

Pengaruh Pemberian Minyak Atsiri Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) secara Subkronik terhadap Kadar MDA Jaringan Aorta dan Ketebalan Dinding Aorta pada Tikus Wistar

Faris Alima Mahdi*, Reza Hakim**, Zainul Fadli**,

*Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

**Staff Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

Email: faris.alima5@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Coronary Heart Disease (CHD) is one of the most deadly disease. Early symptoms can be found in the injured blood vessels (*atherosclerosis*). *Atherosclerosis* is the wall thickening of blood vessels caused by buildup of *Low Density Lipoprotein* (LDL). *Annona muricata* Linn. is a herbs that has potential as an antioxidant with slight side effects. In the leaf has the most terpenoid content than the other parts. The purpose of this study is to determine the effect of essential oil *Annona muricata* Linn. leaves subchronically to MDA levels of aortic tissue and average of aortic thickness from wistar rats.

Method: *In vivo* laboratory experimental studies using *posttest only control* design with 20 male wistar rats and 20 female wistar rats divided into two large groups, four groups of male and four female. The male and female groups were given the same treatment, the normal group (KN), first treatment (essential oil dose 1.25 mg/kgBB), second treatment (essential oil dose 2.5 mg/kgBB), and third treatment (essential oil dose 5 mg/kgBB). This study was conducted for 28 days orally. MDA measurements use spectofometer, while the average of aortic thickness using a light microscope with 400x magnification. Data analysis with *One Way ANOVA* test followed by *Least Significant Difference* (LSD) test. The results are significant when $p < 0.05$.

Result: Distribution of essential oil *Annona muricata* Linn. leaf to MDA levels in normal male group did not show significant difference to first treatment group, but normal males group was significantly different with second and third treatment group. In the normal female group showed a significant difference to third treatment group, but between treatment groups did not differ significantly. The result of average aortic wall thickness in all male and female groups showed no significant difference.

Conclusion: An increased dose in the male group may decrease MDA levels, but not in female group. Increased doses in the male and female groups cannot increase the aortic wall thickness.

Keyword: *Annona muricata* Linn., Soursop leaf, essential oil, MDA, aortic wall thickness.

PENDAHULUAN

Berdasarkan laporan dalam *Journal of American Medical Association*, pada tahun 2012 penyakit jantung koroner (PJK) merupakan salah satu penyebab kematian terbanyak. Laporan tahunan menunjukkan bahwa sekitar 300.000 orang yang menderita PJK meninggal dunia. Sedangkan di Indonesia, penderita PJK menunjukkan presentase kematian sebesar 15% dan angka tersebut mengalami peningkatan tiap tahunnya¹. Penyebab utama PJK karena adanya peningkatan lipid dalam plasma, terutama pada kadar kolesterol total. Apabila kadar kolesterol total dibiarkan tinggi didalam darah, dapat mengakibatkan *atherosclerosis* pada pembuluh darah².

Atherosclerosis merupakan penebalan dinding pada pembuluh darah sedang dan besar (aorta) yang

disebabkan oleh penumpukan *Low Density Lipoprotein* (LDL)³. LDL yang menumpuk di dalam jaringan akan teroksidasi melalui proses lipid peroksidase yang nantinya akan menghasilkan *Malondialdehyde* (MDA) jaringan⁴. Penumpukan LDL juga menyebabkan disfungsi endotel, endotel yang rusak memiliki adhesivitas yang tinggi terhadap monosit yang akan berdiferensiasi menjadi makrofag. Makrofag bertugas memfagosit LDL yang teroksidasi sehingga terbentuk *foam cell*. Selain itu, juga menyebabkan proliferasi otot polos pada tunika intima meningkat. Otot polos memproduksi matriks ekstraseluler berupa kolagen, elastin dan proteoglikan⁵. Penumpukan *foam cell* dan matriks ekstraseluler dapat memicu pembentukan *fibrous plaque*. *Fibrous plaque* akan menyebabkan penyempitan pembuluh darah.

Selama ini, masih sedikit obat generic maupun alternative yang dapat mengatasi *atherosclerosis*. Beberapa obat memberi dampak positif terhadap *atherosclerosis*, akan tetapi memiliki resiko efek samping yang tinggi. Sirsak (*Annona muricata* Linn.) memiliki potensi sebagai antioksidan dengan efek samping yang rendah. Menurut Owlabi kandungan *sesquiterpen* (38,9%) pada bagian daun memiliki fungsi sebagai antioksidan yang potensial⁶. Meskipun herbal telah dinyatakan berpotensi sebagai antioksidan, tetapi perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melihat keamanan penggunaan minyak atsiri daun sirsak secara subkronis⁷. Karena sirsak merupakan salah satu tanaman herbal yang biasa dimanfaatkan sebagai pengobatan alternatif oleh masyarakat⁸.

Penelitian Fidianingsih dan Handayani menunjukkan daun sirsak memiliki keunggulan dalam menghambat proliferasi sel T47D dibandingkan dengan buah dan bijinya dengan nilai 50% *Inhibition Concentration* (IC50) pada sel kanker⁹. Kandungan kimia yang terdapat pada daun sirsak antara lain, alkaloid, minyak atsiri, flavonol triglikosida, fenolik, dan siklopeptida¹⁰.

Penelitian uji toksisitas pada daun sirsak sudah pernah dilakukan oleh beberapa peneliti pada tingkat akut. Dengan pemberian *aqueous extracts* dan dekoka minyak atsiri daun sirsak menunjukkan pengaruh yang belum dikategorikan toksik¹¹. Menurut Loomis zat dikatakan toksik apabila LD₅₀ antara 51-500 mg/kg, akan tetapi penelitian sebelumnya mendapatkan hasil LD₅₀ > 5000 mg/kg¹². Untuk mengetahui dosis toksik, uji pendahuluan toksisitas akut juga dilakukan dengan 5 dosis yang berbeda. Berdasarkan kriteria penentuan dosis LD₅₀ menurut Loomis, pemberian minyak atsiri secara peroral pada tingkat akut disarankan dilakukan pada mencit. Uji toksisitas akut ini tidak menunjukkan adanya kematian atau kerusakan organ pada mencit.

Berdasarkan uraian diatas, uji toksisitas subkronik minyak atsiri daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) masih sedikit informasi dari penelitian yang dilakukan sebelumnya. Sehingga, peneliti ingin mengetahui pengaruh pemberian minyak atsiri daun sirsak secara subkronik dengan cara pengukuran kadar MDA jaringan aorta dan pengamatan ketebalan aorta yang diberikan per oral selama 28 hari pada tikus wistar jantan dan betina normal.

M E T O D E P E N E L I T I A N

Kelayakan Etik

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari komisi etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran

Universitas Brawijaya dengan nomor sertifikat No.662-KEP-UB tahun 2016.

Desain, Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimental laboratorium yang menggunakan desain penelitian *control group posttest only* secara *in vivo* dengan hewan coba tikus strain wistar jantan dan betina normal yang diberi perlakuan. Penelitian telah dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Putra Indonesia Malang, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang, dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang pada bulan Maret-April 2017.

Subjek Penelitian

Hewan coba pada penelitian ini menggunakan tikus wistar (*Rattus norvegicus*) berjenis kelamin jantan dan betina, usia 11-16 minggu dengan berat badan 100-200 gram, berbadan sehat ditandai dengan gerakan aktif, tidak cacat, bermata merah jernih, bulu halus dan tidak mudah rontok, khusus tikus wistar betina tidak boleh hamil dan belum pernah melahirkan. Hewan coba berjumlah total 40 ekor tikus, dibagi menjadi dua kelompok besar yaitu kelompok jantan dan betina. Tiap kelompok terdiri dari 20 ekor tikus jantan dan 20 ekor tikus betina dengan pembagian satu kelompok normal dan 3 kelompok perlakuan secara acak (*simple random sampling*), yaitu kelompok normal (KN, aquades+tween 0.2 cc), kelompok perlakuan 1 (P1, minyak atsiri dosis 1.25 mg/kgBB), kelompok perlakuan 2 (P2, minyak atsiri dosis 2.5 mg/kgBB), dan kelompok perlakuan 3 (P3, minyak atsiri dosis 5 mg/kgBB). Tiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus yang diadaptasi selama 7 hari di laboratorium, kemudian diberi perlakuan pemberian minyak atsiri selama 28 hari. Tikus ditempatkan pada *single cage*, diberikan pakan dan minum standar laboratorium.

Pembuatan Minyak Atsiri Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.)

Daun sirsak yang digunakan adalah simplisia daun kering yang berasal dari Balai Materia Medika Batu dengan nomor sertifikat 074/246/101.8/2016. Simplisia daun sirsak dimasukkan ke dalam *boiler* alat destilasi. Penyulingan minyak atsiri dilakukan dengan destilasi uap air. *Boiler* suling dirangkai dengan kondensor. *Boiler* uap lalu dipanaskan sampai tekanan 1 atm. Uap yang telah dihasilkan akan disalurkan melalui selang yang terhubung dengan *boiler* suling. Air dialirkan pada kondensor dan dijaga supaya air mengalir terus, sehingga minyak yang menguap terembunkan dan tidak ada yang terlepas ke udara. Hasil destilasi adalah minyak atsiri yang belum murni,

yaitu minyak dan air. Keduanya ini yang akan dipisahkan dalam corong pisah. Pemisahan sempurna dengan menambahkan n-heksana yang berfungsi sebagai pengikat minyak. Setelah air dan minyak terpisah, masing-masing ditampung ke dalam tabung erlenmeyer. Kemudian bagian minyak diuapkan dengan evaporator pada suhu 45°C untuk menguapkan n-hexana sehingga tersisa minyak atsiri murni¹³.

Pembuatan Suspensi Minyak Atsiri Daun Sirsak

Minyak Atsiri daun sirsak dengan dosis 1.25 mg/kgBB, 2.5 mg/kgBB, dan 5 mg/kgBB diperoleh dari perhitungan $V_{1M} = V_{2M} \cdot 2$. Hasil yang didapatkan kemudian dilarutkan dalam tween 80 dan aquades hingga 50 ml.

Pemberian minyak atsiri daun sirsak 1.25 mg/kgBB, 2.5 mg/kgBB, dan 5 mg/kgBB diberikan secara peronde lambung kepada kelompok perlakuan jantan dan betina setiap sore hari selama 28 hari.

Pembedahan dan Pengambilan Sampel Hewan Coba

Pembedahan hewan coba diawali dengan cara tikus diinjeksi ketalar 50mg/KgBB hingga terbius, kemudian tikus dibedah mengikuti linea mediana dari abdomen menuju thorak dengan gunting sampai seluruhnya terbuka. Saat sampai perbatasan abdomen dengan thoraks, diafragma dipotong dan dilepas untuk memudahkan pengambilan organ¹⁴. Setelah itu, organ yang diambil dibersihkan dengan NaCl. Tikus yang telah di *sacrifice* akan dilakukan proses penguburan dengan diameter sumur 25 cm x 25cm x 50 cm untuk setiap kelompok sebanyak 6 ekor. Penguburan dilakukan di Hutan daerah Perumahan Tidar.

Pemeriksaan Kadar MDA Jaringan Aorta

Organ aorta ditimbang sebanyak 500 µg kemudian digerus sampai halus. Tambahkan 0.5 ml pereaksi TCA 20% lalu sentrifus pada 3000 rpm selama 5 menit. Pisahkan 1 ml supernatant dan dicampur 1 ml larutan TBA 0.67%. Kemudian Panaskan dalam penangas air (100°C) selama 10 menit dan dinginkan pada suhu kamar. Serapan diukur dengan spektrofometer pada panjang gelombang 530 nm. Kadar MDA dihitung dengan menggunakan kurva standart yang dibuat dengan mereaksikan TEP (Tetraetoksipropan). Spektrofometer akan menghasilkan nilai absorben yang akan dikonversi kedalam konsentrasi MDA (nmol/ml).

Pemeriksaan Rata-rata Ketebalan Aorta

Pemeriksaan ketebalan aorta ditentukan dengan cara pemrosesan jaringan dan pembuatan blok paraffin, sesuai standart pemeriksaan histopatologi.

Lalu dilakukan prosedur pengecatan HE (*Hematoxilin eosin*). Pemeriksaan dengan mikroskop trinokuler Olympus perbesaran 400x. Mengukur ketebalan penampang lintang aorta dari tunika intima sampai tunika adventisia pada 8 zona (arah jarum jam 12.00, 13.30, 15.00, 16.30, 18.00, 19.30, 21.00, dan 22.30).

Analisa Data

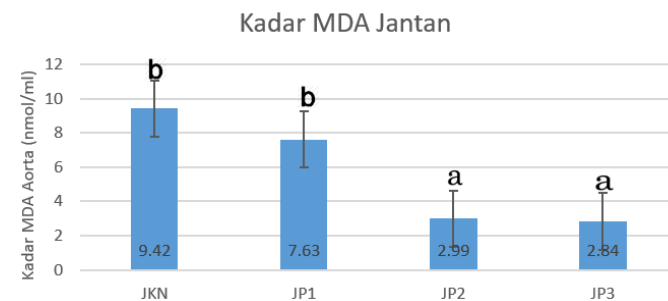
Data yang diperoleh dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Setelah terdistribusi normal dan homogen, data kadar MDA jaringan aorta dan rata-rata ketebalan aorta dianalisis dengan menggunakan uji *One Way ANOVA* kemudian dilanjutkan dengan *post hoc test* menggunakan *Least Significant Difference (LSD)* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Uji komputerisasi menggunakan program SPSS versi 23.

HASIL PENELITIAN

Kelompok	Jantan				Betina			
	Kontrol	P1	P2	P3	Kontrol	P1	P2	P3
Hewan	Tikus	Tikus	Tikus	Tikus	Tikus	Tikus	Tikus	Tikus
Coba	Wistar	Wistar	Wistar	Wistar	Wistar	Wistar	Wistar	Wistar
BB awal ±	162±	177,8±	181,6±	178,2±	108,8±	120,8±	119,6±	113,6±
SD (gram)	12,4	21,8	11,1	16,3	11,6	19,6	15,6	18,7
BB akhir ±	194±	202±	199,2±	220,4±	141,4±	148,6±	148,8±	144,4±
SD (gram)	9,9	32,3	24,6	27,6	10,9	23,12	14	13,3
Usia Awal	11-16 minggu	11-16 minggu	11-16 minggu	11-16 minggu	11-16 minggu	11-16 minggu	11-16 minggu	11-16 minggu
Lama Adaptasi	1 minggu	1 minggu	1 minggu	1 minggu	1 minggu	1 minggu	1 minggu	1 minggu
Usia Akhir	16-21 minggu	16-21 minggu	16-21 minggu	16-21 minggu	16-21 minggu	16-21 minggu	16-21 minggu	16-21 minggu
Pemberian Aquades + tween 2cc	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Dosis Ekstrak Minyak Atsiri Daun Sirsak(mg/kgBB)	-	1,25	2,5	5	-	1,25	2,5	5
Jumlah Tikus	5 ekor	5 ekor	5 ekor	5 ekor	5 ekor	5 ekor	5 ekor	5 ekor

Tabel 1. Karakteristik Populasi

Pengaruh Pemberian Minyak Atsiri Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap Kadar MDA Jaringan Aorta Tikus Wistar Jantan



Gambar 1. Histogram rata-rata kadar MDA jaringan aorta tikus wistar jantan

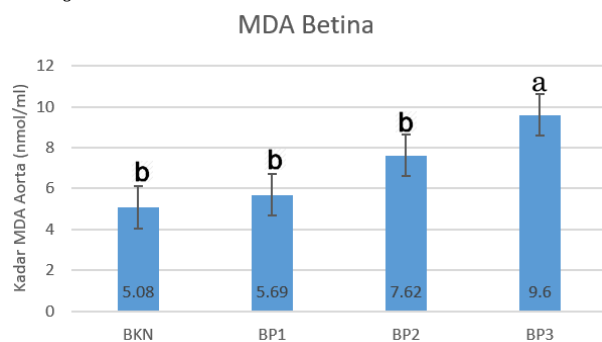
Keterangan:

Gambar 1 menunjukkan Histogram rata-rata kadar MDA jaringan aorta tikus wistar jantan. Rata-rata data

pada tiap kelompok ($\text{mean} \pm \text{SD}$) JKN (9.42 ± 0.57), JP1 (7.63 ± 0.45), JP2 (2.99 ± 0.25), dan JP3 (2.84 ± 0.56). a (berbeda signifikan dibanding normal), b (tidak berbeda signifikan dibanding normal maupun antar dosis).

Gambar 1 menunjukkan hasil MDA tikus wistar jantan yang diberikan minyak atsiri daun sirsak. Pada kelompok JKN tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap kelompok JP1. Tetapi kelompok JP2 dan JP3 menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$) dibandingkan kelompok JKN. Data antar dosis perlakuan, kelompok JP1 menunjukkan perbedaan yang signifikan dibanding kelompok perlakuan yang lain (JP2 dan JP3).

Pengaruh Pemberian Minyak Atsiri Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap Kadar MDA Jaringan Aorta Tikus Wistar Betina



Gambar 2. Histogram rata-rata kadar MDA jaringan aorta tikus wistar betina

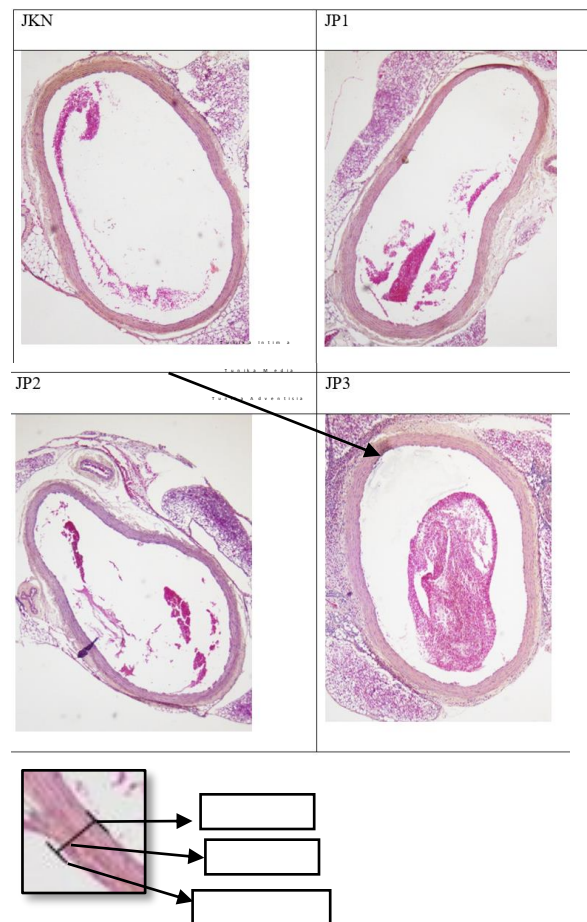
Keterangan:

Gambar 2 menunjukkan Histogram rata-rata kadar MDA jaringan aorta tikus wistar betina. Rata-rata data pada tiap kelompok ($\text{mean} \pm \text{SD}$) BKN (5.08 ± 1.94), BP1 (5.69 ± 2.08), BP2 (7.62 ± 2.34), dan BP3 (9.6 ± 1.79). a (berbeda signifikan dibanding normal), b (tidak berbeda signifikan dibanding normal maupun antar dosis).

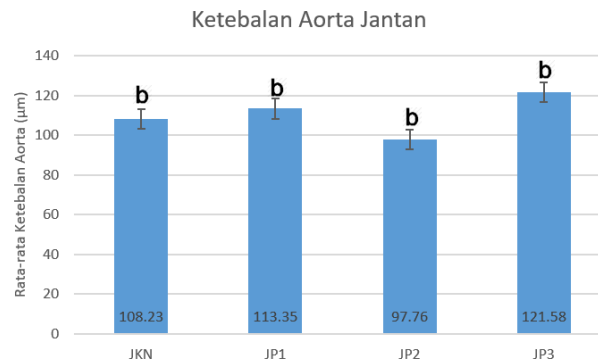
Gambar 2 menunjukkan hasil MDA tikus wistar betina yang diberikan minyak atsiri daun sirsak. Pada kelompok BKN, BP1, dan BP2 menunjukkan hasil yang meningkat tetapi tidak berbeda signifikan. Kelompok BP3 menunjukkan perbedaan yang signifikan dibandingkan kelompok BKN. Tetapi pada antar perlakuan tidak berbeda signifikan terhadap peningkatan dosis.

Pengaruh Pemberian Minyak Atsiri Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap Rata-rata Ketebalan Dinding Aorta Tikus Wistar Jantan

Berdasarkan pengamatan histopatologi jaringan aorta, didapatkan ketebalan dinding aorta seperti dibawah ini:



Gambar 3. Preparat jaringan aorta tikus wistar jantan yang dicat dengan pewarnaan *Hematoxilin eosin* dengan pembesaran 400x pada setiap kelompok.



Gambar 4. Histogram Rata-rata Ketebalan Dinding Aorta Tikus Wistar Jantan

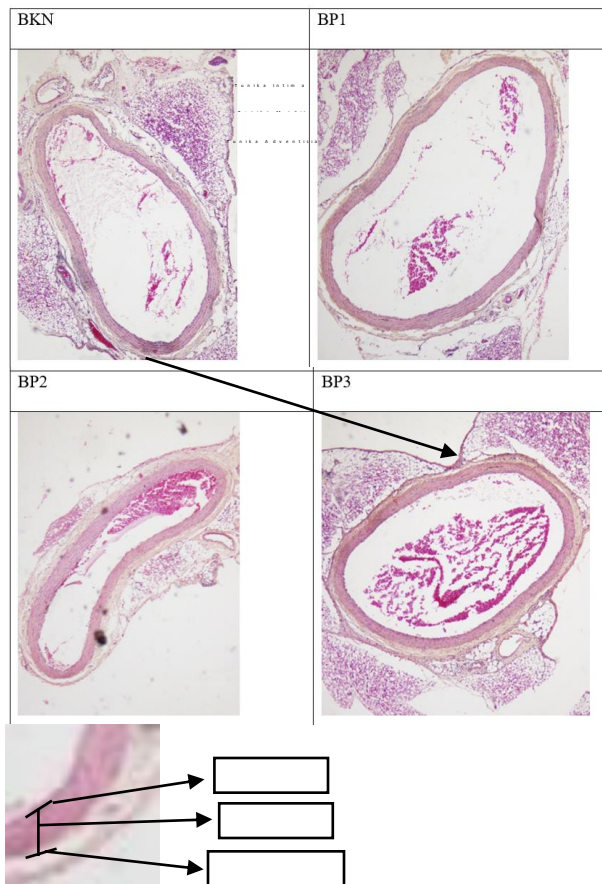
Keterangan:

Gambar 4 menunjukkan Histogram rata-rata ketebalan dinding aorta tikus wistar jantan. Rata-rata data pada tiap kelompok ($\text{mean} \pm \text{SD}$) JKN (108.23 ± 11.37), JP1 (113.35 ± 9.16), JP2 (97.76 ± 10.88), dan JP3 (121.58 ± 9.31). b (tidak berbeda signifikan dibanding normal maupun antar dosis).

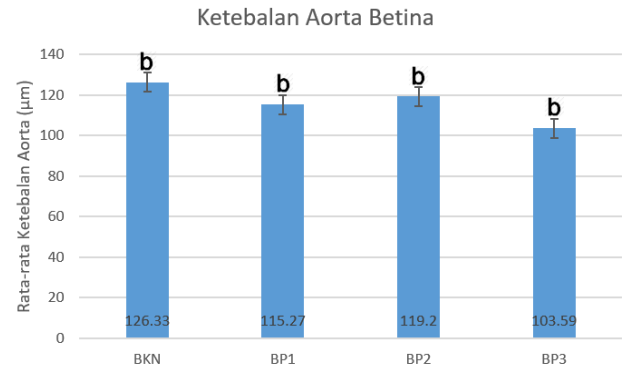
Gambar 4 menunjukkan hasil rata-rata ketebalan aorta tikus wistar jantan yang diberikan minyak atsiri daun sirsak. Pada semua kelompok perlakuan (JP1, JP2, dan JP3) tidak berbeda signifikan dibandingkan kelompok JKN. Kelompok perlakuan antar dosis terdapat kelompok yang mengalami peningkatan tetapi tidak berbeda signifikan. Dibuktikan pada kelompok JP3 yang mengalami peningkatan dari kelompok JP2.

Pengaruh Pemberian Minyak Atsiri Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap Rata-rata Ketebalan Dinding Aorta Tikus Wistar Betina

Berdasarkan pengamatan histopatologi jaringan aorta, didapatkan ketebalan dinding aorta seperti dibawah ini:



Gambar 5. Preparat jaringan aorta tikus wistar betina yang dicat dengan pewarnaan *Hematoxilin eosin* dengan pembesaran 400x pada setiap kelompok.



Gambar 6. Histogram rata-rata ketebalan dinding aorta tikus wistar betina.

Keterangan:

Gambar 6 menunjukkan Histogram rata-rata ketebalan aorta tikus wistar betina. Rata-rata data pada tiap kelompok ($\text{mean} \pm \text{SD}$), BKN (126.33 ± 21.92), BP1 (115.27 ± 13.91), BP2 (119.2 ± 39.53), dan BP3 (103.59 ± 11.17). b (tidak berbeda signifikan dibanding normal maupun antar dosis).

Gambar 6 menunjukkan hasil rata-rata ketebalan aorta tikus wistar betina yang diberikan minyak atsiri daun sirsak. Pada semua kelompok perlakuan (BP1, BP2, dan BP3) tidak berbeda signifikan dibandingkan dengan kelompok BKN. Pada antar dosis, kelompok BP3 mengalami penurunan ketebalan dan tidak signifikan dibandingkan kelompok BKN.

PEMBAHASAN

Karakteristik Populasi

Penelitian ini berdasar pada ketentuan dan syarat yang telah ditetapkan oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) RI⁷. Prasyarat sebelum melakukan uji pengaruh pemberian minyak atsiri daun sirsak ini harus melakukan penelitian pendahuluan terlebih dahulu. Uji pendahuluan dilakukan untuk menentukan dosis awal yang akan digunakan pada uji pengaruh pemberian minyak atsiri pada wistar.

Pada penelitian ini, hewan coba yang digunakan adalah jenis tikus wistar putih (*Rattus norvegicus*) jantan dan betina sesuai dengan kriteria yang ditentukan. Kriteria yang harus dipenuhi seperti tikus berusia sekitar 11-16 minggu, dengan berat badan antara 120-170 gram, dengan kondisi tubuh yang sehat, ditandai dengan gerakan yang aktif, memiliki ciri bulu bersih dan tidak gampang rontok, mata jernih berwarna merah. Adapun syarat khusus yang ditujukan untuk tikus wistar berkelamin betina, yaitu tidak boleh dalam kondisi hamil serta belum pernah

melaahirkan. Tikus wistar merupakan salah satu hewan coba yang mudah didapatkan dan dikembangkan biakkan. Keuntungan lainnya, tikus ini sudah lama digunakan sebagai hewan coba dalam uji toksisitas maupun yang sejenisnya. Jadi sudah terbiasa dengan kondisi laboratorium dan berbagai perlakuan, serta mempunyai sensitivitas yang tinggi terhadap obat. Pemilihan umur 11-16 minggu dilakukan dengan tujuan bahwa tikus sudah mencapai umur dewasa, sedangkan berat badan dapat memberi gambaran bahwa tikus tersebut sehat secara fisik¹⁵. Tikus yang digunakan berjenis kelamin jantan dan betina dikarenakan syarat dari BPOM dan tujuan lainnya untuk mengetahui adanya perbedaan pengaruh hormon terhadap metabolisme minyak atsiri daun sirsak di jaringan Aorta yang dilihat dari peningkatan MDA jaringan dan rata-rata ketebalan dinding aorta tikus.

Faktor penting agar tidak timbul bias terlalu besar adalah faktor psikis dan lingkungan tikus. Oleh karena itu, penelitian ini mengusahakan tikus tersebut nyaman dikandang dan tidak mengganggu psikisnya. Agar hal tersebut dapat tercapai, tikus wistar akan diadaptasi selama 7 hari, tiap tikus diberikan kandang sendiri dengan tujuan agar tidak terjadi kepanikan dan menghindari perkeltahan antar tikus yang akan mengakibatkan tikus masuk dalam kondisi stress¹⁶. Tikus yang diadaptasi akan diberikan makan dan minum secara rutin 2 kali sehari, serta dilakukan pergantian sekam sekitar 3 hari sekali.

Pemberian perlakuan pada penelitian ini dilakukan dengan cara penyondean langsung ke gaster tikus, dengan takaran 1 ml ekstrak minyak atsiri daun sirsak, diberikan selama 28 hari pada sore hari, dengan varian dosis sesuai kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan dibagi menjadi 3 kelompok jantan dan 3 kelompok betina, dengan dosis 1.25 mg/kgBB (perlakuan 1), 2.5 mg/kgBB (perlakuan 2), dan 5 mg/kgBB (perlakuan 3). Ketentuan dosis yang digunakan berdasarkan penelitian pendahuluan akut pada mencit jantan dan betina yang diberikan minyak atsiri daun sirsak. Berdasarkan hasil uji pendahuluan tidak didapatkan LD 50 pada dosis 7.5 mg/kgBB. Akan tetapi terdapat peningkatan laju nafas pada dosis 1.25 mg/kgBB. Dengan adanya rata-rata peningkatan pernafasan pada mencit, diambil kesimpulan bahwa dosis 1.25 mg/kgBB memberikan efek kerusakan pada organ. Sehingga ditentukan pada penelitian subkronis dengan dosis 1.25 mg/kgBB, 2.5 mg/kgBB, dan 5 mg/kgBB.

Metode sonde merupakan metode yang paling optimal agar minyak atsiri dapat masuk melalui saluran pencernaan dan melalui proses absorpsi serta

dosis yang diberikan pada tiap tikus bisa dianggap sama rata. Kekurangan dari metode sonde salah satunya karena dipaksa cairan untuk masuk ke dalam gaster dengan volume tertentu tanpa mengetahui isi dari gaster sebelumnya sehingga dapat menimbulkan muntah pada tikus serta resiko terjadi aspirasi dan stress saat tikus disondekan¹⁷. Dengan begitu hasil yang didapatkan dari penelitian diharapkan mampu menggambarkan pengaruh minyak atsiri daun sirsak terhadap kadar MDA aorta dan ketebalan rata-rata dinding aorta pada tikus wistar jantan dan betina.

Pengaruh Pemberian Minyak Atsiri Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap Kadar MDA Jaringan Aorta Tikus Wistar Jantan

Hasil penelitian menunjukkan pada tikus wistar jantan, kadar MDA kelompok normal (JKN) tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap perlakuan 1 (JP1). Akan tetapi, JP2 dan JP3 menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$) terhadap JKN. MDA (*Malondialdehyde*) merupakan proses peroksidasi lipid yang dapat bersifat merusak sel¹⁸. Semakin banyak kadar MDA didalam jaringan, maka semakin banyak pula proses kerusakan sel yang terjadi akibat radikal bebas dari pemberian minyak atsiri. Sebaliknya, semakin sedikit kadar MDA dalam jaringan, maka proses perbaikan sel-sel yang rusak dan regenerasi sel-sel yang mati semakin baik. Ditunjukkan pada subjek penelitian kelompok JP2 dan JP3 mengalami penurunan kadar MDA yang signifikan dibandingkan JKN. Penurunan kadar MDA dapat terjadi karena dosis yang diberikan pada tubuh dapat diterima dengan baik sebagai antioksidan eksogen¹⁹. Menurut hasil penelitian ini, dengan pemberian minyak atsiri dosis JP2 dan JP3 secara rutin, dapat meningkatkan produksi antioksidan dalam tubuh.

Hasil penelitian menunjukkan semakin tinggi dosis minyak atsirinya memberikan penurunan pada kadar MDA jaringan aorta. Tetapi penemuan MDA pada kelompok JP1 tidak turun terlalu banyak. Kemungkinan dosis yang terlalu rendah belum bisa mengatasi radikal bebas yang ada dalam jaringan. Juga dapat disebabkan oleh dosis yang diberikan kepada tikus belum dapat memberikan efek fisiologis maupun patologis pada metabolisme tikus jantan. Dosis tersebut masih dapat dikompensasi oleh tubuh dan akhirnya larut dalam proses metabolisme xenobiotik tubuh. Metabolisme xenobiotik merupakan mekanisme kompensasi tubuh terhadap benda asing, salah satunya adalah minyak atsiri. Minyak atsiri berdosisi rendah yang diterima oleh tubuh akan dikonversi dari senyawa lipofilik menjadi hidrofilik. Yang nantinya akan dibantu oleh glutathione untuk mengubah minyak atsiri dosis rendah agar menjadi

senyawa toksik. Senyawa yang bersifat toksik akan dapat membahayakan tubuh dan harus segera diekskresikan²⁰.

Stephen O. dan John A berdasar penelitiannya menjelaskan bahwa ekstrak daun sirsak dapat meningkatkan aktifitas enzim antioksidan dalam jaringan²¹. Terpenoid merupakan kandungan paling dominan yang dimiliki oleh daun sirsak. Kandungan aktif ini dapat mengurangi ROS (*reactive oxygen species*) dalam jaringan. ROS merupakan salah satu jenis radikal bebas yang dihasilkan dari molekul oksigen yang mengalami penambahan satu elektron. Secara fisiologi, radikal bebas akan diproduksi oleh jaringan sekitar selama proses metabolisme dan induksi system imun²². Apabila radikal bebas masih dalam batas normal, maka akan dapat ditangani oleh antioksidan yang dihasilkan oleh jaringan tersebut. Hasil penelitian kelompok JP2 dan JP3 menunjukkan penurunan MDA secara signifikan yang artinya bahwa kandungan terpenoid dalam minyak atsiri daun sirsak terbukti sebagai antioksidan yang potensial²³.

Pengaruh Pemberian Minyak Atsiri Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap Kadar MDA Jaringan Aorta Tikus Wistar Betina

Pada kelompok betina, kadar MDA jaringan aorta berbeda dari MDA tikus jantan. Hasil MDA betina cenderung berbanding terbalik dengan yang jantan. Kadar MDA betina rata-rata mengalami kenaikan setelah dilakukan pemberian dosis. Akan tetapi tidak semua kenaikan tersebut berbeda signifikan ($p < 0.05$). Perbedaan yang signifikan hanya ditunjukkan oleh kelompok Normal (BKN) dengan kelompok perlakuan 3 (BP3, dosis 5 mg/kgBB). Sedangkan kelompok lain tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Dosis kelompok BP1 dan BP2 tidak memberikan efek disebabkan pemberian dosis masih belum mengakibatkan akumulasi radikal bebas dalam jaringan. Pada tikus betina, estrogen berperan penting dalam proses pembentukan antioksidan endogen didalam jaringan²⁴. Seharusnya dengan adanya bantuan aktifitas hormon estrogen, produksi antioksidan didalam tubuh semakin meningkat. Antioksidan yang diaktifasi oleh estrogen adalah jenis *Glutation Peroksidase* (GSH). GSH ini merupakan golongan antioksidan non-enzimatis yang dapat mendetoksifikasi H₂O₂ dan lipid peroksida dengan mengkatalis enzim GPx (*Glutation Peroksidase*)²⁵.

Hasil MDA jaringan pada tikus betina ini berbeda dengan teori yang ada. Masih banyak kemungkinan yang menyebabkan hasil penelitian tersebut seperti ini. Pemilihan usia tikus rata-rata 12 minggu, bagi tikus wistar yang berjenis kelamin betina, kemungkinan masih terlalu muda. Tetapi tikus pada usia tersebut sudah memasuki masa *estrous*. Seharusnya ovarium

pada tikus sudah dapat bekerja secara optimal²⁶. Katalinic menyebutkan bahwa tikus wistar betina memiliki kelebihan dalam memproduksi antioksidan jenis GSH dibanding tikus jantan²⁴.

Borras juga menyebutkan, perbedaan kadar MDA jantan dan betina memang berbanding terbalik dengan teori yang ada. Seharusnya estrogen dapat mengaktifasi antioksidan endogen dan memproduksi antioksidan lebih banyak daripada tikus jantan²⁷. Diperkuat oleh penelitian Samesh, yang menyatakan bahwa radikal bebas meningkat secara signifikan pada mencit betina dibanding jantan. Akan tetapi diukur melalui radikal bebas yang ada di otak mencit²⁸. Sehingga dapat diperkirakan radikal bebas juga meningkat di organ lain seperti jaringan aorta pada tikus betina.

Hesty²⁹ menyebutkan dalam penelitiannya, apabila tikus wistar betina diberikan zat yang berpotensi sebagai *endocrine disruptors* maka akan mengakibatkan terganggunya metabolisme tubuh terutama sistem reproduksi. Hasilnya menunjukkan adanya peningkatan MDA pada tikus wistar betina diiringi dengan penurunan alami estrogen (17 β -estradiol). Pada hasil penelitian didapatkan kadar MDA yang meningkat, menandakan bahwa minyak atsiri yang diberikan dapat mengganggu sistem endokrin pada tikus wistar betina. Efek yang diberikan adalah penurunan produksi estrogen, dimana estrogen adalah antioksidan endogen yang dapat membantu mengatasi radikal bebas didalam tubuh.

Pengaruh Pemberian Minyak Atsiri Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap Rata-rata Ketebalan Dinding Aorta Tikus Wistar Jantan

Rata-rata ketebalan dinding aorta tikus wistar jantan kelompok JP1, JP2, dan JP3 tidak berbeda signifikan ($p > 0.05$) dibandingkan JKN. Pada perlakuan antar dosis hanya menunjukkan adanya peningkatan akan tetapi tidak dapat dikatakan berbeda signifikan. Dibuktikan pada kelompok JP3 yang mengalami peningkatan dari JP2. Hal ini dapat terjadi karena aorta merupakan pembuluh darah paling besar didalam tubuh, struktur ketebalan dindingnya menyesuaikan dengan aliran darah yang lewat. Semakin tebal struktur dindingnya, maka semakin baik pertahanan yang ada didalamnya³⁰. Letak pengambilan sampel aorta berada pada bagian aorta abdominalis. Menurut Price aorta abdominalis merupakan salah satu tempat paling sering dari pembentukan plak *atherosclerosis*. Tetapi pada hasil tidak menunjukkan adanya penebalan dinding aorta yang disebabkan oleh plak³¹. Sehingga pemberian dosis pada penelitian ini masih belum memberi pengaruh kerusakan terhadap dinding aorta.

Penelitian Kumar menyatakan, apabila zat aktif minyak atsiri dapat merusak struktur dinding aorta, maka dapat mengakibatkan munculnya berbagai faktor proinflamasi³². Kerusakan dinding aorta dapat mengaktifasi reseptor adrenergik yang akan merangsang perubahan ekspresi molekul sel adhesi yang menempel pada sel endotel aorta. Ekspresi ini dapat memicu terjadinya disfungsi endotel. Dinding aorta yang mengalami disfungsi endotel akan menyebabkan migrasi dan proliferasi otot polos dalam tunika intima. Otot polos yang terproliferasi akan memproduksi matriks ekstraseluler dalam jumlah besar. Akumulasi matriks ekstraseluler ini akan menyebabkan penebalan dinding aorta⁵. Tetapi pada hasil ini didapatkan semua kelompok perlakuan tidak mengalami peningkatan secara signifikan, hanya pada dosis tertinggi yang mengalami peningkatan dan tidak signifikan. Dapat disimpulkan bahwa dosis yang diberikan ini tidak dapat dikatakan toksik.

Apabila ditinjau dari kandungannya, terpenoid pada minyak atsiri daun sirsak memiliki kadar yang paling tinggi dibandingkan yang lain. Menurut Dayang dkk. terpenoid memiliki daya yang kuat sebagai vasodilator. Peran terpenoid adalah sebagai pemicu sel endotel untuk mengaktifasi terbukanya kanal Kalium³³. Dengan adanya aktifitas dilatasi sel endotel, seharusnya semakin banyak dosis yang diberikan akan mengurangi ketebalan aorta. Hasil pada tikus jantan tidak menunjukkan hal seperti itu. Semakin tinggi dosis diberikan membuat ketebalan aorta meningkat. Ada beberapa faktor yang dapat menyebabkan hal tersebut bisa terjadi. Diduga pada saat dilakukan persondean, cairan yang harusnya masuk ke gaster dimuntahkan kembali oleh tikus. Bisa juga karena proses absorbsi tikus yang kurang sempurna menjadikan efek yang ditimbulkan tidak sesuai teori yang ada. Bahkan bisa karena dosis minyak atsiri yang diberikan masih belum cukup untuk memunculkan efek toksik ataupun terapinya.

Pengaruh Pemberian Minyak Atsiri Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap Rata-rata Ketebalan Dinding Aorta Tikus Wistar Betina

Pada kelompok betina, kadar MDA BP1, BP2, dan BP3 tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p > 0.05$) dibandingkan kelompok BKN. Tetapi pada tikus betina dengan pemberian dosis tertinggi (BP3, dosis 5 mg/kgBB) memberikan efek penurunan ketebalan aorta. Hal ini berbanding terbalik dengan hasil yang ada pada tikus jantan. Diduga karena tikus betina memiliki estrogen yang dapat mempengaruhi metabolisme didalam tubuh. Jenis estrogen yang paling banyak beredar didalam aliran

darah adalah estradiol³⁴. Penelitian yang dilakukan Nurdiana dkk menyatakan bahwa tikus yang diinduksi 17 β -estradiol jangka pendek maupun jangka panjang dapat meningkatkan aliran darah di perifer. Pada percobaan tikus yang diangkat ovariumnya, lalu diberikan estradiol jangka panjang menunjukkan adanya penurunan kontraktilitas aorta. Kontraktilitas aorta secara langsung diatur oleh saraf simpatis yang berikatan dengan α -adrenergik. Reseptor α -adrenergik berada di otot polos pembuluh darah. Secara tidak langsung apabila pemberian minyak atsiri menimbulkan efek toksik, maka estrogen memiliki peran dalam menurunkan kontraktilitas otot polos aorta¹⁴.

KESIMPULAN

1. Peningkatan dosis pada kelompok jantan dapat menurunkan kadar MDA, namun tidak pada kelompok betina.
2. Peningkatan dosis pada kelompok jantan dan betina tidak dapat meningkatkan rata-rata ketebalan dinding aorta.

SARAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan untuk menunjang pengembangan dan kemajuan ilmu pengetahuan dibidang kedokteran, peneliti menyarankan:

1. Diperlukan penelitian awal tentang kandungan minyak atsiri sebelum dipergunakan untuk penelitian.
1. Diperlukan penelitian lanjutan, secara kronik untuk mengetahui efek lebih lanjut dari minyak atsiri daun sirsak.
2. Diperlukan penelitian tentang hubungan kadar MDA tikus wistar betina dengan kadar hormon estrogen.
3. Diperlukan penelitian pendahuluan tentang dosis minyak atsiri daun sirsak yang sudah memiliki efek terapis atau dosis toksik.
4. Disarankan untuk menambahkan jumlah minimal sampel yang akan diukur. Agar dapat dilakukan uji statistic perbandingan hasil antara jantan dan betina, yaitu minimal 6 sampel.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada pembimbing, penguji, kelompok sirsak, dan Ikatan Orang Tua Mahasiswa (IOM) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Centers for Disease Control and Prevention. *CDC in Indonesia*. 2012. Diakses pada tanggal 26 Desember 2017 pukul 01.04 WIB. <http://www.cdc.gov/heartdisease/coronary-ad.htm>.
2. Metabolic Institute of America. *Dyslipidemia*. 2013. Diakses pada tanggal 26 Desember 2017 pukul 01.06 WIB. <http://www.themetaboliccenter.com/dyslipidemia.php>.
3. Srinivasa, P.V.L.N dan Kiranmayi, V.S. *Biochemical Mechanism Underlying Atherogenesis*. J Clin Sci Res, 1:24-34. 2012.
4. Asni, E., Harahap I.P., Wanandi S.I., Jusman S.W.A., dan Sadikin M. *Pengaruh Hipoksia Berkelanjutan terhadap Kadar Malondialdehyde, Glutation Tereuksi, dan Aktivitas Katalase Ginjal Tikus*. Maj. Kedokteran Indonesia, 59(12):595-600. 2009.
5. Grassi D, Giovambattista D dan Claudio F. *Flavonoids: Antioxidants Against Atherosclerosis*. Department of Internal Medicine and Public Health, University of L'Aquila, L'Aquila: Italy. 2(8):889-902. 2010.
6. Owolabi, Moses S. *et al. The cytotoxic activity of Annona muricata leaf oil from Badagary, Nigeria*. American Journal of Essential Oils and Natural Products, Vol. 1, No.: Hal. 1-3. 2013.
7. Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia (BPOM RI). Info POM. Vol. XI, No. 4. Jakarta Pusat : Pusat Informasi Obat dan Makanan. 2010.
8. Suranto, A. *Dahsyatnya Sirsak tumpas penyakit*. Pustaka Bunda, Jakarta. 2011.
9. Fidianingsih I., dan Handayani ES. *Annona muricata aqueous extract suppresses T47D breast cancer cell proliferation*. Univ Medicina; 33(1):19-26. 2014.
10. Moghadamtousi SZ, Fadeinasab M, Nikzad S, Mohan G, Ali HP, Kadir HA. *Annona muricata (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities*. Int. J. Mol. Sci. 16: 15625-15658. 2015.
11. Sousa OV, Vieira GDV, Pinho JJRG, Yamamoto CH, Alves MS. *Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Ethanol Extract of Annona muricata L. Leaves in Animal Models*. Int. J. Mol. Sci.; 11: 2067-2078. 2010.
12. Bell, P.; Fisher J. & Loomis, R. *Environmental Psychology*, London: W.B. Saunders Company. 1978.
13. Laboratorium Putra Indonesia (LPI) Malang. *Pembuatan Ekstrak Minyak Atsiri*. Malang. 2015.
14. Nurdiana. *The effect of 17 β -estradiol on rat α -adrenergic receptor density and vascular smooth muscle contractility*. Jurnal Kedokteran Brawijaya: Malang; vol. 27(2). 2008.
15. Hairudin. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Jinten Hitam dalam Mencegah Stres Oksidatif Akibat Latihan Olahraga Anaerobik pada Tikus Putih*, Tesis Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Surabaya. 2006.
16. Jannah R, Husni M.A., dan Nursanty R. *Inhibition Test of Methanol Extract from Soursoop Leaf (Annona muricata Linn.) Against Streptococcus mutans Bacteria*. Farmasi Universitas Syiah Kuala. Jurnal Natural; vol. 17, no. 1, hal. 25-30. 2017.
17. Aminah, Mia S. Himawan, Candra. *Bahan-bahan Berbahaya Dalam Kehidupan*. Salamadani, Bandung. 2009.
18. Denise M. *Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methological aspects for malondialdehyde quatification*. Quim: Nova; hal. 169-174. 2009.
19. Setiawan B., dan Suhartono E. *Peroksidasi Lipid dan penyakit terkait stress oksidatif pada bayi premature*. Majalah kedokteran Indonesia; vol. 57(1); hal. 10-14. 2007.
20. Julianti S., Mahreda E.S., Triawanti, dan Suhartono E. *Pengaruh paparan logam cadmium (Cd) terhadap kadar peroksida, kadar malondialdehid, dan kadar metil glikosal pada hati tikus putih*. Enviro Scienteae; vol. 12(1); hal. 43-49. 2016.
21. Adewole Stephen, O and John A. O, Ojewole. *Protective effects of Annona muricata L. (annonaceae) leaf aqueous extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of streptozotocin-treated diabetic rats*. Afr. Journal Traditional, Complementary and Alternative Medicines 6:30-41. 2013.
22. Sarma A.D., Mallick A.R., dan Ghosh A.K. *Free Radicals and their Role in Different Clinical Conditions: an Overview*. Int. Journal of Pharma Sciences and Research; vol; 1(3); hal. 185-192. 2010.
23. Alitonou, G., Fidele P., Philipe S., Felicien A., Chantal M., dan Dominique C.K., *Chemical Composition, Antiradical and Anti-inflammatory Activities of Four Annonae from Benin*. IJPCBS; vol. 3(3); hal. 914-923. 2013.
24. Katalinic, V., D. Modun, T., I. Music and M. Boban. *Gender Differences in Antioxidant Capacity of Rat Tissues Determined by 2,2V-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays*. Elsevier. 140:47-52. 2005.
25. Werdhasari A. *Peran Antioksidan bagi Kesehatan*. Jurnal Biomedik Medisiana Indonesia; vol. 3(2); hal. 59-68. 2014.

26. Sophia A.C., Swaminathan K., Pachade K., dan Subrahmanyam Y.V. *Decolorization and degeneration of H-acid and other dyes using ferrous-hydrogen peroxide system*. Chemosphere, vol.50; hal. 619-625. 2003.
27. Borrás, Consuelo; Gambini, Juan; López-Gruoso, V; Pallardó Raúl; Federico, Viña Jose, *Direct Antioxidant and Protective Effect of Estradiol on Isolated Mitochondria*, Journal homepage Elsevier. 18(02): 205–211. 2010.
28. Samesh, S., Ali., Chengjie, Xiong and Jacint, Lucero. *Gender Differences in Free Radical Homeostasis Duringaging: Shorter-lived Female C57BL6 Mice have Increased Oxidative Stress*, Anatomical Society of Great Britain and Ireland. 5:565-574. 2006.
29. Widowati, H. 2017. *Pengaruh Paparan Sipermetrin peroral terhadap Kadar 17 β estradiol serum dan Malondialdehyde (MDA) Uterus Tikus Betina Galur Wistar (Rattus novergicus)*. Magister thesis, Universitas Brawijaya.
30. Guyton A.C., dan Hall J.E. *Textbook of Medical Physiology*. 13th edition. Philadelphia: Elsevier, Inc., International Edition; chapter 9; hal. 109-122. 2016.
31. Price S.A., Wilson L.M. *Penyakit Jantung Koroner. Dalam: Hartanto H., Susi N., Wulansari P., Maharani D.A. Patofisiologi Konsep Klinis Proses-proses Penyakit*. Edisi 6. Jakarta: EGC; hlm. 1320-1331. 2012.
32. Kumar S., Dwivedi A., dan Pandey A. *In vitro antioxidant, antibacterial, and cytotoxic activity and in vivo effect of Syngonium podophyllum and Eichhornia crassipes leaf extracts on isoniazid induced oxidative stress and hepatic markers*. Biomed Research Int. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/459452>
33. Dayang W. dan Dongbo P. *Taurine prevents ultraviolet B induced apoptosis in retinal ganglion cells*. Journal Cutaneous and Ocular Toxicology, vol. 37, issue 1, hal. 90-95. 2018. <http://doi.org/10.1080/15569527.2017.1339714>
34. Hanasah A., Asni E., Malik Z., dan Ismawati. *Histopatologi arteri koronaria Rattus novergicus strain wistar jantan setelah pemberian diet aterogenik selama 5 minggu*. JOM FK vol. 2, no.1 hal. 1-11. 2014.