

PURPLE CORN ANTHOCYANIN EXTRACT IMPROVE DYSLIPIDEMIA AND HYPERGLYCEMIA OF WISTAR RATS FED HIGH FAT DIET

ABSTRACT

The high incidence of non-communicable diseases (NCD), especially heart disease (cardiovascular disease = CVD) associated with dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus (DM) associated with hyperglycemia are problems in the world and in Indonesia. The overeating (overnutrition), especially the consumption of excess fat, and lack of activity are some of the causes of CVD and type 2 DM. High fat diet causes oxidative stress due to increased lipid peroxidations, decreased enzymatic antioxidant activities, and decreased levels of non-enzymatic antioxidants. Therefore, consumption of antioxidants is expected to improve the condition of the diseases. One kind of antioxidants is purple corn anthocyanin.

In general, the study aimed to evaluate the physical and chemical properties of purple corn and purple corn anthocyanin extract (PCAE) as well as their potency to improve dyslipidemia and hyperglycemia of Wistar rats fed high fat diet. Specifically, the research aimed to: 1) evaluate the physical and chemical properties of three local varieties of purple corn and their PCAE's, i.e. Pulut Manado, Malang Biasa, and Malang Pekat, 2) evaluate the effect of the sieving fractions on the physical and chemical properties of purple corn, 3) evaluate the effect of solvent on the physical and chemical properties of PCAE, 4) evaluate the effect of PCAE on the improvement of dyslipidemia and hyperglycemia of Wistar rats fed high fat diets, and 5) evaluate the mechanism of actions of PCAE in the improvement of dyslipidemia and hyperglycemia of Wistar rats fed high fat diet.

The raw materials were three varieties of purple corn originating from Maros, South Sulawesi (Pulut Manado variety), and Malang, East Java (Malang Ordinary and Malang Pekat varieties). The study was divided into five stages: 1) determination of the physical and chemical properties of three varieties of purple corn and their PCAE's, 2) determination of fraction of purple corn flour, 3) determination of solvent to obtain PCAE, and 4) *in vivo* study of the potential of PCAE in the improvement of dyslipidemia and hyperglycemia. Twenty four-male Wistar rats were divided into six groups according to the diet: standar diet as a normal control (NLC) group; high-fat diet as a negative control (NC) group; high-fat diet + pioglitazone 1.35 mg/ kg body weight (bw) as a positive control (PC) group; high-fat diet + PCAE 6.25 mg cyanidin-3-glucoside equivalent (CGE)/ kg body weight (bw) as an LA group; high-fat diet + PCAE 12.5 mg CGE/ kg bw as an MA group; and high fat diet + PCAE 25 mg CGE/ kg bw as an HA group. The parameters of the analysis carried out were: lipid profiles and adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) for the dyslipidemia parameters; lipid peroxidation, total antioxidant capacity, superoxide dismutase (SOD) levels and SOD activity for oxidative stress parameters; glucose levels, insulin levels, glucagon-like peptide-1 (GLP-1), GLP-1 receptor (GLP-1R), and glucose transporter-4 (GLUT-4) for hyperglycemia parameters; and also body weights, feed

weights, and organ weights. The liver SOD levels were determined for subcellular mitochondrial and cytosolic fractions. Atherogenic index, lipid peroxidation index, and *homeostatics model assessment of insulin resistance* (HOMA-IR) scores were calculated for assessing dyslipidemia, oxidative stress, and insulin resistance. Statistical analysis was performed with T-test and one-way ANOVA followed by Least Square Differences (LSD) or Duncan's Multiple Range Test (DMRT). Correlation between parameters were determined using Pearson's bivariate correlation test.

In general, the results showed that purple corn anthocyanin extract made from ethanol-3% citrate solvent had the ability to improve dyslipidemia and hyperglycemia of Wistar rats fed high-fat diet. Specifically, this study concluded that: 1) Malang Pekat variety and the related PCAE's had higher levels of anthocyanin, total phenolics, total flavonoids, antioxidant activity, and anthocyanin components compared to Pulut Manado and Malang Biasa varieties, 2) Purple corn flour fraction that did not pass sieving 60 mesh had higher levels of total anthocyanins, total phenolics, total flavonoids, and antioxidant activities than the fraction that passed sieving, 3) Malang Pekat anthocyanin extract of ethanol-3% citrate solvent had total anthocyanin, total phenolics, total flavonoids, antioxidant activity contents, and anthocyanin components higher than the extract of aquades-3% citrate solvent, 4) High-fat diet caused dyslipidemia and hyperglycemia in Wistar rats. The administration of purple corn anthocyanin extract along with a high-fat diet improved dyslipidemia and hyperglycemia proved by the decrease in atherogenic index, lipid peroxidation index, and HOMA-IR, and 5) Purple corn anthocyanin extract improved dyslipidemia through a mechanism of liver AMPK enhancement, improved oxidative stress through increased liver SOD activity with no increased liver mitochondrial SOD levels, and improved hyperglycemia through increased plasma GLP-1 and pancreatic GLP-1R.

ASUPAN EKSTRAK ANTOSIANIN JAGUNG UNGU UNTUK PERBAIKAN DISLIPIDEMIA DAN HIPERGLIKEMIA TIKUS PUTIH WISTAR DIET TINGGI LEMAK

INTISARI

Tingginya penderita Penyakit Tidak Menular (PTM) terutama penyakit jantung (*cardiovascular disease*=CVD) yang dikaitkan dengan dislipidemia dan diabetes mellitus (DM) tipe 2 yang dikaitkan dengan hiperglikemia menjadi permasalahan tersendiri di dunia dan di Indonesia. Salah satu penyebab CVD dan DM tipe 2 adalah kelebihan gizi (*overnutrition*) terutama konsumsi lemak berlebih dan kurang aktivitas. Konsumsi makanan tinggi lemak menyebabkan stres oksidatif akibat peningkatan peroksidasi lipida, penurunan aktivitas antioksidan enzimatis, dan penurunan kadar antioksidan non-enzimatis. Oleh karena itu, konsumsi antioksidan diharapkan dapat memperbaiki kondisi penyakit tersebut. Salah satu pangan yang tinggi antioksidan adalah jagung ungu yang mengandung antosianin.

Secara umum, penelitian bertujuan untuk mengevaluasi sifat fisik dan kimia jagung ungu dan ekstrak antosianin jagung ungu (EAJU) serta potensinya dalam perbaikan dislipidemia dan hiperglikemia tikus putih Wistar diet tinggi lemak. Secara khusus, penelitian bertujuan untuk: 1) mengevaluasi sifat fisik dan kimia jagung ungu dan ekstrak antosianinnya dari tiga varietas lokal, yaitu Pulut Manado, Malang Biasa, dan Malang Pekat, 2) mengevaluasi pengaruh fraksi tepung jagung ungu terhadap sifat fisik dan kimianya, 3) mengevaluasi pengaruh jenis pelarut terhadap sifat fisik dan kimia ekstrak antosianin jagung ungu, 4) mengevaluasi pengaruh ekstrak antosianin jagung ungu terhadap perbaikan dislipidemia dan hiperglikemia tikus putih Wistar diet tinggi lemak, dan 5) mengevaluasi mekanisme kerja ekstrak antosianin jagung ungu dalam perbaikan dislipidemia dan hiperglikemia tikus putih Wistar diet tinggi lemak.

Bahan baku jagung ungu terdiri dari tiga varietas berasal dari Maros, Sulawesi Selatan (varietas Pulut Manado), dan Malang, Jawa Timur (varietas Malang Biasa dan Malang Pekat). Penelitian dibagi menjadi empat tahap: 1) pemilihan varietas jagung ungu sebagai bahan baku pembuatan ekstrak antosianin jagung ungu, 2) pemilihan fraksi tepung jagung ungu, 3) pemilihan jenis pelarut untuk pembuatan ekstrak antosianin jagung ungu, 4) Uji *in-vivo* ekstrak antosianin jagung ungu dalam perbaikan dislipidemia dan hiperglikemia pada tikus putih Wistar diet tinggi lemak menggunakan 24 ekor tikus putih Wistar jantan yang dibagi menjadi enam kelompok: kontrol normal (NLC); kontrol negatif (NC) diet tinggi lemak; kontrol positif (PC) diet tinggi lemak + obat standar pioglitazone 1,35 mg/kg bb; perlakuan LA diet tinggi lemak + EAJU 6,25 mg *cyanidin-3-glucoside equivalent* (CGE)/ kg berat badan (bb); perlakuan MA diet tinggi lemak + EAJU 12,5 mg CGE/ kg bb; dan perlakuan HA diet tinggi lemak + EAJU 25 mg CGE/ kg bb. Parameter analisis yang dilakukan adalah: profil lipid dan *adenosin monophosphate-activated protein kinase* (AMPK) untuk parameter perbaikan dislipidemia; peroksidasi lipida, kapasitas antioksidan total, kadar superoksida dismutase (SOD) dan aktivitas SOD untuk parameter perbaikan stres oksidatif; kadar glukosa, kadar insulin, *glucagon*-

like peptide-1 (GLP-1), GLP-1 receptor (GLP-1R), dan glucose transporter-4 (GLUT-4) untuk parameter perbaikan hiperglikemia; serta berat badan, berat pakan, dan berat organ. Kadar SOD hati ditentukan untuk fraksi subseluler mitokondria dan sitosol. Kondisi dislipidemia, stres oksidatif, dan resistensi insulin diketahui dengan menghitung skor indeks atherogenik, indeks peroksidasi lipid, dan *homeostatics model assessment of insulin resistance (HOMA-IR)*. Analisis statistik dilakukan dengan uji-T dan analisis variansi satu jalur dilanjutkan dengan *least square differences (LSD)* atau *Duncan's multiple range test (DMRT)*. Korelasi antar parameter diketahui dengan uji korelasi Pearson's bivariate.

Secara umum, hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak antosianin jagung ungu yang dibuat dengan menggunakan pelarut etanol-sitrat 3% mempunyai kemampuan dalam perbaikan dislipidemia dan hiperglikemia pada tikus putih Wistar diet tinggi lemak. Secara khusus, penelitian ini menyimpulkan bahwa: 1) Jagung ungu dan ekstrak antosianin jagung ungu varietas Malang Pekat mempunyai kadar antosianin total, fenolat total, flavonoid total, aktivitas antioksidan, dan komponen antosianin lebih tinggi dibandingkan varietas Pulut Manado dan Malang Biasa, 2) Fraksi tepung jagung ungu yang tidak lolos pengayakan 60 mesh mempunyai kadar antosianin total, fenolat total, flavonoid total, dan aktivitas antioksidan lebih tinggi daripada fraksi yang lolos pengayakan, 3) Ekstrak antosianin jagung ungu Malang Pekat dengan pelarut etanol-sitrat 3% mempunyai kadar antosianin total, fenolat total, flavonoid total, aktivitas antioksidan, dan komponen antosianin lebih tinggi daripada pelarut aquades-sitrat 3%, 4) Diet tinggi lemak menyebabkan dislipidemia dan hiperglikemia pada tikus putih Wistar. Pemberian ekstrak antosianin jagung ungu 12,5 mg CGE/ kg bb bersamaan dengan diet tinggi lemak memperbaiki dislipidemia dan hiperglikemia dengan penurunan indeks atherogenik, indeks peroksidasi lipid, dan resistensi insulin, dan 5) Ekstrak antosianin jagung ungu memperbaiki dislipidemia melalui mekanisme peningkatan AMPK hati, memperbaiki stres oksidatif melalui peningkatan aktivitas SOD hati tanpa peningkatan kadar SOD2 mitokondria hati, dan memperbaiki hiperglikemia melalui peningkatan GLP-1 plasma dan GLP-1R pankreas.