EFEK EKSTRAK AIR DAUN SIRSAK (*Annona muricata* Linn.) TERHADAP KADAR *Nitric Oxide* (NO) GASTER TIKUS YANG DIINDUKSI INDOMETASIN

Salsabila Fajriani*, Fenti Kusumawardhani Hidayah, Dini Sri Damayanti****

*Mahasiswi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang **Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

Email: SFajriani@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Indomethacin increases the risk of developing gastric ulcers due to COX-1 inhibition. COX-1 inhibition decreases eNOS expression and induces an increase in COX-2 activity which will also increase iNOS expression. Excessive Nitric oxide (NO) will form excess peroxinitrite. Soursop leaf extract has the effect of being antioxidant and anti-inflammatory, which is thought to be able to prevent damage to the gastric mucosa. The aim of this study was to prove the effect of soursop leaf water extract to decrease the levels of NO rat gaster indomethacin induced.

Methods: The study was conducted in an experimental laboratory with control group post test only design. The experimental Animals are female wistar rats aged 10-12 weeks. They were divided into 5 groups: negative control group (KN, n = 5), positive control (KP, n = 5) with indomethacin dose 30 mg / KgBB, treatment group 1 (P1, n = 5) extract dose of 100mg / KgBB, treatment group 2 (P2, n = 5) extract dose 200 mg / KgBB, and treatment group 3 (P 3, n = 5) extract dose 400 mg / KgBB. Gastric NO levels were measured by the ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) method to measure stable metabolites of nitrite and nitrate.

Results: Indomethacin significantly increased gastric NO levels ($p < 0.05$). There was a tendency to decrease gastric NO levels with an increase in the extract dose given to the treatment group compared to KP. gastric NO levels of KN group did not differ significantly to P3 ($p > 0.05$).

Conclusion: Soursop leaves water extract has the potential effects to reduce levels of rat gastric NO that induced by indomethacin along with the increase in the dosage of the herb, close to normal levels.

PENDAHULUAN

Ulkus gaster adalah keadaan terputusnya kontinuitas mukosa gaster yang membentuk suatu luka terbuka dengan pinggir edema dan debris pada dasar luka[1]. Insiden penyakit ini berkisar 5% dari populasi di seluruh dunia[2]. Penyebab yang mendasari terjadinya ulkus gaster yaitu adanya ketidakseimbangan antara faktor defensif dan faktor agresif[3]. Faktor defensif mukosa gaster terdiri dari bikarbonat, mukus, mekanisme restitusi sel, *growth factor*, aliran darah, NO dan prostaglandin[2], sedangkan faktor agresifnya dapat timbul dari endogen maupun eksogen. Faktor agresif endogen berasal dari asam lambung (HCL) dan pepsinogen, sedangkan faktor agresif eksogen berasal dari infeksi bakteri, alkohol, kondisi stres dan konsumsi

OAINS (Obat Anti-Inflamasi Non-Steroid)[4][2]. Penyebab tersering ulkus gaster adalah konsumsi OAINS[5].

Obat Anti-Inflamasi Non Steroid (OAINS) merupakan obat yang terjual bebas di masyarakat dengan kegunaan sebagai analgetik, anti-inflamasi dan antipiretik[6]. OAINS memiliki mekanisme menghambat enzim Siklooksigenase-1 (COX-1) dan atau siklooksigenase-2 (COX-2)[7]. Salah satu jenis OAINS yang paling sering menyebabkan ulkus gaster dan paling umum digunakan untuk menginduksi ulkus gaster pada penelitian eksperimental adalah Indometasin[2].

Indometasin merupakan OAINS semi-selektif yang meningkatkan afinitas COX-2 tetapi lebih kuat menghambat COX-1[8]. COX-1 akan meregulasi pH lambung dan menstimulasi biosintesis prostaglandin, sedangkan COX-2 berfungsi meningkatkan proliferasi sel epitel dan rekonstruksi kelenjar lambung terutama bekerja saat terjadi inflamasi[2]. Penghambatan terhadap kedua enzim tersebut (terutama COX-1) akan menurunkan prostaglandin (PGE_2) dan eNOS sebagai faktor protektif utama mukosa gaster[2].

Nitric Oxide (NO) merupakan suatu radikal bebas yang juga berperan sebagai vasodilator endogen dan neurotransmitter dalam tubuh manusia[9]. Pembentukan NO berasal dari L-arginin yang bereaksi dengan oksigen dan dikatalisasi oleh enzim *Nitric Oxide Synthase*(NOS)[10]. NOS memiliki 3 jenis isoenzim, yaitu *endothelial NO synthase* (eNOS) yang disintesis oleh endotel, *neuronal NO synthase* (nNOS) yang disintesis oleh neuron dan *inducible NO synthase* (iNOS)[11]. INOS hanya diekspresikan saat terjadi inflamasi sebagai respon terhadap adanya sitokin pro-inflamasi dan lipopolisakarida[12]. INOS dapat 100 sampai 1000 kali lebih banyak menghasilkan NO dibandingkan dengan eNOS dan nNOS[9][13].

Beberapa penelitian menjelaskan bahwa NO memiliki peran ganda dalam patomekanisme ulkus gaster tergantung pada jenis isoenzimnya[14]. ENOS yang berada pada mukosa gaster secara

konstitutif memproduksi NO dalam meregulasi aliran darah dan menstimulasi sekresi mukus gaster sebagai faktor protektif yang sangat penting[15]. Sementara itu, iNOS yang distimulasi oleh penurunan PGE_2 pada *indomethacin induced-gastric ulcer*, secara besar-besaran akan menghasilkan NO[16]. NO yang berlebih akan bereaksi dengan superoksida (O_2^-) menghasilkan suatu oksidan peroksinitrit $ONOO^-$ dan menimbulkan kematian sel[17]. Selain itu, kerusakan jaringan akan diperparah oleh stimulasi TNF-alfa terhadap ekspresi ICAM-1 yang akan menginduksi adhesi neutrofil dan migrasi leukosit menuju jaringan yang terkena inflamasi[18].

Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa daun sirsak memiliki efek antioksidan, antiinflamasi dan antiulcerogenik dari kandungan fitokimianya[19]. Ekstrak etanol daun sirsak memiliki kandungan fitokimia berupa tannin, flavonoid dan triterpenoid[20]. Flavonoid dan alkaloid dalam ekstrak etanol daun sirsak mampu menurunkan ekspresi TNF-α sehingga menurunkan stimulasi makrofag dalam merangsang iNOS[21]. Selain itu, tannin yang bersifat astringen akan mencegah invasi bakteri dan COX-2 dalam menstimulasi iNOS sehingga kadar NO gaster menurun[22]. Berbeda dengan ekstrak etanol daun sirsak, kandungan fitokimia dalam ekstrak air daun sirsak yaitu flavonoid, tannin, saponin dan alkaloid[23]. Namun, efek ekstrak air daun sirsak terhadap kadar NO gaster tikus yang diinduksi indometasin belum diketahui. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak air daun sirsak terhadap kadar NO gaster tikus yang diinduksi indometasin.

METODE

Pendekatan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorik dengan desain penelitian *control group post test only design* secara *in vivo*. Subjek penelitian yaitu tikus betina galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diperoleh dari *Malang Murine Farm*, Malang, Jawa Timur dengan kriteria inklusi yaitu tikus sehat, berusia 10-12 minggu, betina dan berat badan antara 150 – 250 g. Kriteria eksklusinya yaitu tikus sakit, usia tidak 10-12 minggu, jantan, dan berat badan tidak mencapai 150 gram atau lebih dari 250 gram. Jumlah tikus yang digunakan 40 ekor. Tikus diaklimatisasi selama 14 hari. Penimbangan berat badan dilakukan sebelum aklimatisasi dan sebelum perlakuan. Pengelompokan hewan coba yang dilakukan secara acak dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Pembagian kelompok

Kelompok	Perlakuan
Kontrol Negatif (KN)	Pemberian pakan standar dan minum aquades
Kontrol Positif (KP)	Tikus diinduksi Indometasin 30mg/kgBB pada hari ke-8
Perlakuan 1 (P1)	Tikus diberi ekstrak air daun sirsak 100mg/kgBB selama 7 hari dan diinduksi Indometasin 30mg/kgBB pada hari ke-8
Perlakuan 2 (P2)	Tikus diberi ekstrak air daun sirsak 200mg/kgBB selama 7 hari dan diinduksi Indometasin 30mg/kgBB pada hari ke-8
Perlakuan 3 (P3)	Tikus diberi ekstrak air daun sirsak 400mg/kgBB selama 7 hari dan diinduksi Indometasin 30mg/kgBB pada hari ke-8

Pemeliharaan hewan coba dilakukan di *Animal House* FK Universitas Islam Malang, perlakuan dan penginduksian hewan dilakukan di Lab. Biokimia FK Universitas Islam Malang, pembedahan hewan coba dilakukan di Lab. Farmakologi FK Universitas Brawijaya, pengukuran kadar NO gaster dilakukan di Lab. Biomedik FK Universitas Brawijaya. Penelitian dimulai dari bulan Mei 2018 sampai dengan Juni 2018.

Penelitian ini mendapat keterangan kelaikan etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya dengan nomor 855-KEP-UB dan disetujui pada tanggal 2 Januari 2018.

Pembuatan Ekstrak Air Daun Sirsak

Simplisia daun sirsak (*Annona muricata*) diperoleh dari Balai Materia Medica Batu (Nomor Determinasi: 074/307A/102.7/2018). Simplisia diekstraksi dengan metode infudasi, yakni sebanyak 500 gr simplisia dimasukkan ke dalam wadah, kemudian ditambahkan air sebanyak 5 liter. Wadah yang berisi campuran tersebut dimasukkan ke dalam panci berisi air secukupnya. Panci berisi air dan campuran herbal direbus diatas kompor dengan suhu 80-90°C selama 15 menit. Campuran disaring dengan kertas saring dan ampas yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan 50 rpm dan dikeringkan di dalam oven pada suhu 60°C hingga menjadi pasta.

Pemberian Ekstrak Air Daun Sirsak

Ekstrak air daun sirsak diberikan pada 3 kelompok perlakuan dengan menggunakan sonde. Herbal dalam bentuk pasta ditimbang sesuai dosis yang telah ditentukan pada masing-masing kelompok. Kelompok P1 diberikan herbal dosis 100mg/kgBB, kelompok P2 dosis 200mg/kgBB,

kelompok P3 dosis 400mg/kgBB. Masing-masing herbal dilarutkan dalam 2 cc air. Pemberian ekstrak air daun sirsak dilakukan sekali dalam sehari selama 7 hari.

Penginduksian Indometasin

Serbuk Indometasin murni didapatkan dari Lab. Farmakologi FK Universitas Airlangga. Metode induksi menurut (Werawatganon *et al*, 2014) yaitu indometasin dosis 30 mg/kgBB dilarutkan dengan NaHCO3 5% sebanyak 1 cc, lalu dimasukkan peroral menggunakan sonde ke gaster tikus[24]. Penginduksian indometasin pada hari ke-8 diberikan 18 jam setelah pemberian ekstrak air daun sirsak menurut Adeyemi 2005 dan Souza 2004[25][26].

Pengambilan Organ Gaster

Pembedahan sampel dilakukan 6 jam setelah induksi indometasin. Tikus dalam posisi supinasi dibius menggunakan ketamine 5mg/KgBB IM, lalu dilakukan pembedahan hingga nampak peritoneum pada bagian ventral tubuh setinggi VU. Gaster dibebaskan dari jaringan sekitarnya lalu bagian gastroesofageal dan pilorus diikat kemudian dilakukan pemotongan. Gaster diinsisi di area kurvatura minor lalu bagian dalam gaster dibilas dengan cairan fisiologis. Area gaster yang terdapat ulkus atau bintik perdarahan kemudian diambil lalu ditimbang.

Pemeriksaan Kadar NO gaster

Gaster digerus dan dihomogenisasi menggunakan RIPA *buffer*, lalu dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2000-3000 RPM selama 15 menit. *Supernatant* yang diperoleh digunakan untuk pemeriksaan kadar NO menggunakan *microplate reader* (ELISA KIT) pada panjang gelombang 450 nm dan suhu 37°C. Prinsip pemeriksaaan didasarkan pada perubahan warna oleh ikatan antibodi anti- nitrit (NO_2) dan nitrat (NO_3) menurut Katary *et al*, (2017)[27].

Teknik Analisa Data

Data yang diperoleh dilakukan pengujian statistik *One Way* ANOVA ($p<0.05$) yang dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* LSD ($p<0.05$) bila hasil *One Way* ANOVA signifikan. Uji *Post Hoc* LSD dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antar tiap individu perlakuan.

HASIL DAN ANALISA DATA

Karakteristik Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah tikus Wistar betina berusia 10-12 minggu yang ditunjukkan pada tabel 2.

Tabel 2. Karakteristik Sampel

Kelompok	KN	KP	P 1	P 2	P 3
Jenis Tikus	*Rattus norvegicus* strain Wistar	*Rattus norvegicus* strain Wistar	*Rattus norvegicus* strain Wistar	*Rattus norvegicus* strain Wistar	*Rattus norvegicus* strain Wistar
Usia (minggu)	10-12	10-12	10-12	10-12	10-12
Jenis Kelamin	Betina	Betina	Betina	Betina	Betina
Lama Adaptasi	14 hari	14 hari	14 hari	14 hari	14 hari
Rerata Jumlah Ulkus	0	5,6	4,6	4,4	4,4
Rerata Keparahan Ulkus	0	6	6	6	5,8
Indeks Ulkus	0	12,1	11,1	10,9	10,7

Efek Ekstrak Air Daun Sirsak Terhadap Kadar NO Gaster Tikus Yang Diinduksi Indometasin (IND)

Rerata kadar NO gaster tikus setelah pemberian ekstrak air daun sirsak dan penginduksian indometasin dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Rerata kadar NO gaster tikus yang diinduksi indometasin setelah diberi ekstrak air daun sirsak

Kelompok	N	Rerata±SE
KN	5	2.35±1.81
KP	5	6.03±1.82[a]
P1	5	5.98±1.90[a]
P 2	5	5.67±2.41[a]
P 3	5	4.44±2.19

Keterangan: Tabel 3 menunjukkan rerata kadar NO gaster tikus kelompok negatif (KN), kelompok positif (KP), kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2) dan kelompok perlakuan 3 (P3). Data dalam Rerata ± SE. Notasi berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan.
a : berbeda signifikan terhadap KN

Rerata kadar NO gaster dari lima kelompok yaitu KN, KP, P1, P2 dan P3 diperoleh rerata kadar NO tertinggi pada kelompok KP dengan rerata 6.03±1.82, sedangkan rerata kadar NO terendah yaitu pada kelompok KN dengan rerata 2,35±1,81. Berdasarkan uji statistik, didapatkan bahwa kadar NO pada KN lebih rendah secara signifikan dibandingkan dengan KP, P1 dan P2 tetapi tidak berbeda signifikan dengan kelompok P3.

Pemberian ekstrak air daun sirsak tidak menyebabkan penurunan NO secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Namun demikian, didapatkan suatu kecenderungan dengan peningkatan dosis ekstrak air daun sirsak dapat menurunkan kadar NO, yang terlihat dari kadar NO pada kelompok P3 telah mendekati kadar normal.

PEMBAHASAN

Karakteristik Sampel

Tikus wistar digunakan sebagai hewan coba karena memiliki kemiripan fisiologis terhadap tubuh mamalia sehingga dianggap dapat mencerminkan sistem fisiologis tubuh manusia[28]. Tikus wistar juga digunakan sebagai hewan coba penelitian ulkus gaster dengan induksi indometasin[5]. Selain itu, pemeliharaan hewan ini juga sangat mudah dan murah[29]. Jenis kelamin betina dipilih dalam penelitian ini adalah untuk menyesuaikan dengan prevalensi penggunaan OAINS di Indonesia yang kebanyakan digunakan oleh wanita dibandingkan pria[30]. Selain itu, hewan coba model ulkus gaster di Indonesia kebanyakan berjenis kelamin jantan, sehingga diharapkan penelitian ini dapat memperkaya referensi penggunaan hewan coba penelitian model ulkus gaster.

Penelitian ini menggunakan tikus usia 10-12 minggu dengan berat badan 120-250 G berdasarkan penelitian Ashmawy *et al*, (2016) dan Oluwabunmi, (2015) dalam pembuatan tikus model ulkus gaster[2][31]. Selain itu, usia 10-12 minggu pada tikus termasuk rentang usia dewasa[32] sehingga sesuai dengan prevalensi ulkus gaster terbanyak yaitu usia dewasa[33].

Penelitian ini melakukan adaptasi terhadap tikus selama 14 hari yang bertujuan untuk menyesuaikan fisik dan mental tikus terhadap kondisi lingkungan tempat pelaksanaan penelitian. Hal ini dilakukan agar memenuhi prinsip pemeliharaan hewan coba yang baik[34].

Penelitian ini ingin melihat efek ekstrak air daun sirsak dalam pencegahan terhadap ulkus gaster yang diukur melalui kadar NO gaster sebagai marker inflamasi. Untuk itu, penelitian ini membuat hewan coba model ulkus gaster. Hal ini dibuktikan dari rataan nilai jumlah dan keparahan ulkus serta indeks ulkus dengan nilai tertinggi pada KP (induksi indometasin 30 mg/KgBB). Perhitungan jumlah ulkus dan keparahan ulkus berdasarkan penelitian terdahulu[35] dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Perhitungan Jumlah dan Keparahan Ulkus[35]

Nilai/skor	Jumlah Ulkus	Keparahan Ulkus
1	Normal (tidak ada ulkus)	Normal (tidak ada ulkus)
1,5	Kemerahan	Kemerahan
2	Bintik Perdarahan	Bintik Perdarahan/Panjang Ulkus <0,5mm
3	Ulkus sejumlah 2-4	Panjang Ulkus 0,5-1 mm
4	Ulkus sejumlah 5-7	Panjang Ulkus 1-1,5 mm
5	Ulkus sejumlah 8-10	Panjang Ulkus 1,5-2 mm
6	Ulkus sejumlah >10 atau perforasi	Panjang Ulkus 1,5-2 mm atau perforasi

Terbentuknya ulkus dinyatakan dengan indeks ulkus berdasarkan penelitian terdahulu[36] dengan perhitungan berdasarkan nilai jumlah ulkus, keparahan ulkus dan jumlah hewan coba yang mengalami ulkus dalam satu kelompok, yang dinyatakan dengan persamaan:

$$IU = J + K + 0{,}1\% \ I$$ [36]

Keterangan :

IU =Indeks Ulkus

J =Rataan skor jumlah ulkus tiap kelompok perlakuan

K =Rataan skor keparahan ulkus tiap kelompok perlakuan

%I = Presentase hewan yang terkena ulkus dalam tiap kelompok perlakuan

Efek Induksi Indometasin Terhadap Kadar NO Gaster Tikus Wistar Betina

Berdasarkan hasil analisa uji statistik, didapatkan kadar NO pada kelompok positif (KP) lebih tinggi secara signifikan terhadap kelompok negatif (KN). Hal ini dimungkinkan karena indometasin mempengaruhi peran ganda NOS dalam peningkatan NO gaster, yaitu menurunkan eNOS dan meningkatkan iNOS secara langsung maupun tak langsung. Indometasin akan menghambat COX-1 dalam biosintesis prostaglandin dan eNOS[2][4]. Penurunan PGE2 dan eNOS yang merupakan faktor protektif mukosa gaster akan menurunkan barrier fisik mukus gaster, meningkatkan motilitas GIT dan produksi HCL, bahkan menyebabkan hipoksia sel gaster[37][24]. Keadaan tersebut akan merusak lapisan mukosa gaster sehingga memudahkan invasi bakteri dan menyebabkan injuri sel[38]. Bakteri yang memiliki lipopolisakarida akan merangsang makrofag untuk mengeluarkan iNOS sehingga akan meningkatkan kadar NO. Beberapa hal tersebut akan menstimulasi COX-2 untuk merangsang pengeluaran mediator pro-inflamasi seperti TNF-α sehingga meningkatkan produksi NO melalui iNOS[38][39][24]. Selain itu, indometasin secara langsung juga dapat meningkatkan ekspresi mRNA iNOS[37][16]. Berdasarkan penelitian tersebut, peneliti menduga kadar NO yang tinggi pada KP merupakan hasil dari stimulasi oleh iNOS, sehingga terjadi overproduksi NO pada gaster. NO dengan jumlah yang berlebihan akan menimbulkan ulkus melalui penumpukan radikal bebas. Hal ini disebabkan karena NO akan bereaksi dengan superoksida (O_2^-) menghasilkan suatu oksidan peroksinitrit $ONOO^-$ dan menimbulkan kematian sel[17]. Hal tersebut terbukti menyebabkan ulkus gaster yang terlihat pada rataan nilai jumlah ulkus, rataan nilai keparahan ulkus dan indeks ulkus tertinggi yang dimiliki oleh KP (induksi indometasin 30 mg/KgBB).

Penelitian ini menggunakan Indometasin dosis 30 mg/KgBB untuk menginduksi ulkus gaster. Dosis ini dipilih berdasarkan penelitian pendahuluan yang membuktikan bahwa pemberian indometasin dosis 30 mg/KgBB menyebabkan ulkus gaster pada tikus. Selain itu, dosis ini juga digunakan dalam penelitian yang dilakukan oleh Sabiu *et al*, (2016) dan Oyekachukwu *et al*, (2017) dalam membuat hewan coba model ulkus gaster[40][41].

Efek Ekstrak Air Daun Sirsak Terhadap Kadar NO Gaster Tikus yang Diinduksi Indometasin

Herbal daun sirsak diekstraksi menggunakan pelarut air karena daun sirsak mengandung banyak senyawa yang bersifat polar[42], sehingga diharapkan dengan sifat air yang polar akan banyak menarik senyawa tersebut. Selain itu, senyawa-senyawa yang bersifat antioksidan pada daun sirsak lebih banyak larut dalam air[42]. Hasil analisa fitokimia ekstrak air daun sirsak mengandung flavonoid, fenol, tannin, glikosida[43], terpenoid[44] dan alkaloid[45]. Dosis herbal yang digunakan pada penelitian ini adalah 100 mg/KgBB, 200mg/KgBB dan 400 mg/KgBB karena pada penelitian yang dilakukan oleh Roslida *et Al*, (2010) dan Moghadamtousi, (2014) telah dibuktikan dengan dosis tersebut herbal mampu menurunkan keparahan ulkus gaster[46][47]. Oleh karena itu, dosis tersebut dipilih menggunakan sonde agar mengoptimalkan dosis herbal yang diberikan kepada tikus.

Berdasarkan hasil analisa *post hoc* LSD, tidak didapatkan perbedaan yang signifikan pada kadar NO gaster KP terhadap P1, P2 dan P3. Hal ini dapat dimungkinkan karena dosis ekstrak air daun sirsak yang kurang karena penelitian ini tidak menggunakan konversi dosis untuk menentukan dosis pada tikus. Perhitungan konversi dosis manusia terhadap tikus dalam beberapa penelitian menyebutkan dosis 100 mg/KgBB, 200 mg/KgBB dan 400 mg/KgBB pada manusia berturut-turut setara dengan 700 mg/KgBB, 1400 mg/KgBB dan 2800 mg/KgBB pada tikus[48].

Hasil analisa statistik kadar NO gaster pada masing-masing kelompok memiliki nilai deviasi standar yang tinggi. Hal ini bermakna masing-masing individu dalam tiap kelompok memiliki variasi kadar NO gaster yang besar. Hal tersebut dimungkinkan karena masing-masing tikus memiliki variasi individu dalam hal kemampuan restitusi sel mukosa gaster, pertahanan terhadap invasi bakteri pada mukosa gaster, perbedaan asupan makan dan minum, serta perbedaan metabolisme tiap individu sehingga berbeda dalam kemampuan menghasilkan NO gaster atas respon terhadap pemberian herbal dan indometasin yang diberikan.

Berdasarkan penelitian terdahulu[46][47], ekstrak etanol daun sirsak dosis100 mg/KgBB, 200mg/KgBB dan 400 mg/KgBB memiliki efek antiinflamasi dan antioksidan yang dibuktikan dengan penurunan indeks ulkus gaster dengan induksi etanol. Sementara itu, kadar NO gaster P1, P2 dan P3 tidak menurun secara signifikan dibanding KP. Hal ini dimungkinkan karena perbedaan pelarut yang digunakan. Pelarut etanol yang bersifat semi polar cenderung menarik metabolit sekunder pada daun sirsak yang bersifat sebagai antiinflamasi, sedangkan pelarut air cenderung menarik zat-zat dalam herbal yang bersifat antioksidan [49][45]. Metabolit sekunder dalam ekstrak etanol daun sirsak yaitu steroid, flavonoid, tannin, dan saponin yang terbukti memiliki efek antiinflamasi[23], sedangkan ekstrak air daun sirsak mengandung flavonoid, tannin dan alkaloid yang lebih dominan sebagai antioksidan[23]. NO merupakan senyawa yang memodulasi respon inflamasi, oleh karena itu pelarut air dianggap kurang mampu mengoptimalkan efek daun sirsak sebagai antiinflamasi karena sifatnya yang kurang mampu menarik zat-zat antiinflamasi dalam herbal secara optimal.

Berdasarkan hasil analisa *post hoc* LSD,

didapatkan kecenderungan penurunan kadar NO gaster pada kelompok P1, P2 dan P3 dibandingkan KP. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak air daun sirsak berpotensi menurunkan kadar NO gaster pada tikus yang diinduksi indometasin. Potensi tersebut didukung oleh data indeks ulkus, rataan nilai jumlah dan keparahan ulkus yang semakin menurun pada P1, P2, P3 dengan dosis herbal yang semakin meningkat. Hal tersebut dimungkinkan karena ekstrak air daun sirsak memiliki kandungan zat aktif yang berperan sebagai anti-*ulcerogenic*, diantaranya flavonoid, tannin dan alkaloid[23][44][19]. Flavonoid dalam daun sirsak berperan sebagai antioksidan dan antiinflamasi[21]. Antioksidan pada flavonoid bekerja melalui peningkatan aktivitas antioksidan enzimatis dan non-enzimatis yang dapat mencegah peroksidasi lipid dalam meningkatkan stimulasi iNOS[44][19]. Selain itu, flavonoid merupakan inhibitor kuat terhadap lipid peroksidasi, penangkap ROS atau RNS (*Reactive Nitrogen Species)* dan mengikat ion logam[50][51]. Flavonoid dalam ekstrak daun sirsak juga mampu menurunkan ekspresi TNF-α sehingga menurunkan stimulasi makrofag dalam merangsang iNOS[21].

Selain flavonoid, tanin juga merupakan zat bioaktif yang banyak ditemui pada ekstrak air daun sirsak. Tanin memiliki sifat *astringent* melalui mekanisme pengendapan protein mikro yang akan melapisi mukosa gaster sehingga melindungi mukosa dari racun ataupun iritan lainnya[52]. Hal tersebut akan mempertahankan mukosa gaster agar tetap intak. Selain itu, tanin akan mencegah invasi bakteri, COX-2 dan makrofag dalam menstimulasi iNOS sehingga kadar NO gaster menurun[19].

Alkaloid dalam ekstrak air daun sirsak memiliki efek gastroprotektif melalui beberapa mekanisme. Alkaloid dapat berperan sebagai penghambat kanal kalsium sehingga menurunkan sekresi HCL dan meningkatkan aktivitas eNOS[53]. Selain itu, alkaloid dapat menurunkan TNF-α, menurunkan peroksidasi lipid[54], menghambat COX-2 dan secara langsung menghambat ekspresi iNOS sehingga menurunkan kadar NO gaster[55].

Kadar NO gaster pada kelompok perlakuan 3 dengan dosis herbal 400 mg/KgBB tidak berbeda signifikan dibanding pada kelompok negatif. Hal ini bermakna bahwa kadar NO gaster kelompok dengan pemberian dosis 400 mg/KgBB cenderung sama dengan kadar NO gaster pada kelompok normal. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Moghadamtousi *et al*, (2014), ekstrak etil asetat daun sirsak 400 mg/KgBB mampu menurunkan gambaran perdarahan pada gaster tikus yang diinduksi etanol dengan meningkatkan kadar NO[47]. Hal ini menunjukkan dosis 400 mg/KgBB merupakan dosis terbaik ekstrak air daun sirsak sebagai antiinflamasi dalam menurunkan kadar NO gaster tikus yang diinduksi indometasin[56][57].

SIMPULAN

Ekstrak air daun sirsak berpotensi menurunkan kadar NO gaster tikus yang diinduksi indometasin seiring dengan peningkatan dosis herbal tersebut hingga mendekati kadar normalnya.

SARAN

1. Meningkatkan eksplorasi dosis ekstrak air daun sirsak terhadap kadar NO gaster tikus yang diinduksi indometasin.
2. Melakukan konversi dosis daun sirsak sehingga memperkaya referensi penelitian dan membandingkan efek antara dosis daun sirsak yang dikonversi dan tidak dikonversi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada IOM dan Fakultas yang telah mendanai penelitian. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada dosen pembimbing, staf laboratorium, kelompok penelitian dan segala pihak yang telah membatu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Mediansyah A, Rahmanisa S, Kedokteran F, Lampung U. Hubungan Ibuprofen terhadap Ulkus Gaster. 2017;6:6–10.
2. El-Ashmawy NE, Khedr EG, El-Bahrawy HA, Selim HM. Nebivolol prevents indomethacin-induced gastric ulcer in rats. J Immunotoxicol 2016;13(4):580–9.
3. Fitra BK, Nabawiyati S, Makiyah N. Efek Profilaksis Perasan Daun Paederia foetida L. terhadap Ulkus Lambung Tikus Putih Terinduksi Etanol The Prophylactic Effect of Paederia foetida L. Leaves Squeeze to Histological Features Of White Rats Gastric Ulcer Induced By Ethanol. 2009;9(2):115–22.
4. Rahmaniyah NS. UJI EFEK PENYEMBUHAN ULKUS DARI PERASAN DAGING BUAH MANGGA PODANG URANG (Mangifera Indica L.) PADA LAMBUNG TIKUS YANG DIINDUKSI ASPIRIN ULCER HEALING EFFECT TEST OF PODANG URANG MANGO FRUIT FILTARE (Mangifera Indica L.) ON ASPIRIN INDUCED GASTRIC ULCE. 2015;181–7.
5. Indraswari CI, Kalsum U, Sudjari. ULKUS PEPTIKUM AKIBAT INDUKSI INDOMETASIN (THE INFLUENCE OF TEMULAWAK (Curcuma xanthorriza) TO RAT GASTER WITH PEPTIC ULCER CAUSED BY THE INDOMETHACINE INDUCED). 2004;XX:96–9.
6. Zahra AP, Carolia N, Kedokteran F, Lampung U, Farmakologi B, Kedokteran F, et al. Obat Anti-inflamasi Non-steroid (

OAINS): Gastroprotektif vs Kardiotoksik Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs): Gastroprotective vs Cardiotoxic. 2017;6:153–8.

7. Fajriani. Pemberian Obat-obatan Anti Inflamasi Non Steroid (AINS) Pada Anak. Indones J Dent 2008;15(3):200–4.

8. White WB, Cruz C. Impact of NSAIDs on cardiovascular risk and hypertension. Ital J Med [Internet] 2011;5(3):175–83. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.itjm.2011.04.007

9. Burke T. NITRIC OXIDE AND ITS ROLE IN HEALTH AND DIABETES [Internet]. 2015 [cited 2018 Sep 8];1–24. Available from: http://www.diabetesincontrol.com/burkearchive/

10. Article R, Khattab MM, Gad MZ, Abdallah D. Protective role of nitric oxide in indomethacin-induced gastric ulceration by a mechanism independent of gastric acid secretion. 2018;10–2.

11. widiastuti. PERBEDAAN KADAR NITRIC OXIDE DAN DERAJAT STENOSIS PADA PENDERITA Penyakit Jantung Koroner Dengan Tanpa Diabetes Melitus. 2010;

12. AK N, TR B. Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase. J Leukoc Biol 1993;54(2):171–8.

13. Murtyastami K, Widyarti S, Khotimah K. Kajian Efek Alfa-Pinen Terhadap I-NOS (Inducible Nitric Oxide Synthase) Pada Kultur Sel Neuron-Glia Yang Dipapar Lipopolisakarida Krisna. 2008;

14. Kato S, Ohkawa F, Ito Y, Amagase K, Takeuchi K, Therapeutics E. Role of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Aggravation of Indomethacin-Induced Gastric Damage in Adjuvant Arthritic Rats. 2009;147–55.

15. Petersson J. Nitrate , Nitrite and Nitric Oxide in Gastric Mucosal Defense. 2008.

16. Vivatvakin S, Werawatganon D, Somanawat K, Klaikeaw N, Siriviriyakul P. Genistein-attenuated Gastric Injury on Indomethacin-induced Gastropathy in Rats. Pharmacogn Mag 2017;13(51):393–9.

17. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: Regulation and function. Eur Heart J 2012;33(7):1–13.

18. PC K, A D, T B, SJ K, S K, D D, et al. Activation of genes for superoxide dismutase, interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and intercellular adhesion molecule-1 during healing of ischemia-reperfusion-induced gastric injury. Scand J Gastroenterol 2000;35(5):452–63.

19. Ojezele OJ, Ojezele MO, Adeosun AM. Comparative Phytochemistry and Antioxidant Activities of Water and Ethanol Extract of Annona muricata Linn Leaf, Seed and Fruit. Adv Biol Res (Rennes) 2016;10(4):230–5.

20. Roslida A, Tay C, Zuraini A, et al. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of the ethanolic extract of Annona muricata leaf. J Nat Remedies 2010;10(July):97–104.

21. Estela M, Prameshinta F, Dharmana E, Kisdjamiatun RA. Efektivitas Ekstrak Daun Sirsak (Annona Muricata) dalam Menurunkan Kadar TNF α dan Meningkatkan Kadar NO Uji Coba pada Mencit Swiss yang Diinokulasi Plasmodium Berghei ANKA The Effectiveness of Soursop (Annona muricata) Leaf Extract in Lowering TNF α. J Kedokt Brawijaya 2016;29(1):39–42.

22. Matsumura Y, Kitabatake M, Ouji-Sageshima N, Yasui S, Mochida N, Nakano R, et al. Persimmon-derived tannin has bacteriostatic and anti-inflammatory activity in a murine model of Mycobacterium avium complex (MAC) disease. PLoS One 2017;12(8):1–9.

23. Londok JJM., Mandey JS. POTENSI FITOKIMIA DAN AKTIVITAS ANTIMIKROBA DAUN SIRSAK (Annona Muricata Linn .) SEBAGAI KANDIDAT BAHAN PAKAN AYAM PEDAGING. J LPPM Bid Sains dan Teknol 2014;1:30–6.

24. Werawatganon D, Rakananurak N, Sallapant S, Prueksapanich P, Somanawat K, Klaikeaw N, et al. Aloe vera attenuated gastric injury on indomethacin-induced gastropathy in rats. World J Gastroenterol 2014;20(48):18330–7.

25. Adeyemi EO, Bastaki SA, Chandranath IS, Hasan MY, Fahim M, Adem A. Mechanisms of action of leptin in preventing gastric ulcer. World J Gastroenterol 2005;11(27):4154–60.

26. Souza MHLP, Paula Lemos H, Oliveira RB, Cunha FQ. Gastric damage and granulocyte infiltration induced by indomethacin in tumour factor 1 (TNF-R1) or inducible nitric oxide synthase (iNOS) deficient mice. Gut 2004;53(6):791–6.

27. MA K, A S. Gastroprotective Effect of Vanillin on Indomethacin-Induced Gastric Ulcer in Rats: Protective Pathways and Anti-Secretory Mechanism. Clin Exp Pharmacol [Internet] 2017;07(02). Available from: https://www.omicsonline.org/open-access/gastroprotective-effect-of-vanillin-on-indomethacininduced-gastric-ulcer-in-rats-protective-pathways-and-antisecretory-mechanism-2161-1459-1000232.php?aid=86975

28. Pambudi R. PERBEDAAN PANJANG SERTA BERAT TUBUH FETUS TIKUS PUTIH (Rattus norvegicus) GALUR

SPRAGUE-DAWLEY TERHADAP PEMBERIAN ASAM FOLAT PADA PERIODE KEHAMILAN YANG BERBEDA. 2017;

29. Tri H. KAJIAN TENTANG PENGGUNAAN TIKUS PUTIH (Rattus norvegicus) UNTUK PENGUJIAN BAHAN KONTRASEPSI TRADISIONAL. 2010;

30. Waranugraha Y, Pratomo B, Studi P, Dokter P, Kedokteran F, Brawijaya U, et al. Hubungan Pola Penggunaan OAINS dengan Gejala Klinis Gastropati pada Pasien Reumatik Relationship of NSAID Utilization Pattern With Gastropathy Symptoms in Rheumatic Patient. J Kedokt Brawijaya 2010;26(2):107–12.

31. Oluwabunmi I, Abiola T. Gastroprotective effect of methanolic extract of Gomphrena celosioides on indomethacin induced gastric ulcer in Wistar albino rats. Int J Appl Basic Med Res [Internet] 2015;5(1):41. Available from: http://www.ijabmr.org/text.asp?2015/5/1/41/149238

32. Vrdoljak AL, Fuchs N, Mikolić A, Unec S, Karačonji IB, Jurič A, et al. Irinotecan and Δ9-Tetrahydrocannabinol interactions in rat liver: A preliminary evaluation using biochemical and genotoxicity markers. Molecules 2018;23(6).

33. Muyassaroh A. Evaluasi Penggunaan Obat Tukak Peptik Pada Pasien Tukak Peptik (peptic ulcer disiease)Di Intalasi Rawat Inap Rumah Sakit Umum Islam Kustati Sukarta Tahun 2008 Fakultas Farmasi. 2009;

34. Stevani H. Praktikum Farmakologi. 2016.

35. Novia AH, Afifah BS, Suci N V. Uji Efek Antitukak Lambung Ekstrak Air Herba Bayam Merah (Amaranthus tricolor L.) Terhadap Tikus Wistar Betina. Kartika J Ilm Farm 2014;2(1):45–50.

36. Astri Y, Sitorus T, Sigit JI, Sujatno M, Pendidikan U, Fakultas K, et al. Toksisitas Akut per Oral Ekstrak Etanol Daun Dewa (Gynura pseudochina (Lour .) DC) terhadap Kondisi Lambung Tikus Jantan dan Betina Galur Acute Oral Toxicity of Ethanol Extract of Dewa Leaf (Gynura pseudochina (Lour .) DC) to Male and Female Wistar . 2012;44(1):38–43.

37. Takeuchi K, Satoh H. NSAID-induced small intestinal damage - Roles of various pathogenic factors. Digestion 2015;91(3):218–32.

38. Hayashi S, Kurata N, Kitahirachi E, Nishimura Y, Amagase K, Yano T, et al. Cinacalcet, a calcimimetic, prevents nonsteroidal antiinflammatory drug-induced small intestinal damage in rats. J Physiol Pharmacol [Internet] 2013;64(4):453–63. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24101391

39. Saud B, Nandi J, Ong G, Finocchiaro S, Levine RA. Inhibition of TNF-α improves indomethacin-induced enteropathy in rats by modulating iNOS expression. Dig Dis Sci 2005;50(9):1677–83.

40. Sabiu S, Garuba T, Sunmonu TO, Sulyman AO, Ismail NO. Indomethacin-induced gastric ulceration in rats: Ameliorative roles of Spondias mombin and Ficus exasperata. Pharm Biol 2016;54(1):180–6.

41. Ar O, Jp E, Ov E, Ofc N. Anti-Inflammatory Effects of The Chloroform Extract of Annona muricata Leaves on Phospholipase A 2 and Prostaglandin Synthase Activities Abstract. iMedPub Journals 2017;1–8.

42. Kurniasih N, Kusmiyati M, Nurhasanah, Sari RP, Wafdan R. Potensi Daun Sirsak (Annona muricata Linn), Daun Binahong (Anredera cordifolia (Ten) Steenis), dan Daun Benalu Mangga (Dendrophthoe pentandra) Sebagai Antioksidan Pencegah Kanker. J Istek [Internet] 2015;IX(1):162–84. Available from: http://www.journal.uinsgd.ac.id/index.php/istek/article/viewFile/182/197

43. Arthur, F.K.N.,Woode, E., Terlabi, E.O.and Larbie C. Evaluation of acute and subchronic toxicity of Annona Muricata (Linn .) aqueous extract in animals. Eur J Exp Biol 2011;1(4):115–24.

44. Vijayameena C, Subhashini G, Loganayagi M, Ramesh B. Phytochemical screening and assessment of antibacterial activity for the bioactive compounds in Annona muricata. Int J Curr Microbiol Appl Sci 2013;2(1):1–8.

45. Soekaryo E, Siamnjutak P, Setyahadi S. UJI INHIBISI ENZIM SIKLOOKSIGENASE-2 (COX-2) dari EKSTRAK DAUN sirsak sebagai anti inflamasi. 4 th Univesity Res Coloquium 2016 2016;2:485–92.

46. Roslida A, Foong C, Zuraini A, et al. Antinociceptive and anti-ulcerogenic activities of the ethanolic extract of Annona muricata leaf. J Nat Remedies 2010;10(3):97–104.

47. Moghadamtousi SZ, Rouhollahi E, Karimian H, Fadaeinasab M, Abdulla MA, Kadir HA. Gastroprotective activity of Annona muricata leaves against ethanol-induced gastric injury in rats via Hsp70/Bax involvement. Drug Des Devel Ther 2014;8:2099–111.

48. E.J F, E.A G, D.P R, L.H S, H.E S. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. Cancer Chemother Reports 50(4) 219-244 1966;50:8–9.

49. Foong CP, Hamid RA. Evaluation of anti-inflammatory activities of ethanolic extract of Annona muricata leaves. Rev Bras

Farmacogn 2012;22(6):1301–7.
50. Puspitasari ML, Wulansari TV, Widyaningsih TD, Mahar J. Aktivitas antioksidan suplemen herbal daun sirsak (Annona muricata L .) dan Kulit Manggis (Garcinia mangostana L .): KAJIAN PUSTAKA Antioxidant Activity Herbal Supplements of Soursop Leaf (Annona muricata L .) and Pericarp of Mangosteen (Garcinia man. Pangan Dan Agroindustri 2016;4(1):283–90.
51. Sasanthi IY. PEMBERIAN EKSTRAK ETHANOL ANGGUR (Vitis vinifera) MENCEGAH PENURUNAN OSTEOBLAS DAN DENSITAS TULANG SERTA MENCEGAH PENINGKATAN OSTEOKLAS PADA TIKUS (Rattus norvegicus) JANTAN DENGAN AKTIVITAS FISIK BERLEBIH. 2016;
52. Susilawati NM, Khaerati K. Aktivitas Gastroprotektif Ekstrak Etanol Daun Gedi Hijau (Abelmoschus manihot (L .) Medik) Terhadap Tikus Putih Jantan (Rattus norvegicus L .) Yang Diinduksi Dengan Aspirin Gastroprotective Activity Of Ethanolicextract Of The Leaves Of Abelmoschus man. Online J Nat Sci 2016;5(3):296–306.
53. Wan J. Effect of anisodamine on the reserpine - induced gastric mucosal lesion in rats. Chinese J Pathophysiol 2000;16(3):1–6.
54. Do Nascimento RF, De Sales IRP, De Oliveira Formiga R, Barbosa-Filho JM, Sobral MV, Tavares JF, et al. Activity of alkaloids on peptic ulcer: What's new? Molecules 2015;20(1):929–50.
55. Alves De Almeida AC, De-Faria FM, Dunder RJ, Manzo LPB, Souza-Brito ARM, Luiz-Ferreira A. Recent Trends in Pharmacological Activity of Alkaloids in Animal Colitis: Potential Use for Inflammatory Bowel Disease. Evidence-based Complement Altern Med 2017;2017.
56. Putri RNA. UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN SIRSAK (Annona muricata L.) DENGAN METODE DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazil). Sarj Kedokt 2012;11–2.
57. Baskar R, Rajeswari V, Kumar TS. In vitro antioxidant studies in leaves of annona species. Indian J Exp Biol 2007;45(5):480–5.