alanin pada konsentrasi basal glukosa, dapat meningkatkan sekresi insulin pada β-sel 1,6 hingga 3 kali lebih banyak. Pada β-sel, aktivitas insulintropik L-alanin merupakan hasil dari *co-transport* dengan Na^+ yang akan menghasilkan depolarisasi membran dan menjadi awal meningkatnya ion kalsium ke dalam sel. Proses metabolisme dan oksidasi L-alanin sangat mempengaruhi aktivitasnya dalam menstimulus sekresi insulin (Newsholme *et al.*,2012). Kandungan alanin tertinggi dimiliki oleh beras merah yang mencapai 421,9. Sedangkan jumlah alanin beras putih dan hitam hanya 282,87 dan 317,98. Berdasarkan penjelasan di atas serta data-data hasil penelitian ini, maka dapat disimpulkan bahwa beras merah paling berpengaruh dalam mencegah dan membantu mengobati T2DM dari segi jumlah asam amino utama. Hal tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa beras merah dan hitam lebih efektif mencegah T2DM daripada beras putih. Hal ini didukung oleh Kalman (2014) yang menyampaikan bahwa persentase keempat asam amino tersebut dalam beras merah sangatlah tinggi. Menurut Kalman (2014), jumlah asam amino alanin, glutamat, dan arginin pada beras merah mencapai 5,6%, 17,4%, dan 7,4%. Menurut Raghuvanshi *et al.* (2017), tingginya asam amino pada beras merah disebabkan kandungan antosianin di dalam beras. Namun hal tersebut kurang sesuai dengan Chanu (2015) yang menemukan beras hitam memiliki kandungan protein dan asam amino paling tinggi dibandingkan beras merah dan putih dikarenakan kandungan antosisanin pada beras hitam lebih tinggi dibandingkan beras merah, Menurutnya, *pigmented*

*rice*memiliki manfaat lebih bagi penderita diabetes karena kandungan antosianin yang tidak dimiliki oleh beras putih. Ketidaksesuaian ini dapat disebabkan karena perbedaan varietas beras yang digunakan pada penelitian ini dengan varietas beras pada penelitian sebelumnya. Kadar protein beras dipengaruhi oleh derajat sosoh serta kandungan nutrisi dalam tanah. Tanah dengan kandungan N yang tinggi akan meningkatkan jumlah protein dan asam amino di dalam beras (Hernawan, 2016). Selain itu, keberadaan asam amino juga dipengaruhi ketersediaan cahaya alami yang mampu memecah nitrat menjadi molekul asam amino bebas (Rehman *et al.,* 2016 dan Cheng-Wei Liu *et al*., 2014).