

**PENGARUH EKSTRAK DAUN SIRSAK (*Annona muricata*L.) TERHADAP SOD DAN
HISTOLOGI HEPAR TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI ALOKSAN
ABSTRAK**

Rarangsari, Novi Endah. 2015. **Pengaruh ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap SOD dan histologi hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi aloksan.** Skripsi Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing Biologi:Kholifah Holil, M.Si;Pembimbing Agama:Umairatus Syarifah, MA.

Kata kunci: Daun sirsak (*Annona muricata* L.), diabetes mellitus, aloksan, tikus

Sirsak (*Annona muricata* L.) merupakan tanaman tropis yang seluruh bagian tanamannya dapat digunakan sebagai obat alternatif berbagai macam penyakit salah satunya sebagai antidiabetes, karena tanaman ini mengandung senyawa aktif yaitu flavonoid sebagai antihipoglikemik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap SOD, berat badan dan histologi hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi aloksan.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan 3 ulangan. Beberapa perlakuan tersebut adalah tikus diinduksi aloksan 120 mg/kgBB yang diikuti dengan pemberian ekstrak daun sirsak dosis 0mg/KgBB(K+), 50mg/KgBB (P1), 100mg/KgBB (P2) dan 150mg/KgBB (P3). Hewan coba yang digunakan adalah tikus jantan putih galur wistar, berumur 2 bulan dengan berat badan 200 gram. Parameter yang diamati adalah kadar SOD, histologi luas vena sentralis, sinusoid dan sel normal dan abnormal hepatosit hepar tikus. Data kadar SOD, luas venasentralis dan jumlah sel hepatosit yang diperoleh dianalisis dengan ANAVA satu arah. Apabila terdapat perbedaan nyata dilanjutkan dengan uji tuncan 5%.

Aktivitas antidiabetes ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) pada tikus yang diinduksi aloksan tidak mempengaruhi kadar SOD hepar, histologi luas vena sentralis, sinusoid dan jumlah sel normal dan abnormal hepatosit hepar tikus. Dosis ekstrak daun sirsak yang optimal dalam mempengaruhi luas vena sentralis adalah 150mg/KgBB, sedangkan pada jumlah sel hepatosit adalah 150mg/KgBB.

PENDAHULUAN

Kesehatan adalah keadaan sejahtera dari badan, jiwa, dan sosial yang memungkinkan setiap orang hidup produktif secara sosial, ekonomis dan merupakan salah satu nikmat yang diberikan oleh Allah SWT kepada manusia. Namun, manusia sering lalai dan tidak memperhatikan kesehatannya.

Ada berbagai cara untuk menjaga kesehatan, salah satunya dengan memperhatikan keseimbangan tubuh (homeostasis). Campbell (2004), menyatakan bahwa homeostasis adalah kondisi fisiologis yang seimbang, dimana semua sistem tubuh bekerja dan berinteraksi

dalam cara yang tepat untuk memenuhi semua kebutuhan tubuh.

Pemenuhan kebutuhan tubuh dapat dilakukan dengan makan yang seimbang antara yang dikonsumsi dan yang digunakan oleh tubuh, istirahat dan olahraga yang teratur. Makanan yang bergizi diperlukan oleh tubuh, seperti nasi, ikan, sayur, dan buah segar. Dengan mengonsumsi nasi kebutuhan karbohidrat akan terpenuhi sedangkan ikan, sayur, dan buah segar dapat bermanfaat untuk kebutuhan lemak, vitamin, dan protein yang diperlukan oleh tubuh. Namun, mengonsumsi makanan yang bergizi tersebut di atas harus disesuaikan dengan kebutuhan tubuh dan tidak beresiko menimbulkan penyakit. Makanan yang

mengandung karbohidrat tinggi, jika dikonsumsi berlebihan maka dapat meningkatkan gula darah di dalam tubuh dan beresiko menimbulkan penyakit diabetes mellitus (DM).

Penyakit diabetes mellitus (DM) adalah penyakit yang ditimbulkan sebagai akibat kelainan metabolisme karbohidrat, dimana glukosa darah tidak dapat digunakan dengan baik, sehingga menyebabkan hiperglikemia. Diabetes mellitus tipe I disebabkan kerusakan sel beta pankreas sehingga tubuh kekurangan insulin atau tubuh sedikit menghasilkan insulin. Penderita DM mempunyai resiko tinggi dapat menimbulkan penyakit (komplikasi), seperti gagal ginjal, stroke, kebutaan, dan penyakit arteri koronaria (Widijanti, 2005).

Kondisi tersebut di atas dimungkinkan karena DM dapat memicu terjadinya stres oksidatif dengan cara menghasilkan ROS melalui autooksidasi glukosa. Proses autooksidasi glukosa dikatalisis oleh senyawa logam seperti besi dan seng. Hasil katalisis tersebut adalah senyawa oksigen reaktif yang memiliki gugus fungsional dengan atom oksigen yang bermuatan elektron lebih. Salah satu antioksidan di dalam tubuh untuk melawan ROS adalah superoksida dismutase (SOD) (Fiqriyana, 2010).

Superoksida dismutase (SOD) adalah antioksidan yang bekerja dengan cara menyeimbangkan radikal bebas atau spesies oksigen reaktif (ROS) dengan reaksi enzimatik dan mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil dengan cara SOD mengkatalisis reaksi dismutase radikal bebas anion superoksida (O_2^-) menjadi hidrogen peroksida dan molekul oksigen sehingga tidak berbahaya (Halliwell 2006).

Salah satu kerusakan sel yang dapat terjadi akibat meningkatnya radikal bebas adalah kerusakan sel hepar. Hepar merupakan organ yang berpotensi mengalami kerusakan karena organ pertama setelah saluran pencernaan yang terpapar oleh bahan yang bersifat toksik. Studi histologi mengenai nekrosis pada hepatosit dapat menjadi indikator yang kuat untuk mengungkapkan kerusakan pada hepar. Selain nekrosis, kerusakan sel dapat juga terjadi pada sinusoid (saluran darah) dan vena sentralis akibat paparan dari aloksan (Szkudelski, 2001).

Aloksan ($C_4H_2N_2O_4$) adalah suatu substrat yang secara struktural adalah derivat pirimidin sederhana. Nama aloksan diperoleh dari penggabungan kata allantoin dan oksalurea (asam oksalurik), (IUPAC) 2,4,5,6-tetraoxypyrimidin; 2,4,5,6-primidinetetron; 1,3-Diazinan-2,4,5,6-tetron dan asam Mesoxalylurea 5-oxobarbiturat.4,15. Aloksan merupakan bahan kimia yang digunakan untuk menginduksi diabetes pada hewan coba. Pemberian aloksan adalah cara yang cepat untuk menghasilkan kondisi diabetik eksperimental (hiperglikemik) pada hewan coba (Suharmiati, 2003). Aloksan dapat diberikan secara intravena, intraperitoneal, atau subkutan pada hewan coba (Szkudelski, 2008). Aloksan dapat menyebabkan DM tergantung insulin hewan coba tersebut dengan karakteristik mirip dengan DM tipe 1 pada manusia. Zat ini bersifat toksik selektif terhadap sel beta pankreas yang memproduksi insulin karena terakumulasinya aloksan secara khusus melalui transporter glukosa yaitu GLUT2 (Watkins, 2008).

Eksplorasi bahan alam yang berpotensi sebagai tanaman obat adalah pilihan yang tepat untuk mengatasi kesulitan terkena penyakit. Salah satu tanaman tersebut adalah daun sirsak (*Annona muricata*). Daun *A. muricata* memiliki senyawa flavonoid, tanin, fitosterol, kalsium oksalat, alkaloid, asam lemak, mirisil alkohol dan anonol (Adjie, 2011; Artini, 2012; Asprey dan Thornton, 2000). Senyawa pada daun sirsak yang diduga memiliki khasiat antidiabetes adalah senyawa alkaloid dan flavonoid (Markham 1988).

Pada penelitian ini dosis yang digunakan mengacu pada dosis Adewole (2009) dengan dimodifikasi pada lama pemberian dosis ekstrak daun *A. muricata* menjadi lebih sedikit waktunya 30 hari dan agen untuk menginduksi DM menggunakan aloksan dengan dosis 120 mg/kgBB. Hal ini dilakukan dengan pertimbangan pada penelitian yang dilakukan oleh Adewole (2009) dengan lama pemberian *A. muricata* selama 60 hari sudah mampu mendekati normal, akan tetapi perlu untuk dicari kemungkinan memperpendek lama pemberian *A. muricata* menjadi 30 hari dengan dosis 0, 50, 100 dan 150 mg/kg BB dapat bersifat toksik atau antitoksik

terhadap hepar tikus. Sedangkan untuk penggunaan aloksan sebagai penginduksi DM karena aloksan lebih aman digunakan pada hewan coba seperti tikus (*Rattus norvegicus*) dari pada streptozotosin (Watkins, 2008).

Berdasarkan latar belakang di atas, penelitian ini dilakukan dengan tujuan mengkaji tentang pengaruh ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap kadar SOD, dan histologi hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi oleh aloksan.

METODE PENELITIAN

Persiapan Hewan Coba

Sebelum penelitian dimulai, terlebih dahulu dipersiapkan tempat pemeliharaan hewan coba, yaitu kandang (bak plastik), sekam, tempat makan, minum dan pakan tikus. Setelah itu dilakukan aklimatisasi di laboratorium selama 1 minggu. Mencit dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif tikus normal (tidak diabetes), kelompok tikus kontrol positif (diabetes) dan kelompok diabetes diobati ekstrak daun sirsak. Untuk menjadi diabetes, tikus diinduksi dengan aloksan dengan dosis 120 mg/kgBB, diberikan seminggu 3kali selama 1 minggu, dimulai 2 minggu setelah diaklimatisasi.

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Juni sampai Desember 2014, di Laboratorium Fisiologi Hewan Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang hewan coba (bak plastik), blender, alat pengekok oral (*gavage*), gelas ukur, timbangan digital, gelas arloji, spatula, spektrofotometer, spuit, seperangkat alat bedah, tabung *apendorf*, sentrifuge, glukometer, strip glukotest, rotari evaporator, oven, *obyek glass*, *freezer*, mikrotom, dan hotplate.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih galur wistar (*Rattus norvegicus*), ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.), aquades, kapas,

tissue, alkohol 70 %, formalin, etanol absolut, xylol, parafin, gelatin, *hematoxylin*, *eosin*, etilen, aloksandengan kadar 120 mg/kg berat badan, xantin, NaCL 0,9%, buffer fosfat 50 mM, EDTA 0,1 mM, dan NaOH.

Pembuatan Ekstrak Daun Sirsak

Daun sirsak (*Annona muricata* L.) 1 kg yang masih segar dikeringkan, kemudian ditumbuk dan dimasukkan ke dalam blender. Bubuk halus dicampur dengan aquades dan diekstraksi 2 kali dengan 2,5 liter aquades pada suhu kamar selama 48 jam. Kemudian dihasilkan ekstrak daun sirsak sebanyak 36,23 g. Selanjutnya dapat diberikan kepada hewan coba untuk perlakuan (Adewole, 2009).

Penentuan dosis ekstrak daun sirsak

Gambaran atau model penentuan dosis ekstrak daun sirsak pada perlakuan dengan hasil modifikasi penelitian Adewole (2009), yaitu 3 dosis yang berbeda 50, 100 dan 150 mg/kg BB. Jika dosis tersebut diberikan pada tikus dengan berat badan rata-rata 200 g, maka dosis ekstrak daun sirsak dapat dihitung menjadi $(200/1000) \times 150 \text{ ml} = 30 \text{ ml/ekor}$, $(200/1000) \times 100 = 20 \text{ ml/ekor}$ dan $(200/1000) \times 50 \text{ ml} = 10 \text{ ml/ekor}$. Malole (1989), ekstrak yang dapat dimasukkan pada lambung tikus adalah 2,5 ml.

Dipeloreh 3 konsentrasi yang berbeda:

1. Konsentrasi I = 12 mg/ml x 2,5 ml = 30 mg/ekor
2. Konsentrasi II = 8 mg/ml x 2,5 ml = 20 mg/ekor
3. Konsentrasi III = 4 mg/ml x 2,5 ml = 10 mg/ekor

Pembagian Kelompok Sampel

Setelah 9 tikus positif diabetes, tikus dibagi menjadi 3 kelompok, yang terdiri dari:

- a. K- (Kontrol negatif) : Tikus normal tanpa diberi ekstrak daun sirsak dan tanpa diinduksi aloksan untuk diabetes.
- b. K+ (Kontrol positif) : Tikus diabetes dengan induksi aloksan 120 mg/kgBB tanpa diberi ekstrak daun

- c. P1 (Perlakuan : Tikus diabetes
1) dengan induksi aloksan 120 mg/kgBB dan diberi ekstrak daun sirsak dosis 50 mg/kgBB selama 30 hari.
- d. P2 (Perlakuan : Tikus diabetes
2) dengan induksi aloksan 120 mg/kgBB dan diberi ekstrak daun sirsak dosis 100 mg/kgBB selama 30 hari.
- e. P3 (Perlakuan : Tikus diabetes
3) dengan induksi aloksan 120 mg/kgBB dan diberi ekstrak daun sirsak 150 mg/kgBB dosis III selama 30 hari.

Pengukuran SOD

Tikus dibedah dan diperfusi pada bagian vena porta hepatica, kemudian hepar dicuci dengan menggunakan larutan PBS 10 mM. Hepar ditimbang seberat 0,3125 gram, kemudian digerus dalam mortar dan ditambahkan dengan 10x volume NaCl 0,9% dan dihomogenkan sampai rata. Supernatan dipisahkan dengan pelet dan diletakkan pada tabung appendorf. Supernatan ditambah dengan xantin oksidase 100 µl. Kemudian divortex dan dipanaskan dalam *water bath* dengan suhu 100°C selama 1 jam. Setelah satu jam, supernatan diangkat dan dibiarkan dalam suhu ruangan selama kurang lebih 30 menit. Lalu sampel diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm. Kadar SOD diperoleh dengan memasukkan data absorbansi ke dalam persamaan yang telah dibuat dari kurva standart (Suarsana, 2013).

1.6.3.3 Pembuatan Sayatan Hepar

Tahap-tahap pembuatan sayatan hepar sebagai berikut (Dewi, 2013):

1. Tahap pertama adalah *coating*, dimulai dengan menandai *obyek glass* yang akan digunakan dengan kikir kaca pada bagian tepi, kemudian direndam dalam alkohol 70% minimal semalam. Kemudian obyek glass dikeringkan dengan tissue dan dilakukan perendaman dalam larutan gelatin 0,5% selama 30-40 detik/slide, lalu dikeringkan dengan posisi disandarkan hingga gelatin yang melapisi kaca dapat merata
2. Tahap kedua, organ hepar yang telah disimpan dalam larutan formalin 10% dicuci dengan alkohol selama 2 jam, dan dilanjutkan dengan pencucian secara bertingkat dengan alkohol yaitu dengan alkohol 90%, 95%, etanol absolut (3 kali), xylol (3 kali), masing-masing selama 20 menit
3. Tahap ketiga, adalah proses *infiltrasi* yaitu dengan menambahkan parafin sebanyak 3 kali selama 30 menit
4. Tahap keempat, *embedding*. Bahan beserta parafin dituangkan kedalam kotak karton atau wadah yang telah disiapkan dan diatur sehingga tidak ada udara yang terperangkap didekat bahan. Blok parafin dibiarkan semalam dalam suhu ruang kemudian diinkubasi dalam *freezer* sehingga blok benar-benar keras
5. Tahap pematangan dengan mikrotom. *Cutter* dipanaskan dan ditempelkan pada dasar blok sehingga parafin sedikit meleleh. *Holder* dijepitkan pada mikrotom putar dan ditata sejajar dengan mata pisau mikrotom. Pengirisan atau penyayatan diawali dengan mengatur ketebalan irisan. Untuk hepar dipotong dengan ukuran 2-5 µm, kemudian pita hasil irisan diambil dengan menggunakan kuas dan dimasukkan air dingin untuk membuka lipatan lalu dimasukkan air hangat dan dilakukan pemilihan irisan yang terbaik. Irisan yang terpilih diambil dengan gelas obyek yang sudah dicoating kemudian dikeringkan diatas *hot plate*.
6. Tahap deparafinasi, yaitu preparat dimasukkan dalam xylol sebanyak 2 kali 5 menit.

7. Tahap rehidrasi, preparat dimasukkan dalam larutan etanol bertingkat mulai dari etanol absolut (2 kali), etanol 95%, 90%, 80%, dan 70% masing-masing 5 menit. Kemudian preparat direndam dalam aquadest selama 10 menit.
8. Tahap pewarnaan, preparat ditetesi dengan *hematoxylin* selama 3 menit atau sampai didapatkan hasil warna yang terbaik. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dan dibilas dengan aquadest selama 5 menit. Setelah itu preparat dimasukkan dalam pewarna eosin alkohol selama 30 menit dan dibilas dengan aquadest selama 5 menit.
9. Tahap dehidrasi, preparat direndam dalam etanol bertingkat 80%, 90%, 95% dan etanol absolut (2 kali) masing-masing selama 5 menit.
10. Tahap *clearing*, dalam larutan xylol 2 kali selama 5 menit, kemudian dikeringkan. Tahap mounting dengan etilen. Hasil akhir yaitu histologi hepar yang berupa sel hepatosit, sinusoid dan vena sentralis. Sel hepatosit normal mempunyai ciri-ciri: sel tersusun secara radier terhadap vena sentralis, bentuk sel bulat dan oval dan terdapat lempeng-lempeng hepatosit. Sel terlihat memiliki satu nukleus, namun ada juga yang memiliki lebih dari satu nucleus (binukleat) yang terdapat di tengah sel (Fajariyah, 2010). Sinusoid hepar adalah saluran darah yang berkeluk-luk dan melebar, dengan diameter tidak teratur, dilapisi sel endotel bertingkat tidak utuh, yang dipisahkan dari hepatosit di bawahnya oleh ruang perisinusoidal (dari Disse). Sedangkan vena sentralis merupakan pusat yang berada di tengah, dimana darah dari vena porta dan vena hepatica membawa darah menuju vena sentralis (Daglia, 2000).
11. Diamati dibawah mikroskop dan diambil gambar kemudian dicatat luas vena sentralis dengan cara mengukur diameter jarak dekat dan jarak jauh vena sentralis hepar.
12. Diamati dibawah mikroskop dan diambil gambar kemudian dihitung persentase kerusakan struktur sel hepatosit normal dan abnormal (piknosis, karioreksis, kariolisis dan nekrosis)

3.7 Analisis Data

Data yang telah diperoleh yaitu kadar SOD dan luas vena sentralis dianalisis menggunakan uji statistik Anova dengan taraf signifikan 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Terhadap Kadar SOD (*Superoksida dismutase*) Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) Yang Diinduksi Aloksan.

Data hasil pengukuran kadar SOD dengan menggunakan enzim xantin dan oksidase menunjukkan hasil yang berbeda pada tiap perlakuan. Perlakuan tersebut yaitu hepar tikus kontrol negatif (normal), kontrol positif (diabetes), dan tikus diabetes sesudah perlakuan pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) tiga dosis 50 mg/kg BB, 100 mg/kg BB dan 150 mg/kg BB dapat dilihat pada tabel 4.1 di bawah ini.

Tabel 4.1 Kadar SOD (ng/ml) pada hepar tikus diabetes sesudah perlakuan pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.)

Kelompok	Kadar SOD (ng/ml) Pada Ulangan Ke-.....			Rerata (ng/ml)
	1	2	3	
K-	13,01	14,34	12,28	13,21
K+	7,45	11,17	10,73	9,78
P1 (50 mg/kg BB)	8,28	10,84	11,28	10,14
P2 (100 mg/kg BB)	10,28	11,23	9,23	10,25
P3 (150 mg/kg BB)	12,40	11,12	11,06	11,52

Berdasarkan tabel 4.1 di atas diketahui bahwa rerata kadar SOD pada tikus kontrol negatif (13,21 ng/ml) lebih tinggi dibandingkan dengan kadar SOD tikus kontrol positif (9,78 ng/ml). Tubuh dapat menghasilkan antioksidan berupa enzim yang aktif bila didukung oleh nutrisi pendukung atau mineral yang disebut juga ko-faktor, salah satunya yaitu SOD. Ketika SOD di dalam tubuh normal, maka kadar

radikal bebas juga akan normal. Namun, ketika radikal bebas dalam tubuh meningkat, kadar SOD dalam tubuh juga meningkat untuk menangkal radikal bebas, sehingga terjadi keseimbangan (homeostasis) antara antioksidan dan radikal bebas.

Sedangkan rerata kadar SOD pada ketiga perlakuan lebih tinggi dibandingkan kontrol positif (tabel 4.1). Peningkatan SOD dikarenakan adanya antioksidan dalam senyawa flavonoid daun sirsak. Komponen senyawa flavonoid daun sirsak dimungkinkan dapat bekerja secara sinergis bersama dengan enzim SOD dalam menetralkan radikal bebas endogen sehingga kadar SOD hepar tikus tidak menurun seperti kontrol positif.

Berdasarkan gambar 4.1 di atas diketahui bahwa setelah pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) dalam tiga dosis yang berbeda menunjukkan peningkatan kadar SOD dibandingkan tikus kontrol positif. Hal ini sesuai dengan pendapat Widyastuti dan Nyoman (2012), yang menyatakan bahwa senyawa flavonoid mampu merangsang ekspresi Cu-Zn SOD yang berfungsi melindungi sel dari serangan stress oksidatif. Pada penelitian ini P1, P2 dan P3 mengandung senyawa flavonoid dari ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.)

Nurawati (2002), menyatakan bahwa enzim SOD memegang peranan penting sebagai antioksidan endogen. Berdasarkan mekanismenya, enzim ini digolongkan sebagai antioksidan primer yang berperan mengurangi pembentukan radikal bebas baru dengan memutus reaksi berantai dan mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil yaitu radikal O_2^- menjadi H_2O_2 .

Mekanisme flavonoid sebagai antioksidan dalam meningkatkan enzim SOD dijelaskan oleh Sugito (2012) bahwa kenaikan kadar SOD di dalam hepar disebabkan karena adanya komponen fenolik yang menginduksi gen enzim antioksidan, kemudian menginduksi *antioxidant receptor elemen* (ARE) dan menginduksi DNA untuk memproduksi enzim antioksidan. Komponen fenolik pada suatu tanaman diduga mampu memicu terekspresinya gen enzim antioksidan seperti Mn-SOD, Cu/Zn-SOD hepar, sehingga aktivitasnya meningkat.

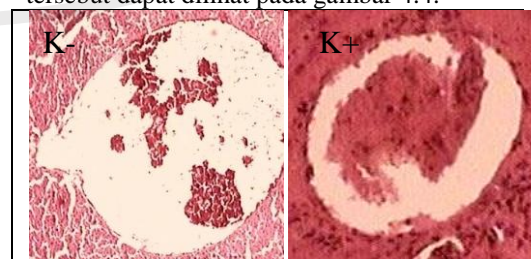
Hasil penelitian ini tidak sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Adewole (2009), menyatakan bahwa

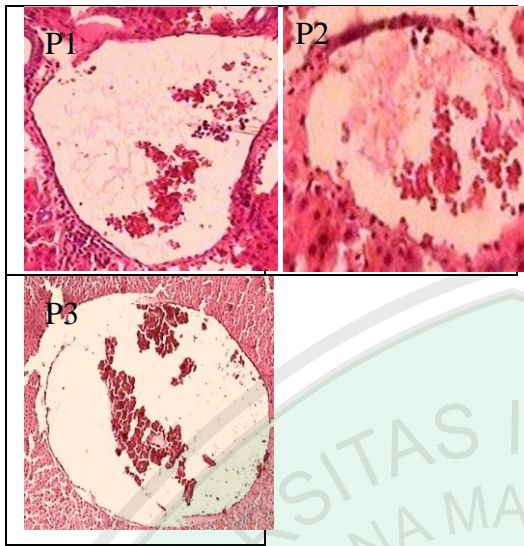
pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) dosis 100 mg/kgBB selama 60 hari dapat meningkatkan kadar SOD hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi STZ. Hal ini dimungkinkan karena beberapa hal yaitu 1) penelitian ini waktu pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang digunakan hanya 30 hari. Jadi, pemberian yang diberikan masanya lebih pendek dibandingkan penelitian Adewole (2009). 2) dosis yang digunakan tergolong rendah sehingga tidak dapat meningkatkan kadar SOD hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi aloksan. 3) dipengaruhi oleh senyawa toksik aloksan sebagai zat diabetik yang meningkatkan radikal bebas, sehingga SOD tidak dapat menangkalnya.

Pemberian aloksan dengan dosis 120 mg/kg BB pada tikus (*Rattus norvegicus*) mengakibatkan peningkatan radikal bebas dalam hepar. Produksi radikal bebas yang berlebihan akan memicu terjadinya stress oksidatif, yaitu suatu keadaan dimana jumlah radikal bebas yang diproduksi melebihi kapasitas tubuh untuk menangkalnya (Syahbuddin, 2000). Meningkatnya radikal bebas terlihat dari menurunnya antioksidan Cu/Zn-SOD yang telah banyak digunakan untuk memerangi radikal bebas (Wresdiyati, 2003)

Pengaruh Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Terhadap Luas Vena Sentralis Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) Yang diinduksi Aloksan

Hasil penelitian pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) berpengaruh terhadap luas vena sentralis hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi aloksan. Data histologi terkait hal tersebut dapat dilihat pada gambar 4.4.





Gambar 4.4 Histologi vena sentralis hepar tikus (*Rattus norvegicus*) jantan perbesaran 400x. Keterangan : K-, Kontrol negatif ($4,8 \times 10^8 \mu\text{m}$), K+, Kontrol positif ($1,9 \times 10^6 \mu\text{m}$), P1. Perlakuan 1 ($4,2 \times 10^6 \mu\text{m}$), P2. Perlakuan 2 ($1,9 \times 10^7 \mu\text{m}$), P3. Perlakuan 3 ($3,8 \times 10^7 \mu\text{m}$). VS : Vena sentralis.

Tabel 4.3 Rerata luas vena sentralis hepar tikus (*Rattus norvegicus*) sesudah pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.)

Perlakuan	Ulangan (μm)			Total (μm)	Rerata (μm)
	1	2	3		
K-	$4,8 \times 10^8$	$4,0 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$
K+	$1,9 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$4,8 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$
P1 (50 mg/kg BB)	$4,2 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$	$9,2 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$
P2 (100mg/kg BB)	$1,9 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$	61×10^7	$2,0 \times 10^7$
P3 (150mg/kg BB)	$3,8 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$	$9,5 \times 10^7$	$3,1 \times 10^7$

Berdasarkan tabel 4.3 rerata luas vena sentralis K+ ($1,6 \times 10^6 \mu\text{m}$) lebih sempit dibandingkan dengan K- ($3,8 \times 10^8 \mu\text{m}$). Hal ini dimungkinkan karena senyawa toksik aloksan. Penambahan aloksan sebagai oksidan menyebabkan jumlah radikal yang terbentuk dalam tubuh meningkat sehingga terjadi ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan dimana hal ini dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Apabila stres oksidatif ini berlangsung

lama, dapat menyebabkan reaksi fisi homolitik senyawa hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi spesies radikal bebas hidroksil (OH^\bullet) yang sangat reaktif. Radikal hidroksil dapat bereaksi secara acak terhadap komponen biomolekul seperti karbohidrat, lipid, protein dan asam nukleat.

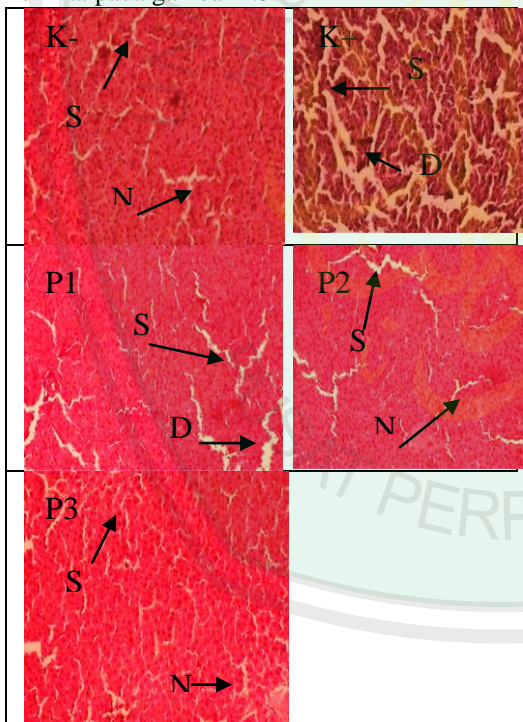
Martini (1995), menyatakan bahwa vena sentralis merupakan suatu venula yang tersusun dari selapis sel endotel dan tunica eksterna. Tunica eksterna tersusun dari jaringan ikat yang mengandung serat kolagen dan otot polos. Komponen penyusun tunica eksterna tersebutlah yang berperan dalam mengatur diameter vena sentralis. Otot polos bertanggungjawab atas aktivitas tidak sadar, seperti gerakan lambung atau penyempitan pembuluh darah. Selain ciri tersebut, otot polos memiliki kontraksi sangat lambat, tidak cepat lelah, dan tahan lama. Serat kolagen berwarna putih atau disebut serat putih. Seratnya tersusun atas protein kolagen, sehingga memiliki sifat kuat, daya regang tinggi, dan elastisitas yang rendah (Rochmah, 2009). Ketika aloksan atau radikal bebas mengenai otot polos dan serat kolagen pada wilayah tunica eksterna menyebabkan vena sentralis menjadi menyempit. Penyempitan luas vena sentralis dikarenakan kontraksi otot polos yang terus menerus, sehingga mengakibatkan sel mengalami kerusakan bahkan mungkin sel menghilang akibatnya vena sentralis menyempit.

Rerata luas vena sentralis ketiga perlakuan setelah pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) P1 ($3,0 \times 10^6 \mu\text{m}$), P2 ($2,0 \times 10^7 \mu\text{m}$) dan ($3,1 \times 10^7 \mu\text{m}$) lebih luas dibandingkan K+ ($1,6 \times 10^6 \mu\text{m}$) tabel 4.3. Peningkatan rerata luas vena sentralis hepar tikus dimungkinkan karena antioksidan yang terdapat pada daun sirsak yaitu flavonoid. Simamora (2008), menyatakan flavonoid adalah senyawa polifenol yang merupakan salah satu golongan antioksidan, suatu senyawa kimia yang dapat menghambat terjadinya proses oksidasi yang dipicu oleh radikal bebas. Kapasitas flavonoid sebagai antioksidan tidak hanya bergantung pada potensial reduksi F1-OH, tapi juga kemungkinan terjadinya reaksi samping pada radikal aroksil. Selain dengan cara memadamkan radikal, flavonoid dapat menstabilkan radikal-radikal bebas yang terlibat dalam

proses oksidasi dengan cara berikatan kompleks dengan senyawa flavonoid. Flavonoid yang terkandung dalam ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) dapat menangkal radikal bebas yang dihasilkan oleh senyawa toksik aloksan, sehingga sel yang masih ada dihambat kerusakannya dan mampu beregenerasi akibatnya vena sentralis dapat meluas kembali.

Pengaruh Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Terhadap Sinusoid Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) Yang Diinduksi Aloksan

Hasil penelitian pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) berpengaruh terhadap sinusoid hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi aloksan sehingga dapat menyebabkan diabetes mellitus. Data histologi terkait hal tersebut dilihat pada gambar 4.5.



Gambar 4.5 Histologi Sinusoid hepar tikus (*Rattus norvegicus*) jantan (perbesaran 400x, pewarnaan HE). Keterangan: K-. Kontrol negatif, K+. Kontrol positif, P1. Perlakuan 1(50 mg/kgBB), P2. Perlakuan 2(100mg/kgBB), P3. Perlakuan 3(150mg/kgBB). S : sinusoid, N: normal, D: dilatasi (pelebaran)

Hasil penelitian histologi sinusoid hepar dapat dilihat pada gambar 4.5.

Keadaan histologi sinusoid K- menunjukkan normal. Pada K+ dan P1 sinusoid terjadi dilatasi (pelebaran). Sedangkan pada P2 dan P3, menunjukkan perubahan struktur yang mendekati sinusoid K-.

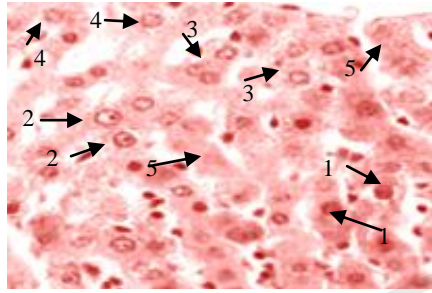
Kelompok K+ dan P1 sinusoid tidak nampak teratur sebagian besar sinusoid mengalami pelebaran (dilatasi) dibandingkan dengan kontrol negatif. Hal ini dimungkinkan karena senyawa toksis aloksan. Pelebaran (dilatasi) sinusoid menurut Ressang (1984), dapat terjadi karena adanya desakan pada dinding sinusoid akibat adanya zat toksik. Kaplowitz (2002), menyatakan kerusakan sel-sel hepar yang disebabkan oleh bahan toksik, umumnya meliputi partisipasi metabolit terhadap bahan toksik, selanjutnya akan mendatangkan respon imun, bahkan dapat langsung mempengaruhi biokimia sel.

Sedangkan sinusoid pada kedua perlakuan nampak jelas dan teratur dibandingkan kontrol positif gambar 4.5. Perbaikan sinusoid hepar tikus ketiga perlakuan (P2 dan P3) sinusoid nampak jelas mendekati kontrol negatif dimungkinkan karena antioksidan yang terdapat pada daun sirsak yaitu flavonoid.

Menurut Gotama (1999), senyawa flavonoid berfungsi sebagai antihepatotoksik. Senyawa ini paling berperan dalam memulihkan kerusakan sel hepar dibandingkan alkaloid dan saponin. Antihepatotoksik yaitu senyawa atau zat yang dapat melindungi sel-sel hepar terhadap pengaruh zat toksik yang menyerang sel hepar. Senyawa antihepatotoksik bahkan mampu memperbaiki jaringan hepar yang fungsinya sedang terganggu.

Pengaruh Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Terhadap Sel Hepatosit Normal dan Abnormal Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) Yang Diinduksi Aloksan

Hasil penelitian pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) berpengaruh terhadap jumlah sel hepatosit normal dan abnormal hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi aloksan. Data histologi terkait hal tersebut dapat dilihat pada gambar 4.6.



Gambar 4.6 Histologi hepatosit hepar tikus (*Rattus norvegicus*) jantan (perbesaran 1000x, pewarnaan HE). Keterangan: 1: sel hepatosit normal (bulat, inti ditengah memadat), 2. Sel hepatosit piknosis (inti menyusut), ; 3.Sel hepatosit karioreksis (inti pecah dan menyebar), ; 4.Sel hepatosit kariolisis (inti pecah dan tidak dapat diwarnai (pucat)), ; 5. sel hepatosit nekrosis(inti sel menghilang).

Hasil penelitian histologi sel hepatosit normal dan abnormal dapat dilihat pada gambar 4.6. Keadaan struktural histologi sel hepatosit normal bentuk sel bulat, oval, inti bulat memadat di tengah dan terdapat lempeng-lempeng hepatosit. Pada struktur sel hepatosit abnormal terjadi adanya nekrosis yang ditandai dengan adanya piknosis, karioreksis dan kariolisis. Data jumlah persentase sel hepatosit normal dan abnormal dapat dilihat pada tabel 4.6 di bawah ini

Tabel 4.6 jumlah persentase sel hepatosit normal dan abnormal setelah pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.)

Perlakuan	Jumlah Sel Normal (%)	Jumlah Sel Abnormal (%)				Mean±SD
		Piknosis	Karioreksis	Kariolisis	Nekrosis	
K-	79±3,60	5,6±3,21	4,3±1,15	4,6±0,57	6,3±3,51	5,25±2,26
K+	25,3±5,03	30,3±12,66	13,3±2,08	9±3	22±6,55	18,66±10,62
P1	40±3	23,3±10,01	7,6±5,03	13±3,60	19,3±5,50	18,33±6,86
P2	61±3,60	13,3±5,03	7,3±3,05	6±1,73	12,3±3,51	9,75±4,45
P3	73±3,60	9,3±2,51	3,3±2,51	5,3±2,51	9±3,60	6,75±3,57

Tabel 4.6 di atas menunjukkan bahwa jumlah rerata sel hepatosit normal K+ (25,3±5,03)% sel lebih sedikit dibandingkan dengan K- (79±3,60)% sel. Jumlah rerata sel abnormal pada K+ yang mengalami piknosis

(30,3±12,66)% sel lebih banyak dibandingkan dengan karioreksis (13,3±2,08)% sel, kariolisis (9±3)% sel dan nekrosis (22±6,55)% sel. Hal ini mungkin disebabkan pada K+ dipengaruhi adanya aloksan sebagai diabetogenik yang diperantarai oleh oksidasi senyawa dengan gugus SH, penghambatan glukokinase, pembangkitan radikal bebas dan gangguan homeostatis ion kalsium intraseluler (Lenzen, 2008). Kerusakan sel berupa nekrosis menyebabkan pembengkakan inti dan sitoplasma kemudian pecah menumpahkan kandungan isi sel ke jaringan ekstraselular karena adanya gangguan pada pompa natrium yang diakibatkan oleh kekurangan ATP. ATP sangat penting untuk integritas hepatosit. Apabila kadar ATP rendah, maka enzim intraseluler akan keluar dari dalam darah dan menyebabkan kerusakan pada hepar (Kane *et al.* 1985).

Jumlah rerata sel hepatosit normal pada perlakuan sesudah pemberian ekstrak daun sirsak P1(40±3)% sel, P2 (61±3,60)% sel dan P3 (73±3,60)% sel lebih banyak dibandingkan dengan K+(25,3±5,03)% sel. Peningkatan jumlah sel hepatosit normal hepar tikus dimungkinkan karena pemberian ekstrak daun sirsak yang mengandung antioksidan salah satunya yaitu flavonoid. Flavonoid melindungi sel-sel tubuh dari kerusakan oksidatif, sehingga struktur membran sel dapat berfungsi dengan baik. Mekanisme flavonoid sebagai antioksidan adalah dengan menangkap radikal bebas secara langsung. Awalnya flavonoid teroksidasi dengan radikal kemudian berubah menjadi lebih stabil sebagai radikal yang kurang reaktif (Ardiani, 2011). Pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) dapat membantu menghambat kerusakan sel dan nantinya sel normal mampu beregenerasi kembali kemudian jaringan menjadi baik.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :Tidak ada pengaruh ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap kadar SOD pada Tikus (*Rattus*

norvegicus) yang diinduksi aloksan. Ada pengaruh ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap histologi vena sentralis, sinusoid dan hepatosit hepar pada Tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi aloksan. Dosis yang optimal pada penelitian ini adalah 150 mg/kg BB.

Berdasarkan hasil penelitian, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut yaitu: Menambahkan dosis ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang lebih tinggi dari yang sudah dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui apakah ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) tidak berpengaruh karena rendahnya dosis yang digunakan. Menghitung kadar MDA pada hepar untuk mengetahui radikal bebas yang dihasilkan oleh senyawa aloksan.

DAFTAR PUSTAKA

- Adewole, Stephen O. 2009. Protective effect of *Annona* Linn. Leaf Aqueous Extract on Serum Lipid Profiles and Oxidative Stress in Hepatocytes of Streptozotocin-treated Diabetic rats. *Afr. J. Trad. CAM* (2009) 6 (1): 30 – 41
- Ardiani, F., Wiryatun L., dan Emy H. 2011. Ekstrak Air Daun Ceplikan (*Ruellia tuberosa* L.) Berpengaruh Terhadap Kadar SGOT, SGPT Dan Gambaran Histologis Hepar Tikus DM. *Jurnal Gizi Klinik Indonesia*. Vol. 8, No. 2.
- Campbell, Neil A, dkk. 2004. *Biologi*, (Terj.): Manalu, W. *Biologi. Edisi kelima jilid III*. Jakarta : Erlangga.
- Dewi, Devis Resita. 2013. Studi pemberian ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum prismaticum*) terhadap kadar Mda dan histologi pankreas pada tikus (*Rattus norvegicus*) Diabetes Mellitus tipe 1 hasil induksi mld-STZ (multiple lowdose-stertozotocin). *Kimia students journal*. Vol.2. no.1.
- Fiqriyana, Maulidya A.2010. Pengaruh Pemberian ekstrak Eucema Spinom Terhadap Kadar Glukosa dalam Darah dan Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD) pada Tikus Terpapar Multiple Low Doses Streptozotocin (MLD-STZ). *Skripsi*, Malang :Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam Universitas Brawijaya.
- Gotama, I.B.I., S. Sugiarto, dan Nurhadi. 1999. *Inventarisasi Tanaman Obat Indonesia* Jilid V. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan.
- Halliwell B. 2006. Reactive spesies and antioxidants: Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*. 141:312-322.
- Kane AB, Petrovich DR, Stern RO & Farber JL. 1985. ATP depletion and Loss of Cell Integrity in Anoxic Hepatocyte and Silica-treated P388D1 Macrophages. *AJP-Cell Physiology* 249(3): 256-266.
- Lenzen, S. 2007. The mechanisms of alloxan and streptozotocin induced diabetes. *clinical and experimental diabetes and metabolism*. 51: 216-226.
- Malole,MBM. 1989. *Penggunaan hewan-hewan percobaan laboratorium*. Departemen pendidikan dan kebudayaan direktorat jendral pendidikan tinggi pusat antar universitas. Bogor: IPB.
- Markham KR. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoida*. Bandung: ITB.
- Martini, F.H. 1995. *Fundamental of anatomy and physiologi*. New Jersey : Prentice-Hall International.
- Nurawati, D. 2002. Profil Imunohistokimia Enzim Antioksidan Copper, zinc superoksida dismutase (Cu, Zn-SOD) pada ginjal tikus hiperkolesterolemia. *Skripsi*. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan, IPB.
- Rochmah, Siti Nur. 2009. *Biologi : SMA dan MA Kelas XI*. Jakarta : Pusat Perbukuan, Departemen Pendidikan Nasional.
- Szkudelski, T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in cells of the rat pancreas. *Physiol. Res*. 50: 536-546.