

UJI PEMANFAATAN DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.) DALAM MENGHAMBAT STRES OKSIDATIF PADA TIKUS WISTAR HIPERKOLESTEROLEMIA MELALUI PENINGKATAN AKTIVITAS SUPEROXIDE DISMUTASE

Sri Wahjuni, Sri Rahayu Santi, dan Ni Nyoman Astuti Wulandari

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali

Email : astutii.wulandari@gmail.com

ABSTRAK

Stres oksidatif merupakan keadaan dimana terjadinya ketidakseimbangan antara radikal bebas didalam tubuh dengan antioksidannya. *Superoxide Dismutase* (SOD) merupakan salah satu antioksidan endogen yang dapat menetralkan kelebihan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Kelebihan ROS akibat stres oksidatif dapat pula dinetralkan dengan bantuan antioksidan eksogen. Tanaman sirsak (*Annona muricata* L.) diketahui memiliki aktivitas antioksidan terutama pada bagian daun. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas dari daun sirsak (*Annona muricata* L.) dalam menghambat stress oksidatif yang dilakukan pada objek tikus wistar hiperkolesterolemia melalui peningkatan aktivitas SOD darah dengan menggunakan variasi dosis ekstrak 50 mg/kg BB; 100 mg/kg BB dan 150 mg/kg BB. Pada penelitian ini dosis yang memberikan hasil terbaik dalam menghambat stres oksidatif melalui peningkatan aktivitas SOD adalah dosis 150 mg/kg BB dengan persen inhibisi SOD sebesar (81,42% ± 3,91) dimana persen inhibisi SOD berbanding lurus dengan aktivitas SOD.

Kata kunci : daun sirsak (*Annona muricata* L.), hiperkolesterolemia, stres oksidatif, SOD

ABSTRACT

Oxidative stress is an imbalance condition between free radicals in the body with the anti-oxidant. Superoxide dismutase (SOD) is one of the endogenous anti-oxidant that can neutralize the excess of Reactive Oxygen Species (ROS). The excess of ROS that caused by stres oksidatif can also be neutralized with the help of exogenous anti-oxidants. A soursop plant (*Annona muricata* L.) has anti-oxidant activity, especially in the leaves. This study aims to determine the activity of the leaves of the soursop (*Annona muricata* L.) in inhibiting the oxidative stress that conducted on the object hypercholesterolemic rats wistar through increasing SOD activity using variations of the extract dose of 50 mg/kg BW; 100 mg/kg BW and 150 mg/kg BW. In this study the dose gives the best result in inhibiting the oxidative stress through an increase in SOD activity was dose of 150 mg/kg BW with percent inhibition of SOD at (81,42% ± 3.91) where the percent inhibition of SOD is directly proportional to the activity of SOD.

Keywords : soursop leave (*Annona muricata* L.), hypercholesterolemic, oxidative stress, SOD

PENDAHULUAN

Tingginya tingkat kesibukan masyarakat akan cenderung merubah pola hidup terutama dalam hal mengkonsumsi makanan cepat saji yang praktis, enak dan relatif murah (Noorkasiani dkk, 2007). Kebiasaan mengkonsumsi makanan cepat saji tanpa disadari dapat menimbulkan berbagai macam penyakit, karena pada umumnya makanan

cepat saji mengandung lemak dan garam yang tinggi dengan kandungan serat yang rendah (Khomsan, 2004). Di samping itu, akan terjadi peningkatan kadar kolesterol dalam darah yang mengakibatkan timbulnya penyakit hiperkolesterolemia.

Tubuh manusia dapat terpapar radikal bebas baik radikal bebas eksogen yaitu yang berasal dari luar tubuh seperti makanan maupun

lingkungan dan radikal bebas endogen yang terbentuk dari reaksi yang terjadi dalam tubuh. Terdapatnya radikal bebas dalam jumlah berlebih dapat mengakibatkan radikal bebas akan menyerang makromolekul seperti lemak, DNA, protein, dan karbohidrat.

Reactive Oxygen Species (ROS) adalah salah satu kelompok radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada biomolekul lipid melalui peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid merupakan proses yang bersifat kompleks akibat reaksi antara asam lemak tak jenuh ganda penyusun fosfolipid membran sel dengan ROS (Setiawan dan Suhartono, 2007). Produk reaksi peroksidasi lipid akan bereaksi dengan protein tubuh dan menyebabkan terbentuknya senyawa yang bersifat karsinogen. Produk hasil peroksidasi lipid di dalam tubuh kemungkinan juga akan mempersempit pembuluh darah, menyebabkan timbulnya arterosklerosis, yang akan memicu penyakit jantung koroner (Braunwald, 2005).

Radikal bebas dapat dinetralkan dengan adanya suatu antioksidan endogen yang terdapat di dalam tubuh manusia dan diyakini dapat melindungi endotel yang disebut dengan *Superoxide Dismutase* (SOD). Kadar SOD di dalam tubuh jika terus menerus menurun maka akan berujung pada stress oksidatif. Antioksidan akan berikatan dengan radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi pembentukan radikal bebas lainnya yang dapat memicu terjadinya stress oksidatif. Stress oksidatif adalah suatu keadaan dimana terjadinya ketidakseimbangan antara ROS dengan kapasitas antioksidan untuk mencegah terjadinya komplikasi oksidatif (Thannickal, 2000; Halliwell, 2007). Proses peroksidasi lipid dapat pula terjadi akibat terjadinya stress oksidatif, sehingga diperlukan adanya antioksidan pada lipid untuk menghambat atau mencegah reaksi autooksidasi lemak baik pada tahap inisiasi maupun propagasi (Siti, 2009).

Senyawa-senyawa yang mempunyai potensi sebagai antioksidan umumnya merupakan senyawa flavonoid, fenolat dan alkaloid. Tanaman sirsak (*Annona muricata* L.) adalah salah satu tanaman yang memiliki kandungan metabolit sekunder flavonoid dan fenolat, khususnya pada bagian daun serta memiliki aktivitas sebagai antioksidan dengan persen peredaman DPPH sebesar 77,22% pada menit ke-5 dan 85,42% pada

menit ke-60 dengan konsentrasi 8000 ppm (Rahayu, 2012). Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan uji untuk mengetahui efektivitas dari daun sirsak (*Annona muricata* L.) dalam menghambat stress oksidatif yang dilakukan pada objek tikus wistar hiperkolesterolemia.

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan penelitian yang digunakan yaitu daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang dikumpulkan sekitar bulan November 2013 dan diperoleh dari daerah Denpasar dan Gianyar, minyak babi, kuning telur puyuh dan pakan standar tikus.

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah jantan galur wistar dengan umur \pm 3 bulan dan dengan berat badan rata-rata 215-240 gram, sehat dan normal yang diperoleh dari UPT. Lab Analitik Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Badung, Bali.

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian adalah *wash buffer concentrate*, *tetramethylbenzidine substrate* (TMB substrate), *antibody diluent*, *Alkaline phosphate (stop solution)*, *Horseradish Peroxidase* (HRP conjugate), anti 8-OHdG, 8-OHdG standard, *sample solution*, *WST Work Solution*, *dilution buffer*, *Enzym Working Solution*, etanol, akuades, pakan standar tikus, minyak babi.

Peralatan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, neraca analitik, seperangkat alat spektrofotometer UV-Vis Variant DMS 80, spuit injeksi, *centrifuge* Clements 2000, *well protein binding plate*, *water bath* Gelman Science.

Cara Kerja

Ekstraksi daun sirsak (Annona muricata L.)

Sebanyak 1.800 gram serbuk daun sirsak (*Annona muricata* L.) diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan 11 L etanol teknis 96% (5x24 jam). Ekstrak etanol diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental etanol yang kemudian diuji aktivitasnya dalam menghambat stress oksidatif pada hewan uji

tikus wistar melalui pengukuran aktivitas SOD dalam darah.

Pembuatan Pakan Tinggi Lemak

Kadar kolesterol darah hewan uji ditingkatkan melalui pemberian pakan tinggi lemak yang mengandung kolesterol 18% dari minyak babi dan 30% dari kuning telur puyuh.

Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimental sesungguhnya (*true experimental*) dengan menggunakan rancangan *Randomized Posttest Only Control Group Design* (Pocock, 2008). Tahap awal penelitian adalah dilakukannya adaptasi hewan uji dengan pemberian pakan standar dan air minum selama 7 hari. Selanjutnya hewan uji diberi pakan tinggi lemak selama 35 hari untuk memberi kondisi hiperkolesterolemia kepada hewan uji. Langkah selanjutnya hewan uji diberi perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol daun sirsak selama 21 hari dengan dosis 50, 100 dan 150 mg/kg BB.

Penentuan aktivitas SOD Darah

Sampel darah yang digunakan dalam penentuan aktivitas SOD darah adalah pada bagian plasma. Aktivitas SOD diukur dengan menggunakan protokol *SOD Assay Kit WST* (2002). Kedalam tiap tabung sampel dan blanko 2 ditambahkan 20 μ L *sample solution* berupa sampel plasma darah, dan ditambahkan 20 μ L H₂O untuk masing-masing tabung blanko 1 dan blanko 3. Masing-masing larutan (sampel, blanko 1, blanko 2, blanko 3) ditambahkan 200 μ L *WST Working Solution* dan 20 μ L *dilution buffer* untuk blanko 2 dan blanko 3. Sebanyak 20 μ L *Enzym Working Solution* ditambahkan untuk setiap sampel dan blanko 1. Masing-masing larutan selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit dan selanjutnya diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 450 nm.

Analisis Data

Data hasil penelitian ini dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji *Kolmogorov-smirnov* untuk mengetahui apakah suatu variable normal atau tidak normal. Jika distribusi data normal dan homogen dengan $P > 0,05$, maka analisis dilanjutkan dengan analisis parametrik metode ANOVA menggunakan program SPSS (*Statistical Product and Services Solution*) pada tingkat kepercayaan 95%. Selanjutnya dilakukan

Post Hoc study dengan uji Tukey/HSD untuk mengetahui kelompok mana yang mempunyai pengaruh sama atau berbeda satu dengan yang lainnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi

Hasil ekstraksi 1.800 gram daun sirsak dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol teknis (5x25 jam) diperoleh ekstrak kental etanol sebanyak 147 gram berwarna hijau pekat.

Penentuan Aktivitas SOD Darah

Aktivitas SOD ditentukan dengan mengukur absorbansi sampel dan blanko menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 450 nm yang selanjutnya dihitung persen inhibisi SOD dengan mensubstitusi absorbansi sampel dan blanko ke dalam rumus *SOD Assay Kit WST* untuk mengetahui aktivitasnya, dimana persen inhibisi SOD berbanding lurus dengan aktivitas SOD. Rata-rata persen inhibisi SOD berdasarkan hasil pengukuran pada masing-masing kelompok K₁, K₂, P₁, P₂, dan P₃ ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata persen inhibisi SOD masing-masing kelompok

Kelompok	Rata-rata persen inhibisi SOD
K ₁	(79,99% \pm 5,97)
K ₂	(27,13% \pm 5,97)
P ₁	(48,56% \pm 5,97)
P ₂	(62,85% \pm 5,97)
P ₃	(81,42% \pm 3,91)

Kelompok kontrol hiperkolesterolemia (K₂) mengalami penurunan aktivitas SOD yang ditunjukkan dari penurunan persen inhibisi SOD menjadi (27,13% \pm 5,97) dari kondisi awal yang ditunjukkan oleh kelompok kontrol negatif (K₁) yaitu sebesar (79,99% \pm 5,97). Pada kelompok perlakuan 1 sampai dengan kelompok perlakuan 3 terjadi peningkatan aktivitas SOD secara berkala. Kelompok perlakuan 3 (P₃) menunjukkan peningkatan aktivitas SOD paling tinggi yang ditunjukkan dari nilai persen inhibisi SOD sebesar (81,42% \pm 3,91).

Hasil Analisis Data

Data hasil penentuan aktivitas SOD yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan SPSS (*Statistical Product and Services Solution*) 16.0 for Windows. Berdasarkan hasil analisis data dengan menggunakan uji Kolmogorov-smirnov diketahui bahwa data % inhibisi SOD masing-masing kelompok terdistribusi normal dan homogen dengan $P > 0,05$. Analisis dilanjutkan dengan uji analisis parametrik metode ANOVA pada tingkat kepercayaan 95%. Analisis dengan ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada hasil penentuan aktivitas SOD pada kelompok hiperkolesterolemia (K_2) dengan kelompok kontrol negatif (K_1), kelompok perlakuan 1 (P_1), kelompok perlakuan 2 (P_2), dan kelompok perlakuan 3 (P_3) dengan $P < 0,05$. Berdasarkan hasil analisis *Post Hoc study* dengan uji Tukey/HSD menunjukkan bahwa kelompok perlakuan 3 (P_3) memberikan pengaruh paling signifikan terhadap kelompok hiperkolesterolemia (K_2) dengan $P < 0,05$.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan :

1. Pemberian pakan tinggi lemak kepada hewan uji dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif yang ditandai dengan menurunnya aktivitas SOD darah pada kelompok kontrol hiperkolesterolemia (K_2) dengan nilai persen inhibisi SOD sebesar $(27,13\% \pm 5,97)$.
2. Ekstrak etanol daun sirsak mampu menghambat stres oksidatif melalui peningkatan aktivitas SOD darah.
3. Dosis yang memberikan aktivitas terbaik dalam meningkatkan aktivitas SOD darah adalah dosis 150 mg/kg BB dengan peningkatan persen inhibisi SOD menjadi $(81,42\% \pm 3,91)$.

Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan mengukur kadar SOD.
2. Perlu dilakukan penentuan LD50 untuk mengetahui dosis maksimal yang dapat diberikan kepada hewan uji.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh staff UPT. Laboratorium Analitik Universitas Udayana dalam membantu kelancaran penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali Khomsan, 2004, *Pangan dan Gizi untuk Kesehatan*, PT Rajagrafindo Persada, Jakarta
- Bambang Setiawan dan Eko Suhartono, 2007, Peroksidasi Lipid dan Penyakit Terkait Stres Oksidatif pada Bayi Prematur, *Medical Chemistry*, 57 : 10-14
- Braunwald, E, 2005, Approach to the Patient With Cardiovascular Disease, In : Kasper D.L, Longo, S.L, Hauser (editors), *Harrison's Principles Internal Medicine*, Volume 2. 16th Ed., 208 : 1301-1304
- Noorkasiani, M.Kes., Heryati, S.Kp., M.Kes., dan Rita Ismail, S.Kp., M.KM, 2007, *Sosiologi Keperawatan*, EGC, Jakarta
- Halliwell, 2007, Biochemistry Of oxidative Stress, *Journal Compilations biochemical Society. Cell Mol Physiol*, 279 : L1005-L1028
- Pocock, S. J., 2008, *The Size of a Clinical Trial, Clinical Trial, A Practical Approach*, John Willey & Sons. Chichester, p. 123-127
- Rahayu Artini, Ni Putu., 2012, Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Sebagai Antioksidan Pada Penurunan Kadar Asam Urat Tikus Wistar, *Skripsi*, Universitas Udayana, Bukit Jimbaran
- Siti Nurhidayah, BT. P., 2009, Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daging Pisang Raja (*Musa AAB 'PisangRaja*) dengan Vitamin A, Vitamin C, dan Katekin Melalui Penghitungan Bilangan Peroksida, *Skripsi*, Universitas Indonesia, Jakarta
- Thannickal, V.J. and Fanburg, B.L., 2000, Reactive Oxygen Species in Cell Signaling, *Invited Review, Am J Lung*