

Prosidings

# PERKEMBANGAN TERKINI TENTANG TEMPE: TEKNOLOGI, STANDARDISASI DAN POTENSINYA DALAM PERBAIKAN GIZI SERTA KESEHATAN

Bogor, 28-29 Agustus 2008

IPB International Convention Center (IICC)

Kampus IPB Baranang Siang Bogor

**Editor:**

Hardinsyah

Made Astawan

Harsi Kusumaningrum

Leily Amelia

Dodik Briawan

Muhammad Aries

Diselenggarakan oleh:

Forum Tempe Indonesia (FTI), Yayasan Tempe Indonesia, dan  
PERGIZI PANGAN Indonesia

*bekerjasama dengan*

Indofood Nutrition dan ASA International Marketing

2008



ISBN: 978-979-19919-0-2

## STUDI PERANAN ASAM AMINO ARGININ TEMPE PADA PENGENDALIAN GULA DARAH DAN KESEMBUHAN LUKA PADA TIKUS DIABETES YANG DIINDUKSI STREPTOZOTOCIN (STZ)

Rimbawan<sup>1</sup>, Ekowati Handharyani<sup>2</sup>, Dian S Ghozali<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departemct of Nutrition Community, Faculty of Human Ecology, IPB

<sup>2</sup>Departemct of Phathology, Faculty of Veterinary Medicine, IPB

**ABSTRACT.** A diet called "diet G" has been recommended by Askandar (2002) in Indonesia to be consumed by patients with diabetic foot complication. The diet contains 20 percent protein high in arginine. Experience obtained by some nutritionists in Kutai Timur District (Eastern Borneo) showed that tempe gives a positive effect on healing process of diabetic foot patients, especially if tempe is used as a protein source of the diet. This can be seen by increasing dryness area of injured foot and decreasing suppuration on diabetic foot. It is hypothesized that arginine in tempe plays an important role on that healing process of diabetic foot. A research has been conducted to explore a novel application or usage of arginine of tempe in wound healing due to diabetes using rat as experimental animals. Diabetes was induced in male Sprague Dawley rats by intraperitoneal injection of 40 mg/kg streptozotocin (STZ). Non diabetes rats were injected with equal volumes of phosphate buffer saline (PBS) at the same time as STZ injection. In the seven day after STZ administration, wounding (length 0.8 x 0.8 cm) was resected with scissiors on the clipped dorsal skin of animals under ketamin-xylazin anesthesia. The curative effect was expressed as the percentile of wound area compared with that at day 0 (100%). The diabetic rats was divided into 3 groups, they are group receiving casein diet (control+STZ), arginine tempe 1.4% (Tempe1+STZ) and arginine tempe 1.6% (Tempe2+STZ). The non diabetic rats also divided into 3 groups, they were group receiving casein diet (control), arginine tempe 1.4% (Tempe1) and arginine tempe 1.6% (Tempe 2). Compared with control+STZ, the Tempe1+STZ group (arginine tempe 1.4%) has the same speed level of healing, but control+STZ group could not decrease blood glucose level ( $428.67 \pm 38.43$  mg/dL in control+STZ group and  $187.6 \pm 46.3$  mg/dL in Tempe2+STZ group). All groups receiving tempe had lower blood glucose level compared with diabetic rats receiving casein ( $p < 0.01$ ) and not significantly different from non diabetic rats receiving tempe or casein. The speed of healing between diabetic and non diabetic group shows no significant difference, except in Tempe2+STZ ( $p < 0.05$ ). Thus, it can be concluded that giving tempe with arginine 1.4% can give positive influence to the speed level of wound healing and to the decreasing of blood glucose level in rats.

Keywords: diabetes mellitus, streptozotocin, wound healing, arginine tempe, tempe, blood glucose

## PENDAHULUAN

Diabetes mellitus merupakan suatu penyakit menahun yang ditandai oleh kadar glukosa darah yang melebihi nilai normal. Apabila tidak dikendalikan, pada suatu saat akan menyebabkan berbagai komplikasi kronis, seperti; kardio diabetik (penyakit jantung), nefropati diabetik (gagal ginjal), impotensi, retinopati diabetik, dan kaki diabetik. Kaki diabetik (*diabetic foot*) merupakan salah satu komplikasi kronik DM yang paling buruk hasil pengelolaannya (Waspadji, 2000) dengan prevalensi sekitar 15 persen. Akibat tidak tertangani dengan baik, kurang lebih 14-24 persen dari penderita kaki diabetik ini memerlukan tindakan amputasi (ADA, 1999).

Diet "G", yang memiliki komposisi 20 persen protein (tinggi asam amino arginin), telah direkomendasikan Askandar (Tjokroprawiro, 2002) sebagai diet yang diberikan pada pasien dengan komplikasi kaki diabetik ini. Tempe telah digunakan para tenaga medis di Kabupaten Kutai Timur dalam upaya penyembuhan kaki diabetik ini, dengan menganjurkan penderita yang dirawat agar menghindari protein hewani sebagai lauk menunya dan menggantinya dengan lauk tempe sebagai sumber protein. Hal tersebut dikarenakan tempe dianggap dapat mempercepat pengeringan luka dan menurunkan keadaan surpurasi (nanah) pada luka.

Kaki diabetik timbul dikarenakan gagalannya proses dalam kesembuhan luka. Beberapa penelitian pada hewan percobaan dan pada manusia secara *in vitro*, menyatakan bahwa kegagalan tersebut diasumsikan sebagai akibat keadaan gula darah yang tidak terkontrol, penurunan respon inflamasi, penurunan jumlah kolagen dan lambatnya proliferasi sel fibroblas yang secara khusus juga ditemukan pada penderita kaki diabetik (Black, 2003).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian tempe terhadap penurunan gula darah dan proses kesembuhan luka pada hewan percobaan (tikus) yang diinduksi diabetes, dengan menekankan pengaruh asam amino arginin yang berasal dari tempe. Asam amino tersebut dalam beberapa studi literatur telah jelas berperan dalam proses penyembuhan luka diabetik (Witte *et al.*, 2002, Kohli *et al.*, 2004), meskipun faktor-faktor lain yang terdapat dalam tempe, diduga memiliki andil dalam proses persembuhan, seperti seng (Zn), vitamin B, asam lemak esensial (ALE), serat, dan isoflavon tempe.

## METODE PENELITIAN

### Pembuatan Tempe

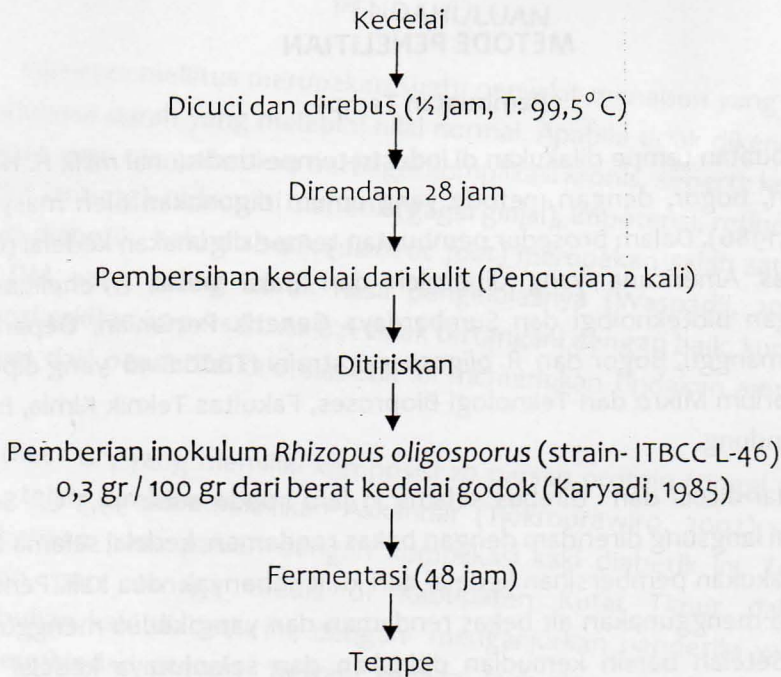
Pembuatan tempe dilakukan di industri tempe tradisional milik H. Herman Jl Gugah Sari, Bogor, dengan metode yang umum digunakan oleh masyarakat (Saono et al., 1986). Dalam prosedur pembuatan tempe digunakan kedelai (*Glycine max*) varietas Americana yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Departemen Pertanian, Cimanggu, Bogor dan *R. oligosporus* strain- ITBCC L-46 yang diperoleh dari Laboratorium Mikro dan Teknologi Bioproses, Fakultas Teknik Kimia, Institut Teknologi Bandung.

Kedelai dicuci dan direbus selama ½ jam pada suhu 99,5°C. Setelah masak kedelai langsung direndam dengan bekas rendaman kedelai selama 28 jam, kemudian dilakukan pembersihan kedelai dari kulit sebanyak dua kali. Pencucian yang pertama menggunakan air bekas rendaman dan yang kedua menggunakan air bersih. Setelah bersih kemudian ditiriskan dan selanjutnya kedelai diberi inokulum *Rhizopus oligosporus* (strain- ITBCC L-46) sebesar 0,3 gr / 100 gr dari berat kedelai yang telah digodok (Karyadi, 1985). Setelah kedelai dibungkus (*packing*) kemudian dilakukan fermentasi selama 48 jam (Gambar 14.1).

### Pembuatan Diabetes pada Hewan Percobaan (Tikus)

Tikus *Sprague Dawley* (jumlah 51 ekor, berusia 8 minggu, jantan, berat 200±10 gr, berasal dari BPOM-RI) diadaptasikan terlebih dahulu selama 10 hari di kandang metabolik dan diberikan diet standar (kasein) dengan komposisi sesuai dengan AIN-93M (Reeves et al., 1993).

Proses induksi STZ (*Streptozotocin*) dilakukan pada hari ke-0. Sebelum dilakukan induksi, tikus dikelompokkan secara acak, menjadi kelompok tikus diabetes (diinduksi dengan STZ / *Streptozotocin*) dan tikus non diabetes (diinduksi dengan PBS / *Phosphate Buffer Saline* ). Prosedur pembuatan diabetes; tikus diinjeksi secara *i.p.* (*intraperitoneal*) 40 mg/kg bb STZ, sedangkan tikus non diabetes diinjeksi secara *i.p.* menggunakan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,4. Dosis pemberian PBS tersebut disesuaikan dengan volume STZ yang diberikan pada kelompok diabetes. Selama periode pembuatan diabetes, semua tikus mendapatkan diet standar (kasein).



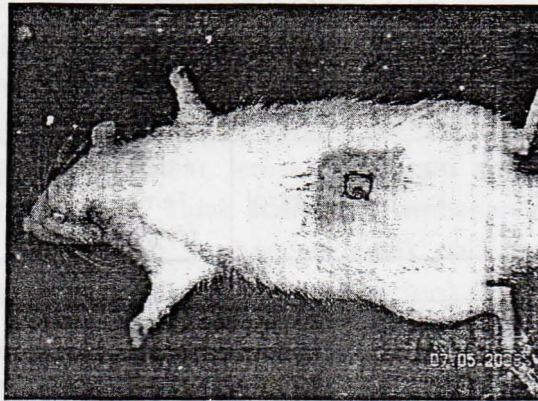
Gambar 14.1. Prosedur pembuatan tempe (Saono et al., 1986)

Pada hari ke-7 pasca induksi kadar gula darah diukur. Tikus dinyatakan diabetes apabila konsentrasi plasma glukosa yang berasal dari pembuluh darah vena ekor tikus menunjukkan kadar gula darah  $>250$  mg/dL (Gutierrez & Vargas, 2006). Pengukuran menggunakan strip glukosa-oksidasi (*OneTouch® Ultra TM, Lifescan*). Masing-masing kelompok tikus diabetes dan non diabetes, diacak dan dikelompokkan kembali menjadi kelompok perlakuan Kontrol, Kontrol+STZ, Tempe1, Tempe1+STZ, Tempe2, dan Tempe2+STZ. Jumlah ulangan untuk masing-masing kelompok adalah 3 ekor tikus dengan simpangan deviasi berdasarkan berat badan awal  $\pm 10$  gr.

### Pembuatan Luka pada Hewan Percobaan (Tikus)

Setelah tikus memenuhi kriteria diabetes dan non diabetes, dilakukan prosedur pembuatan luka. Tikus terlebih dahulu dianestesi secara *intraperitoneal* dengan ketamin (15 mg/100 gr bb tikus) dan xylazin (1 mg/100 gr bb tikus), kemudian kulit di daerah punggung dicukur dan dibersihkan. Kulit tikus pada daerah punggung dilukai dengan menggunakan skalpel dan gunting dengan

ukuran 0.8 x 0.8 cm. Pembuatan luka di daerah punggung mengacu pada beberapa referensi penelitian tentang efek kesembuhan pada luka diabetik, seperti Komesu *et al.*, (2004), Gutierrez & Vargas (2006), Qiu *et al.*, (2007), Cheng *et al.*, (2006), dan Arul *et al.*, (2006).



Gambar 14.2. Prosedur pembuatan luka

### Kesembuhan Luka

Efek kesembuhan luka, dinyatakan dengan persentil dari area luka (hari ke-14 pasca perlukaan atau hari ke-21 pasca induksi diabetes) dibandingkan dengan luka pada hari ke-0 (100 persen) (Modifikasi Toyokawa *et al.*, 2003) dan jumlah fibroblas dan kolagen yang diperoleh melalui histopatologi.

Pengamatan luka dilakukan selama 14 hari, dalam hal ini luka diukur setiap hari dengan cara menempelkan plastik transparan pada luka daerah luka digambar pada plastik tersebut. Setelah tergambar luas penyempitan luka diukur dengan mencocokkannya pada kertas *miliblock* (1 kotak = 1mm<sup>2</sup>). Luas yang diperoleh dinyatakan sebagai persen penyembuhan luka.

### Prosedur Pembuatan Diet

Tempe dikering-bekukan (*freeze drying*) selama 48 hingga 50 jam. Selanjutnya dianalisis kandungan gizinya yang meliputi protein, lemak, asam lemak, mineral, asam amino dan isoflavon. Hasil analisis tersebut diperlukan dalam rangka menentukan jumlah tempe yang akan digunakan sebagai diet percobaan hewan (tikus).

Selama perlakuan luka (14 hari), tikus mendapat diet masing-masing sesuai dengan kelompok perlakuan. Diet kasein diberikan pada kelompok Kontrol dan Kontrol+STZ, diet tempe 1 (jumlah tempe disesuaikan agar mengandung asam amino arginin dari tempe sebesar 1,4 persen) diberikan pada kelompok Tempe1 dan Tempe1+STZ, dan diet tempe 2 (jumlah tempe disesuaikan agar mengandung asam amino arginin dari tempe sebesar 1,6 persen) diberikan pada kelompok Tempe2 dan Tempe2+STZ.

Tabel 14.1. Komposisi diet berdasarkan AIN-93M (Reeves et al., 1993)

No.	Bahan	Kontrol	Tempe1 & Tempe1+STZ (Arginin 1,4 %)	Tempe1 & Tempe1+STZ (Arginin 1,6 %)
1	Tempe Freeze	-	28,81	33,43
2	Kasein	14,0	0,00	0,00
3	Minyak Jagung	6,0	0,00	0,00
4	Mineral-AIN 93M-MX <sup>1</sup>	3,5	2,71	2,58
5	Vitamin-AIN 93M-VX <sup>2</sup>	1,0	1,00	1,00
6	Selulosa (Alphacel Nutrive Bulk) <sup>3</sup>	5,0	5,00	5,00
7	Pati Jagung	43,67	35,65	31,16
8	Dyetrose <sup>4</sup> (dextrin cornstarch)	15,5	15,50	15,50
9	Sukrosa	10,9	10,90	10,90
10	L-Cystine <sup>5</sup>	0,18	0,18	0,18
11	Choline Bitartrate <sup>6</sup>	0,25	0,25	0,25
12	TBHQ <sup>7</sup>	0,0008	0,0008	0,0008
	Jumlah	100	100	100
	Energi (Kal)	371,35	372,00	377,27
	Protein	12,53	13,47	15,63
	Lemak	6,01	7,14	8,29

Ket: AIN-93M: American Institute of Nutrition, <sup>7</sup>TBHQ: Tert buthil hydroquinone, <sup>1,2,3</sup>(MP-Bio, OHIO-USA), <sup>4</sup>Dyetrose (Dyets, Bethlehem, PA, USA), <sup>5</sup>Merck, <sup>6</sup>Sigma Chemichal, kandungan gizi kasein dalam 100 gr sampel (%w/w): lemak: 0,04, protein: 89,50, karbohidrat: 0,20, asam amino arginin: 3,69, ileusin: 5,47, valin: 6,57, dan leusin: 9,08. kandungan gizi tempe dalam 100 gr sampel (%w/w): lemak: 24,80, protein: 46,77, karbohidrat: 20,99, asam amino arginin: 4,96, ileusin: 2,41, valin: 2,43, dan leusin: 3,59.

Dosis arginin tempe sebesar 1,4 persen, didasarkan studi literatur bahwa dosis tersebut dapat meningkatkan eNOS (endhotelial nitric oxide synthesis), iNOS (inducible nitric oxide synthase) dan arginase pada luka diabetik (Kohli et al., 2004,

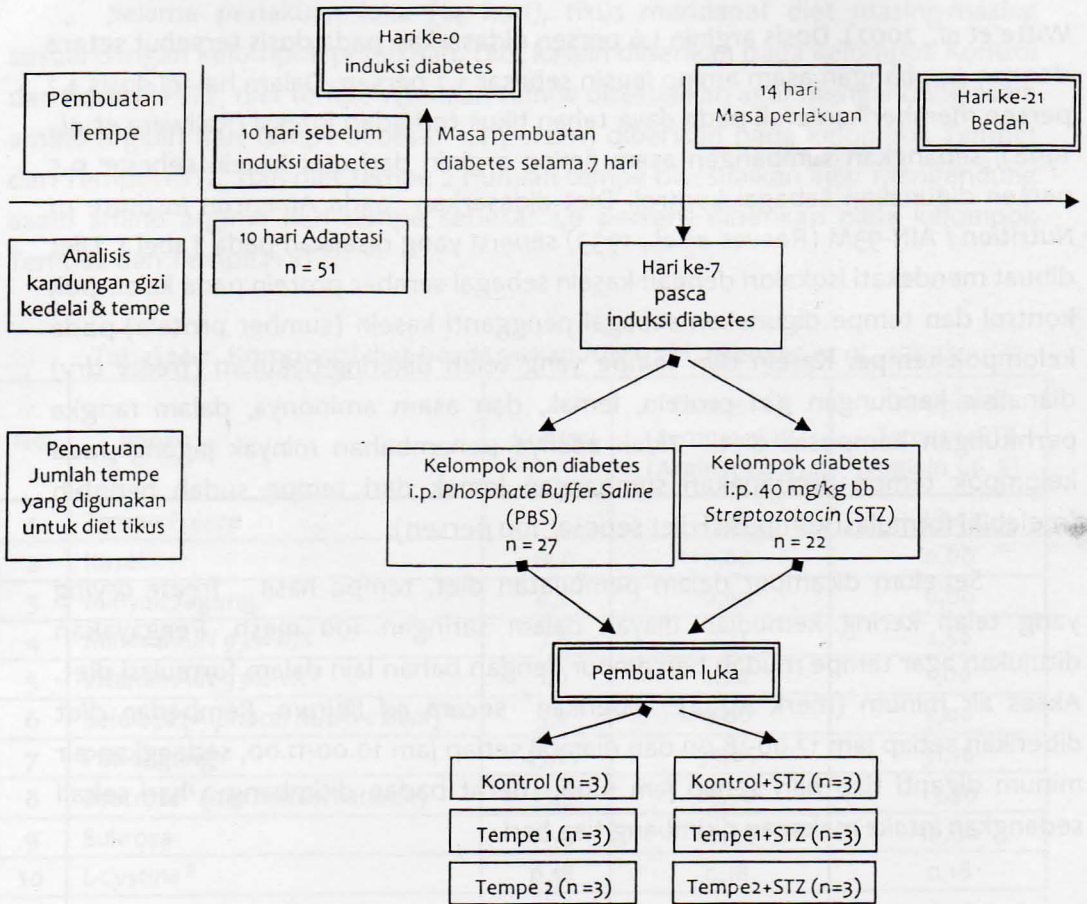
Witte et al., 2002). Dosis arginin 1,6 persen didasarkan pada dosis tersebut setara dengan sumbangan asam amino leusin sebesar 1,2 persen. Dalam hal ini dosis 1,2 persen memberikan efek pada daya tahan tikus terhadap infeksi (Kajiwaru et al., 1998), sedangkan sumbangan asam amino arginin dari diet kasein sebesar 0,5 persen digunakan sebagai kontrol. Diet didasarkan pada *American Institute of Nutrition / AIN-93M* (Reeves et al., 1993) seperti yang disajikan pada Tabel 1. Diet dibuat mendekati isokalori dengan kasein sebagai sumber protein pada kelompok kontrol dan tempe digunakan sebagai pengganti kasein (sumber protein) pada kelompok tempe. Kasein dan tempe yang telah dikering-bekukan (*freeze dry*) dianalisis kandungan gizi protein, lemak, dan asam aminonya, dalam rangka perhitungan komposisi diet. Tidak adanya penambahan minyak jagung pada kelompok tempe dikarenakan sumbangan lemak dari tempe sudah berlebih (melebihi formulasi komposisi diet sebesar 100 persen).

Sebelum dicampur dalam pembuatan diet, tempe hasil *freeze drying* yang telah kering kemudian diayak dalam saringan 100 mesh. Pengayakan ditujukan agar tempe mudah bercampur dengan bahan lain dalam formulasi diet. Akses air minum (merk Aqua) diberikan secara *ad libitum*. Pemberian diet diberikan setiap jam 17.00-18.00 dan diambil setiap jam 10.00-11.00, sedangkan air minum diganti tiap hari setiap jam 9.00. Berat badan ditimbang 2 hari sekali sedangkan *intake* makanan ditimbang tiap hari.

### Pengambilan Sampel dan Pelaksanaan Nekropsi

Pada hari ke-21 pasca induksi, tikus dianestesi dengan 15 mg ketamin-1 mg xylazin dalam 100 gr bb tikus kemudian dilakukan pengukuran gula darah secara langsung. Darah (sekitar 3 ml) diambil secara langsung dari jantung dan dimasukkan kedalam *conical tube* yang berisi 100  $\mu$ L heparin (6 g/L) dan didinginkan dalam es. Sampel darah disentrifuse pada 1800 x g selama 15 menit pada suhu 4°C untuk memperoleh serum darah, yang selanjutnya digunakan untuk analisis asam amino menggunakan metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Setelah tikus mati segera dilaksanakan nekropsi. Pankreas dan kulit diambil dan segera disimpan dalam larutan *Buffered Neutral Formalin* (BNF) 10 persen, yang selanjutnya diproses menjadi preparat histologi dengan pewarnaan *hematoxylin-eosin* (H&E) untuk mengetahui perkembangan luka, menghitung sel fibroblas dan serabut kolagen.





Gambar 14.3. Desain penelitian, dari tahap pembuatan tempe hingga pembedahan tikus

### Pengolahan dan Analisis Data

Semua data ditampilkan dalam bentuk rata-rata±standar deviasi. Data persen perubahan berat badan tikus diperoleh dengan rumus:

$$\text{Persen } \Delta \text{ BB} = \frac{\text{Berat badan akhir-berat awal}}{\text{Berat awal}} \times 100\%$$

Food Conversion Efficiency (FCE) diperoleh dengan rumus:

$$\text{FCE} = \frac{\text{berat badan akhir-berat awal}}{\text{Total Intake}} \times 100\%$$

Total intake makanan diperoleh dengan menjumlahkan intake makanan tikus setiap hari selama perlakuan luka (Solomon, 2008).

Persen kesembuhan luka diperoleh dengan rumus:

$$\text{Persen Kesembuhan Luka} = \frac{\text{Luas luka akhir-luka awal}}{\text{Luka awal}} \times 100\%$$

Data dianalisis dengan *General Linear Model (GLM)* dan perbedaan diantara nilai rata-rata dianalisis dengan uji Duncan. Data dari histopatologi dianalisis dengan uji nonparametric Kruskal-Walis. Pada semua uji, perbedaan secara signifikan dinyatakan dalam  $P < 0,05$ .

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Efek Streptozotocin terhadap Kadar Gula Darah Tikus

*Streptozotocin* atau STZ (*2-deoksi-2-(3-metil-(nitrosoureido)-D-glukopiranosā*) telah 30 tahun lebih digunakan untuk membuat tikus menjadi diabetes (Morgan *et al.*, 1994). Studi literatur tentang efek STZ menyatakan injeksi 24-100 mg/kg bb (M.-P. Lu *et al.*, 2007) dapat menimbulkan efek diabetogenik. Keadaan diabetes pada penelitian ini, terlihat pada tikus yang diinduksi 40 mg/kg bb STZ pada hari ke-7 pasca induksi (Tabel 14.2).

Tabel 14.2. Kadar gula darah tikus induksi STZ dan PBS pada hari ke-7 dan hari ke-21 pasca induksi

Kelompok	7 hari pasca induksi STZ (mg/dL)	21 hari pasca induksi STZ (mg/dL)
Kontrol	126,50 ± 31,81 <sup>c</sup>	143,35 ± 25,10 <sup>c</sup>
Kontrol+STZ	557,66 ± 64,03 <sup>a</sup>	489,33 ± 148,28 <sup>a</sup>
Tempe1	194,67 ± 35,44 <sup>bc</sup>	147,33 ± 41,63 <sup>c</sup>
Tempe1+STZ	281,50 ± 43,13 <sup>b</sup>	187,66 ± 46,30 <sup>cb</sup>
Tempe2	191,00 ± 43,84 <sup>cb</sup>	127,67 ± 8,96 <sup>c</sup>
Tempe2+STZ	496,50 ± 38,89 <sup>a</sup>	149,00 ± 46,67 <sup>c</sup>

Rata-rata dengan huruf sama dalam kolom tidak berbeda secara signifikan pada  $p < 0,001$

Efek STZ pada tikus yang diinduksi 40 mg/kgBB STZ memperlihatkan kadar gula darah > 281,50 ± 43.13 mg/dL, sedangkan yang diinduksi dengan PBS menunjukkan kadar gula darah < 194,67 ± 35,44 mg/dL.

## Efek Tempe terhadap Kadar Gula Darah Tikus

Diet tempe yang diberikan pada tikus induksi STZ secara signifikan ( $P < 0,001$ ) mempengaruhi penurunan gula darah pada tikus kelompok Tempe1+STZ dan Tempe2+STZ dibanding kelompok Kontrol+STZ (Tabel 14.2). Demikian juga pada kelompok Tempe1 dan Tempe2, memiliki kadar gula darah yang lebih rendah jika dibanding kadar gula darah awalnya. Hal ini bisa ditarik kesimpulan bahwa tempe secara signifikan memiliki efek hipoglikemik.

Efek penurunan gula darah tersebut dimungkinkan karena tempe merupakan sumber isoflavon. Komponen bioaktif isoflavon yang berupa genestein dan daidzein oleh beberapa peneliti telah dihubungkan dengan rendahnya resiko diabetes (Lu-MP et al., 2007).

Hasil analisis pendahuluan pada isoflavon tempe yang digunakan pada eksperimen ini, menunjukkan kandungan genestein dan daidzein dalam tempe berkisar 0,44 dan 1,5 mg/100 gr sampel (berat kering) meningkat setelah mengalami fermentasi. Dimana dalam kedelai sebelum difermentasi jumlah genestein 0,0011 dan daidzein 0,093 mg/100 gr sampel (berat kering).

Lu-MP et al. (2007) menyatakan pemberian diet tinggi isoflavon kedelai (genestein ekuivalen 0,222 gr/kg diet) secara signifikan meningkatkan serum insulin, menurunkan glukosa serum pada tikus diabetes sedang dan melindungi sisa-sisa sel beta pankreas dari efek toksik STZ. Penelitian Kwon et al., (2004) menyatakan bahwa isoflavon dalam kedelai memproteksi sel dari prainflamasi sitokin, kerusakan induksi lemak dan apoptosis. Isoflavon juga diduga dapat menstimuli daya tahan sel beta pankreas (Jhala et al., 2003) dan menurunkan gula darah dengan cara mengaktifkan reseptor PPAR (*peroxisome-proliferator activated receptor*), suatu reseptor inti yang berpartisipasi dalam pengaturan gula darah dan kerja insulin (Mezei, 2003).

Mekanisme peran isoflavon dalam efek hipoglikemik dapat diterangkan melalui penelitian J.-S. Lee (2006). Dalam hal ini pada pemberian diet genestein dan isolat protein kedelai masing-masing 0,06 gr/100 gr diet dan 20 gr/100 gr diet pada tikus diabetes yang diinduksi STZ, menunjukkan bahwa :

1. Adanya substansi insulinotropik didalam fraksi, yang mengindikasikan bahwa fungsi sel beta pulau Langerhans secara utuh memproduksi insulin atau melindungi sel beta yang masih berfungsi dari kerusakan lebih lanjut sehingga masih dapat memproduksi insulin.

2. Meningkatkan aktivitas enzim glukokinase dan menurunkan aktivitas enzim glukosa-6-fosfatase dalam hati, sehingga terjadi penurunan gula darah.

Baik pemberian diet genestein maupun isolat protein kedelai, secara signifikan telah meningkatkan aktivitas enzim glukokinase dan menurunkan aktivitas enzim glukosa-6-fosfatase, meskipun demikian isolat protein kedelai menjadi lebih potensial dibanding genestein dalam peranannya sebagai penurun gula darah. Hal ini diduga isolat protein kedelai mengandung komponen aktif lain yang dapat meningkatkan bioavailabilitas genestein. Begitu juga pada penelitian ini, bahwa tempe dimungkinkan memiliki komponen aktif lain selain isoflavon (seperti serat) yang memungkinkan memberikan efek hipoglikemik.

Hasil yang berbeda dalam efek glikemik tempe mungkin dapat diperoleh, mengingat jumlah isoflavon dalam tempe berbeda tergantung dari jenis varietas kedelai, preparasi pembuatan tempe (Coward *et al.*, 1993) dan jenis kapang yang digunakan (Wang & Murphy, 1998).

### Efek Tempe terhadap Intake makanan, Perubahan Berat Badan Tikus dan FCE (Food Conversion Efficiency)

Pada hari ke-21 pasca induksi STZ diperoleh data tentang Food Intake, Perubahan Berat Badan Tikus dan FCE (Food Conversion Efficiency). Hasil dari data tersebut menyatakan bahwa baik dalam keadaan diabetes maupun dalam keadaan tidak diabetes, pemberian tempe tidak mempengaruhi sumbangan energi. Hal tersebut diperlihatkan dengan nilai FCE antar kelompok perlakuan (Tempe1 vs Tempe1+STZ dan Tempe2 vs Tempe2+STZ) yang tidak berbeda nyata seperti terlihat pada Tabel 14.3.

Tabel 14.3. Efek tempe terhadap perubahan berat badan, food intake dan FER tikus

Kelompok	Perubahan berat badan tikus (gr)	Food Intake (gr)	FER (gr perubahan bb / gr food intake)
Kontrol	20,43 ± 1,57 <sup>ab</sup>	463,94 ± 15,96 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,004 <sup>a</sup>
Kontrol +STZ	18,04 ± 3,58 <sup>bc</sup>	440,74 ± 21,77 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,37 <sup>a</sup>
Tempe1	22,09 ± 1,50 <sup>ab</sup>	383,60 ± 17,69 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>a</sup>
Tempe1+STZ	24,82 ± 2,67 <sup>a</sup>	402,81 ± 5,78 <sup>b</sup>	0,14 ± 0,03 <sup>a</sup>
Tempe2	14,71 ± 0,13 <sup>c</sup>	379,63 ± 22,16 <sup>b</sup>	0,10 ± 0,002 <sup>a</sup>
Tempe2+STZ	14,43 ± 1,70 <sup>c</sup>	379,10 ± 26,28 <sup>c</sup>	0,13 ± 0,02 <sup>a</sup>

Rata-rata dengan huruf sama dalam kolom tidak berbeda secara signifikan pada  $p < 0,05$

Sifat tempe yang mudah dicerna berpengaruh terhadap tidak berbedanya masukan energi pada kedua kelompok tersebut (Hackler *et al.*, 1982). Daya cerna pada tempe lebih banyak dipengaruhi oleh fermentasi kapang terhadap kedelai (Wang, 1969).

Konsumsi tempe memberikan perubahan berat badan tikus yang bervariasi. Diet tempe pada kelompok Tempe1+STZ secara signifikan ( $p < 0,05$ ) memberikan perubahan berat badan yang lebih besar dibanding kelompok lainnya, meskipun tingkat konsumsi tikus kelompok kontrol (Kontrol dan Kontrol+STZ) secara signifikan lebih besar.

Perubahan terkecil terlihat pada kelompok yang mendapat diet tempe 2 (kelompok Tempe2 dan Tempe2+STZ) meskipun tidak berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok Kontrol+STZ. Perubahan berat badan tikus yang kecil diperlihatkan pada kelompok Tempe2 (Tempe2 dan Tempe2+STZ). Hasil ini diduga berkaitan dengan perbedaan komposisi proksimat diet antara kelompok Tempe1 (Tempe1 dan Tempe1+STZ) dan Tempe2 (Tempe2 dan Tempe2+STZ). Dimana pada kelompok Tempe2 (Tempe2 dan Tempe2+STZ) sumbangan energi yang berasal dari protein dan lemak bertambah sedangkan karbohidrat menurun.

Pada kelompok tempe1, komposisi diet menyumbang energi 372 kkal, protein 13,47 persen, karbohidrat 35,65 gr/100 gr diet, dan lemak bertambah 1,14 gr/100 gr diet dari kebutuhan standar (6 gr/100 gr diet). Pada kelompok tempe2, menyumbang energi 377,27 kkal, protein 15,63 persen, karbohidrat 31,16 gr/100 gr diet, dan lemak bertambah 2,29 gr/100 gr diet dari kebutuhannya (6 gr/100 gr diet), sedangkan kelompok kontrol menyumbang energi 371,59 kkal, protein 12,53 persen, karbohidrat 46,56 gr/100 gr diet, dan lemak 6 gr/100 gr diet.

*Intake* makanan terhadap tempe yang cenderung lebih kecil dibanding tikus yang mendapat kasein dan perubahan berat badan yang lebih besar pada tikus yang mendapat diet tempe dibanding kasein, juga dilaporkan oleh Wang *et al.*, (1969). Meskipun demikian *intake* makanan pada tempe yang direbus dengan beberapa variasi waktu perebusan tidak berbeda dengan tikus yang mendapat kasein, seperti yang dilaporkan oleh Hackler *et al.*, (1982).

*Food Conversion Efficiency* (FCE) adalah rasio antara pertambahan berat badan tikus selama masa percobaan dengan jumlah total diet yang dikonsumsi oleh tikus. Hasil dari FCE yang tidak menunjukkan perbedaan, mengindikasikan bahwa sumbangan energi yang berasal dari tempe tidak berbeda nyata dengan masukan energi yang berasal dari kasein terhadap perubahan berat badan tikus.

Hal ini diduga karena tempe merupakan sumber protein kualitas tinggi (Zamora, 1979) yang dibuktikan pada nilai PER (*Protein Efficiency Ratio*) tempe pasca mengalami fermentasi sebesar 2,79 yang seimbang dengan nilai PER kasein yang sebesar 2,81 dan lebih besar jika masih dalam bentuk kedelai dengan nilai PER 2,41 (Wang, 1969).

### Efek Tempe terhadap Serum Asam Amino Arginin Tikus

Asam amino arginin tempe merupakan satu-satunya asam amino yang berjumlah dua kali lipat setelah masa fermentasi (tempe) dibanding asam amino pada kedelai mentah (Ghozali, 2008) yang dimungkinkan memiliki peran dalam proses penyembuhan luka.

Pada eksperimen ini efek pemberian tempe terhadap kadar serum asam amino arginin tikus tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P > 0,05$ ) meskipun jumlah intake protein berbeda-beda (Tabel 14.4). Hasil yang hampir sama pada serum tikus kelompok tempe (diabetes dan non diabetes) menandakan pemberian diet tempe tersebut telah mencukupi kebutuhan akan asam amino arginin.

Tabel 14.4. Efek tempe terhadap serum asam amino arginin tikus

Kelompok	Serum asam amino arginin (% w/w)
Kontrol	$0.44 \pm 0.23^a$
Kontrol +STZ	$0.40 \pm 0.10^a$
Tempe1	$0.32 \pm 0.05^a$
Tempe1+STZ	$0.35 \pm 0.01^a$
Tempe2	$0.34 \pm 0.01^a$
Tempe2+STZ	$0.32 \pm 0.03^a$

Huruf sama dalam kolom tidak berbeda secara signifikan pada  $p < 0,05$

### Efek Tempe terhadap Kesembuhan Luka Tikus yang Diinduksi STZ

Mekanisme disfungsi penyembuhan luka pada keadaan diabetes hingga kini belum diketahui. Penurunan proliferasi (perkembangbiakan) sel dan rendahnya pembentukan jaringan sel (Childress & Stechmiller, 2002), rendahnya jumlah kolagen dan penurunan sintesis NO (nitrat oksida) dalam luka (Schaffer et al., 1997), dihubungkan dengan kegagalan penyembuhan pada luka diabetik ini.

Penurunan respon inflamasi (radang) pada fase inflamasi (< 6 hari), yang ditandai dengan penurunan infiltrasi atau migrasi sel (makrofag) kedalam luka, diperkirakan sebagai tahap awal dari kegagalan proses penyembuhan luka diabetik ini.

Keberadaan makrofag sangat diperlukan untuk mengaktifkan enzim INOS (*inducible nitric oxide synthetase*) yang diperlukan dalam pembuatan NO dari L-arginin. NO tersebut kemudian diperlukan dalam rangka melawan infeksi bakteri (Childress & Stechmiller, 2002). Makrofag juga diperlukan untuk mengaktifkan enzim arginase dalam membuat ornithin yang selanjutnya diubah menjadi asam amino polyamin. Asam amino tersebut berfungsi dalam proliferasi sel dan perbaikan jaringan (Lincoln et al., 1997, Wu & Moris, 1998).

Asam amino arginin sebagai substrat pembentukan nitrat oksida (NO), dalam dekade terakhir ini, diasosiasikan dengan proses penyembuhan luka khususnya pada luka diabetik, melalui proliferasi makropag, fibroblas dan kolagen. Peranannya yang besar dalam proses penyembuhan luka tersebut, menjadi bahan kajian penulis untuk meneliti apakah pemberian asam amino arginin yang berasal dari tempe memiliki efek terhadap kesembuhan luka diabetik ini.

Fase penyembuhan luka meliputi fase inflamasi dimana jumlah neutropil dan fibronektin mencapai puncak pada hari ke-2 pasca luka, jumlah makrofag mencapai puncak pada hari ke-3 pasca luka. Fase kedua adalah fase proliferasi dimana jumlah fibroblas dan limfosit mencapai puncak pada hari ke-5 pasca luka. Jumlahnya semakin menurun setelah hari ke-8. Fase ketiga adalah fase maturasi dimana jumlah kolagen dan *wound breaking strength* mulai meningkat pada hari ke-10 pasca luka. Pada hari ke-14 pasca perlukaan (pembedahan) dalam penelitian ini masuk dalam fase maturasi dalam proses kesembuhan luka. yang ditandai dengan terjadinya peningkatan jumlah kolagen dan penurunan jumlah fibroblas.

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa apabila dilihat secara makro, persen penyembuhan luka lebih terlihat pada kelompok Kontrol+STZ, tetapi secara histopatologi, kolagen yang terbentuk masih halus dan jumlah fibroblas terlihat tinggi. Hal ini dikarenakan penyembuhan luka merupakan suatu mekanisme yang kompleks, yang melibatkan beberapa parameter seperti jumlah fibroblas dan kolagen sehingga penentuan kesembuhan secara makro tidak dapat dijadikan sebagai patokan. Pada hari ke-14 pasca perlukaan (Fase maturasi) kolagen yang sudah terlihat kasar, ditunjukkan oleh kelompok Tempe1+STZ

(arginin 1,4 persen) pada perlakuan diabetes dan kelompok Tempe2 (arginin 1,6 persen) pada perlakuan non diabetes ( $P>0.05$ ) seperti terlihat pada Tabel 14.5.

Tabel 14.5. Persen kesembuhan luka, jumlah fibroblas dan pembentukan kolagen pada tikus

Group	% Kesembuhan luka	Fibroblas	Kolagen
Kontrol	94.27 ± 4.77 <sup>a</sup>	1822,67 <sup>a</sup>	halus
Kontrol +STZ	98.96 ± 1.80 <sup>a</sup>	1236,00 <sup>a</sup>	halus
Tempe1	98.44 ± 1.56 <sup>a</sup>	1364,00 <sup>a</sup>	halus
Tempe1+STZ	98.43 ± 2.70 <sup>a</sup>	1072,00 <sup>a</sup>	halus dan kasar
Tempe2	97.92 ± 1.80 <sup>a</sup>	625,00 <sup>a</sup>	halus dan kasar
Tempe2+STZ	78.12 ± 5.40 <sup>b</sup>	1478,00 <sup>a</sup>	halus

Huruf sama dalam kolom tidak berbeda secara signifikan pada  $p<0,05$

Apabila dilihat secara makro, persen penyembuhan luka lebih tampak pada kelompok Kontrol+STZ seperti terlihat pada Gambar 14.4.

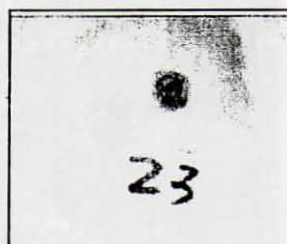
#### A. Kelompok Kontrol



Tanggal 10 Mei 2008



Tanggal 15 Mei 2008

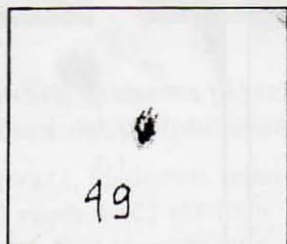


Tanggal 18 Mei 2008

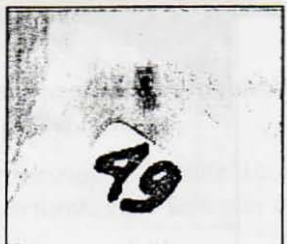
#### B. Kelompok Kontrol+STZ



Tanggal 10 Mei 2008



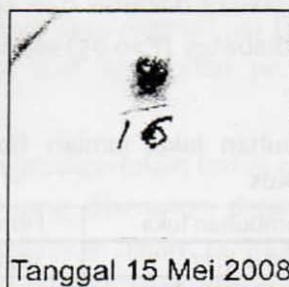
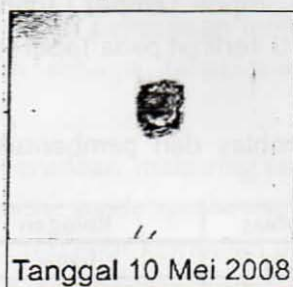
Tanggal 15 Mei 2008



Tanggal 18 Mei 2008



## C. Kelompok Tempe1



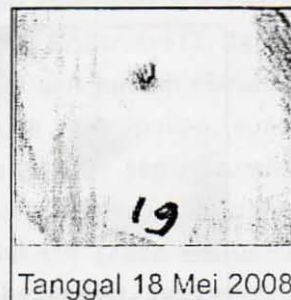
## D. Kelompok Tempe1+STZ



## E. Kelompok Tempe2

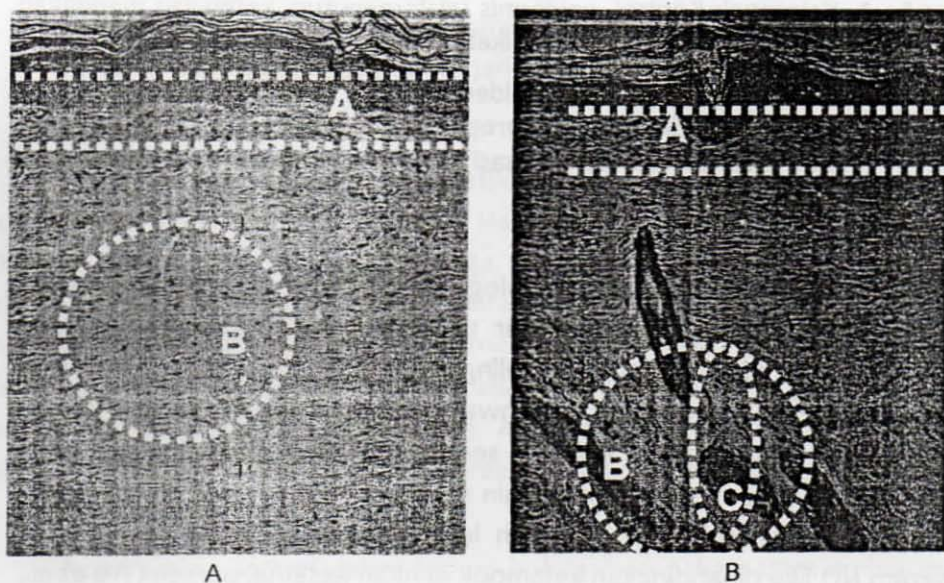


## F. Kelompok Tempe2+STZ



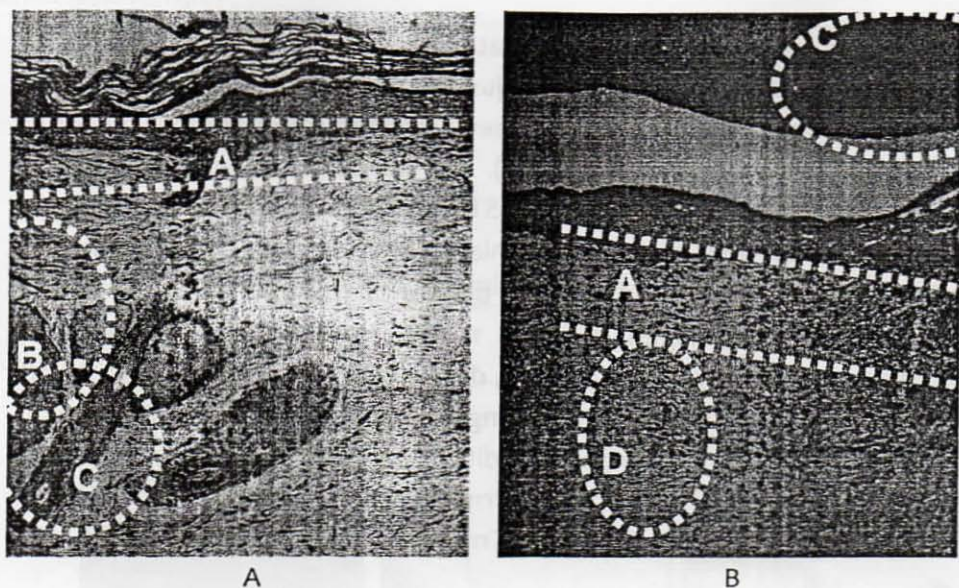
Gambar 14.4. Proses kesembuhan luka secara makro  
(Foto diambil dalam jarak dan pembesaran yang berbeda-beda)

Meskipun demikian secara histopatologi, pada kelompok Kontrol+STZ kolagen yang terbentuk masih halus dan jumlah fibroblas masih terlihat tinggi, pertumbuhan kolagen belum diikuti oleh pertumbuhan folikel rambut meskipun epidermis telah menutup (Gambar 14.5A). Hal ini berbeda dengan kemajuan kesembuhan luka pada kelompok Tempe1+STZ yang ditunjukkan dengan kolagen sudah terlihat kasar, diikuti dengan jumlah fibroblas yang mulai menurun, epidermis yang telah menutup, dan diikuti dengan pertumbuhan folikel rambut diantara pertumbuhan kolagen (Gambar 14.5B). Hasil kontras terlihat pada kelompok Tempe2+STZ (arginin 1,6 persen), dalam hal ini kesembuhan luka terjadi sangat lambat, berbeda sangat nyata dengan kelompok Tempe1+STZ. Proses penyembuhan luka pada kelompok ini ditunjukkan dengan epidermis sudah terbentuk mendekati utuh, tetapi luka masih ditutup oleh keropeng, dan pertumbuhan kolagen sudah terjadi disertai neovaskularisasi (Gambar 14.6B).



Gambar 14.5. A. Kelompok Kontrol+STZ, epidermis (A) telah menutup, pertumbuhan kolagen (B) belum diikuti oleh pertumbuhan folikel rambut.

B. Kelompok Tempe1+STZ, Epidermis telah menutup (A), mulai terjadi pertumbuhan folikel rambut (C) diantara pertumbuhan kolagen (B). (Pewarnaan HE, pembesaran obyektif 20 x).



Gambar 14.6 A. Kelompok Kontrol, epidermis telah menutup, ketebalan mendekati sempurna (A), kolagen (B), folikel rambut sudah mulai tumbuh (C).

B. Kelompok Tempe2+STZ, epidermis sudah terbentuk mendekati utuh (A), luka masih ditutup oleh keropeng (C). pertumbuhan kolagen sudah terjadi disertai neovaskularisasi (D). (Pewarnaan HE, pembesaran obyektif 20 x).

Dari tabel dan gambar histopatologi diatas dapat disimpulkan bahwa peran asam amino arginin tempe sebesar 1,4 persen dalam keadaan diabetes menunjukkan tingkat kesembuhan yang paling cepat dibanding kelompok lainnya. Beberapa studi literatur melaporkan bahwa pemberian arginin dosis 1 persen berdampak pada peningkatan sintesis serum NO jika dibandingkan pada kelompok yang mendapat suplemen arginin 0 persen atau 0,3 persen. Demikian juga pemberian kasein sebesar 20 persen lebih berdampak pada peningkatan sintesis serum NO jika dibandingkan kelompok dengan kasein 5 persen (Wu *et al.*, 1999). Dosis arginin 1,4 persen, dapat meningkatkan eNOS, iNOS dan arginase pada luka diabetik (Kohli *et al.*, 2004, Witte *et al.*, 2002).

Mekanisme aksi yang dapat diterangkan dari pengaruh arginin dalam penyembuhan luka adalah (Abumrad dan Barbul, 2003) :

1. Suplementasi arginin sangat diperlukan sebagai substrat dalam rangka sintesa kolagen pada daerah luka, meskipun suplementasi bebas arginin

dapat membentuk kolagen tapi berjumlah tidak kurang dari 5 persen, dengan jalur :

Subtrat arginin → ornithin → asam glutamat semialdehid → prolin

2. Arginin menginduksi sintesa kolagen melalui mekanisme *pituitary secretagogue*, dalam hal ini suplementasi arginin diikuti dengan hormon tumbuh yang diidentikan dengan peningkatan *wound breaking strength* dan deposit kolagen.
3. Arginin memiliki efek unik pada fungsi sel T, dengan cara menstimulasi respon sel T dan menurunkan efek penghambatan luka, Limfosit T sangat esensial pada kejadian menurunnya *wound breaking strength* dan fasilitator dalam perbaikan luka normal pada setiap fase penyembuhan luka.
4. Arginin sebagai subtrat yang unik bagi NO, dalam hal ini keberadaan NO dalam luka sangat penting, karena berperan dalam induksi sintesis kolagen dan vital bagi perbaikan jaringan (Scaffer et al., 1996).

Adanya peran NO tersebut dibuktikan pada cairan luka dan kultur sel luka tikus diabetes yang telah diinduksi STZ. Hasilnya telah terjadi penurunan sintesis NO pada cairan luka tersebut. NO juga ditemukan pada pasien dengan kaki diabetik yang ditunjukkan dengan keberadaan enzim INOS (*inducible nitrogen oxide synthetase*) dan arginase yang meningkat secara signifikan dibanding kelompok kontrol. INOS dan arginase adalah enzim yang mengubah L-arginin menjadi NO dan ornithin (Jude, 2000). Asam amino polyamin yang dibentuk melalui ornithin, berfungsi dalam proliferasi sel dan perbaikan jaringan (Lincoln et al., 1997, Wu & Moris, 1998).

Asam amino arginin dalam tempe bukan merupakan asam amino murni seperti yang dilaporkan pada hasil penelitian diatas. Dalam arti pemenuhan dosis asam amino arginin sebesar 1,6 persen yang harus disumbang dari tempe, seperti pada kelompok Tempe2+STZ, berdampak pada penurunan karbohidrat dan penambahan jumlah lemak yang disumbang oleh tempe. Pada kelompok tempe 2 komposisi diet menyumbang karbohidrat 31,16 gr/100 gr diet, dan lemak bertambah 2,29 gr/100 gr diet dari kebutuhan standarnya, sedangkan kelompok kontrol menyumbang karbohidrat 46,56 gr/100 gr diet, dan lemak 6 gr/100 gr diet.

Mekanisme tersebut diduga berpengaruh pada proses kesembuhan luka yang lama pada kelompok Tempe2+STZ. Dalam keadaan hiperglikemia tingginya lemak dalam diet berpengaruh pada disfungsi metabolisme lemak yang berujung pada pembentukan benda keton yang mengakibatkan terjadinya ketodiabetik. Pendugaan ini didasarkan atas tingkat kesembuhan luka pada kelompok Tempe2 yang secara signifikan ( $P < 0,001$ ) berbeda nyata dengan kelompok Tempe2+STZ. Dalam hal ini kelompok Tempe2 (non diabetes) sama-sama diberikan diet asam amino arginin tempe sebesar 1,6 persen, sehingga dapat disimpulkan bahwa arginin dalam tempe bukan satu-satunya faktor yang terkait dalam proses kesembuhan luka.

Meskipun tidak ada perbedaan yang signifikan antara kesembuhan luka diabetik pada kelompok Kontrol+STZ dengan kelompok Tempe1+STZ, tetapi secara jangka panjang pemberian diet tempe lebih menguntungkan. Hal ini dikarenakan pemberian diet tempe juga memiliki efek hipoglikemia jika dibanding pemberian diet kasein.

Dalam aplikasi pada pasien dengan kaki diabetik, dosis anjuran sebesar 17 hingga 30 gr/hari (Barbul *et al.*, 2003), tidak mungkin akan terpenuhi apabila arginin tersebut berasal dari tempe, karena dosis arginin 17 gr/hari akan didapatkan dari tempe yang berjumlah sekitar 700 gr tempe berat basah/hari. Meskipun demikian, pengalaman pemberian tempe sekitar 150 gr/hari (6 potong ukuran rumah tangga) pada pasien kaki diabetes di rumah sakit memberikan keuntungan yang positif dalam penyembuhan luka pada pasien ini.

Efek hipoglikemik yang diberikan tempe diduga turut memberikan andil dalam proses kesembuhan luka. Mekanisme yang mungkin dapat diterangkan adalah kadar gula darah yang terkontrol memberikan substrat yang tidak menguntungkan bagi bakteri anaerob (*Clostridium perfringens*) yang 80 persen tumbuh pada luka pasien kaki diabetik ini (Misnadiarly, 2001).

Bakteri tersebut, adalah penghasil nanah dan bau busuk. Terkontrolnya gula darah berarti mengurangi substrat bagi bakteri untuk membuat infeksi pada luka, sehingga kesembuhan luka akan tercapai, seperti hasil dari pengalaman yang menyimpulkan bahwa pemberian tempe pada pasien dengan kaki diabetik, mengurangi keluarnya nanah dan bau busuk.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Kami berterima kasih kepada Dr Tan Chuan Cheng & Dr. Ir Endang S Sunaryo, MSc. atas bantuan pendanaan dalam penelitian ini, Drh. Adi Winarto, PhD.(Dosen Fakultas Kedokteran Hewan-IPB), Drh. I G N Sudisma, MSi., (Dosen Fakultas Kedokteran Hewan – Universitas Udayana Bali Bpk Mashudi (Teknisi Laboratorium Gizi Masyarakat-IPB) atas bantuan dalam aspek teknis penelitian ini..

## DAFTAR PUSTAKA

- Abumrad, Najj.N & Andrian Barbul. 2003. The Use of Arginin in Clinical Practice; Metabolic and Therapeutic aspects of Amino Acid in Clinical Nutrition (Luc A. Cynober ed.). CRC. New York.
- ADA (American Diabetes Association). 1999. Consensus development conference on diabetic foot wound care. *Diabetes Care*, 22(8): 1354-1360.
- ADA (American Diabetes Association). 2007. Clinical practice recommendations 2007. *Diabetes Care*, 30:S4.
- Albina, J.E., Mills, C.D., Barbul A. 1984. Arginine metabolism in wounds. *Am. J. Phys.*, 254: E459-E467.
- Arul, Vadivel., Reena Kartha & Rajadas Jayakumar. 2007. A therapeutic approach for diabetic wound healing using biotinylated GHK in corporated collagen matrices. *Life Sciences*, 80: 275-284.
- Barbul, A., Lazarou, S., Efron, D.T., Wasserkrug, H.L., & Efron G. 1990. Arginine enhances wound healing in humans. *Surgery*, 108: 331-337.
- Black, Eva., Jette V.P., Lars N. J., Soren M. M., Magnus S.A., Per E. H., Hans Perrild & Fin Gottrup. 2003. Decrease of collagen deposition in wound repair in type 1 diabetes independent of glycemc control. *Arch. Surg.*, 138: 34-40.
- Boulton, Connor H & Cavanagh P.R. 2000. *The Foot in Diabetes* (3<sup>rd</sup> ed.). Chicestrer, U.K., John Wiley & Sons.
- Buttler, M.F.S., B.L. Langkamp-Henken, K.A. Herrlinger-Garcia, A.E. Klash, M.E. Szczepanik, Jr.C. Nieves, R.J. Cottey, & B.S. Bender 2005. Arginine supplementation enhances mitogen-induced splenocyte proliferation but does not affect in vivo indicators of antigen-specific immunity in mice. *Journal of Nutrition*: 1146-1149.

- Cheng, Biao., Hong-Wei Liu , Xiao-Bing Fu, Tong-Zhu Sun, Zhi-Yong S. 2007. Recombinant human platelet-derived growth factor enhanced dermal wound healing by a pathway involving ERK and c-fos in diabetic rats. *Journal of Dermatological Science*, 45: 193—201.
- Coward, L., Barnes, N.C., Setchell, K.D.R., dan Barnes, S. 1993. Genistein, daidzein, and their  $\beta$ -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J.Agric. Food Chem.*, 41: 1961-1967.
- Duffy, Peter H., Sherry M. Lewis, Martha A. Mayhugh, Andy McCracken, Brett T.Thorn, Philip G. Reeves, Shirley A. Blakely, Daniel A. Casciano & Ritchie J. Feuers. 2002. Effect of the AIN-93M purified diet and dietary restriction on survival in sprague-dawley rats: implications for chronic studies. *Journal of Nutrition*, 132:101-107.
- Eizirik, D.L., Carla M. Germano and Renato H. Migliorini. 1988. Dietetic supplementation with branched chain amino acids attenuates the severity of streptozotocin-induced diabetes in rats. *Acta diabetol. Lat.*: 25, 117.
- Elsner, M., B. Guldbakke, M Tiedge, R Munday, & S. Lenzen. 2000. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozocin. *Diabetologia*, 43 : 1528-1533.
- Ghozali, D.S. 2008. Pengaruh Tempe terhadap Kesembuhan Luka pada Tikus Diabetes yang Diinduksi Streptozotocin (STZ). Skripsi yang tidak dipublikasikan. Departemen Gizi masyarakat dan Sumberdaya Keluarga, Fakultas Pertanian IPB.
- Gutierrez, R.M. Perez & R. Vargas S. 2006. Evaluation of the wound healing properties of *Acalyphalanguana* in diabetic rats. *Fitoterapia*, 77: 286-289.
- Hackler, L.R., K. H. Steinkraus, J. P. Van Buren & D. B. Hand. 1964. Studies on the utilization of tempeh protein by weanling rats. *Journal of Nutrition*, 8: 452-456.
- J-S, Lee. 2006. Effects of soy protein and genistein on blood glucose, antioxidant enzyme activities, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*, 79: 1578-1584.
- Jhala U.S., Canettieri G., Sreaton R.A., Kulkarni R.N., Krajewski S. , Reed J.2003. CAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediate induction of IRS2. *Genes*, 17: 1575.

- Kajiwara, Kenta., Masataka O, Tetsuo K., Nobuko H., Toshio M., Masahiko K., Hiroo O., Yasutoshi M., and Hisataka M. 1998. Oral supplementation with branched-chain amino acids improves survival rate of rats with carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis. *Digestive, Disease and Science*, 43(7): 1572-1579.
- Kohli, Ripla., Cynthia J. Meininger, Tony E. Haynes, Wene Y., Jon T. Self, and G. Wu. 2004. Dietary l-arginine supplementation enhances endothelial nitric oxide synthesis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Nutrition*, 134: 600-608.
- Komesu, Marilena C., Marcelo B.T., Kemli R. Buttros & Cristiano N. 2004. Effects of acute diabetes on rat cutaneous wound healing. *Pathophysiology*, 11: 63-67.
- Kwon G., Pappan K.L., Marshall C.A., Schaffer J.E., Mc Daniel M.L. 2004. CAMP dose-dependently prevents palmitate-induced apoptosis by both protein kinase A- and CAMP - guanine nucleotide exchange factor-dependent pathways in beta-cells. *J. Biol. Chem.*, 279: 8938e45.
- Lavery L.A., Armstrong D.G., & Harkless L.B. 1996. Classification of diabetic wounds. *J. Foot Ankle Surg.*, 35: 528-531.
- Mezei, O., W.J. Banz, R.W. Steger, M.R. Peluso, T.A. Winters, & N. Shay. 2003. Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effect through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. *Journal of Nutrition*, 133, 1238- 1243.
- M-P, Lu., Rui Wang, X. Song, X. Wang, Qing H. and M.L. Wu. 2007. Modulation of methylglyoxal and glutathione by soybean isoflavones in mild streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Nutr.*:1-7.
- Misnadiarly. 2001. Permasalahan Kaki Diabetes dan Upaya Penanggulangannya. [www.tempo.co.id/medika/arsip/062001/hor-1.htm](http://www.tempo.co.id/medika/arsip/062001/hor-1.htm).
- Mori, M & T. Gotoh. 2004. Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection. *Journal of Nutrition*, 134: 2820-2825.
- Morgan, Noel G., Hazel C. Cable, Nicole R. Newcombe & Gwyn T. Williams. 1994. Treatment of cultured pancreatic B-cells with streptozotocin induces cell death by apoptosis. *Bioscience Reports*, 14 (5): 243-250.



- Murata, K., Ikehata, H., dan Miyamoto, T. 1967. Studies on the nutritional value of tempeh. *J. Food Sci.*, 32: 580.
- O'Brien B.A., Harmon B.V., Cameron D.P & Allan D.J. 1996. Beta-cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin model. *J. Pathol.*, 178: 176-181.
- Philippe J., Missotten M. 1990. Functional characterization of a CAMP-responsive element of the rat insulin I gene. *J. Biol. Chem.*, 265: 14659.
- Qiu, Zeyu., A-Hon Kwon, & Yasuo K. 2007. Effects of plasma fibronectin on the healing of full-thickness skin wounds in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Surgical Research*, 138: 64-70.
- Reeves, P.G., Forrest H. Nielsen, and George C. Fahey, Jr. 1993. AIN-93 Purified diets for laboratory Rodents: final report of the American institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet, Committee Report. *Journal of Nutrition*, 123: 1939-1951.
- Saono, S., Hull, R.R. dan Dhamcharee, B. 1986. A Concise Handbook of Indigenous Fermented Foods in The Asia Countries. In *The Complete Handbook of Tempe, J. Agranoff. (Ed.)*, pp.14. History of The Development of Tempe, American Soybean Association.
- Sutjahjo, A. 1994. Peranan Neuropati Diabetik pada Kaki Diabetes. Simposium Nasional Diabetes & Lipid. RSUD Dr. Soetomo-FK Unair. Surabaya
- Tjokropawiro, A. 2002. Diabetik Neuropati: Dari Basik Ke Klinik. RSUD Dr. Soetomo- FK Unair. Surabaya.
- Wagner FW. 1981. The dysvascular foot: a system of diagnosis and treatment. *Foot Ankle*, 2: 64-122.
- Wang, W., S. Lin, Y. Xiao, Y. Huang, Yi Tan, Lu Cai, & X. Li. 2008. Acceleration of diabetic wound healing with chitosan-cross linked collagen sponge containing recombinant human acidic fibroblast growth factor in healing-impaired STZ diabetic rats. *Life Sciences*, 82: 190-204.
- Wang, H.L., Ruttle, D.I., dan Hesseltine, C.W. 1969. Protein quality of wheat and soybeans after *Rhizopus oligosporus* fermentation. *Journal of Nutrition*, 96: 109-114.

- Waspadji, S. 2000. Telaah Mengenai Hubungan Faktor Metabolik dan Respons Imun pada Pasien Diabetes Mellitus. (Disertasi Doktor, UI, Jakarta, 2000), Harian Kompas, 29 Januari.
- Williams, J.Z, Abumrad, N. & Barbul, A. 2002. Effect of specialized amino acid mixture on human collagen deposition. *Ann. Surg.*, 236: 369-375
- Wirahadikusumah M. 1985. *Biokimia: Metabolisme Energi, Karbohidrat dan Lipid*, ITB Bandung.
- Witte, Maria B., Frank J. Thornton, Udaya Tantry & Adrian Barbul. 2002. L-arginine supplementation enhances diabetic wound healing: involvement of the nitric oxide synthase and arginase pathways. *Metabolism*, 51(10): 1269-1273