

**PEMBERIAN KOMBUCHA DAUN SIRSAK 150 DAN 300 PPM
MENURUNKAN LUAS AREA KOLAGEN DAN MENURUNKAN KETEBALAN
DINDING PEMBULUH DARAH AORTA IKAN ZEBRA (*Danio rerio*)
YANG DIINDUKSI SUKROSA 4%**

Zuhruf Yarisuna Kholid Firdaus, Aris Rosidah, Dini Sri Damayanti*
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Induksi sukrosa 4% menyebabkan hiperglikemia pada *zebrafish* (*Danio rerio*) yang menginduksi peningkatan ketebalan dinding pembuluh darah. Kombucha daun sirsak memiliki efek antioksidan, antihiperglikemia karena mengandung senyawa aktif fenol dan asam organik. Kombucha daun sirsak (daun sirsak yang difermentasi) diteliti untuk mempelajari efek vaskuloprotektifnya.

Metode: Penelitian menggunakan desain *post test group control only* pada *zebrafish* (*Danio rerio*). Sampel dibagi menjadi 5 kelompok yang terdiri dari kelompok kontrol negatif (KN), kelompok kontrol positif dengan induksi sukrosa 4% (KP), kelompok dengan induksi sukrosa 4%+kombucha daun sirsak 150 ppm (P1), kelompok dengan induksi sukrosa 4%+kombucha daun sirsak 300 ppm (P2), dan kelompok dengan induksi sukrosa 4%+kombucha daun sirsak 600 ppm (P3). Induksi sukrosa 4% diberikan selama 28 hari. Preparat histologi diwarnai dengan *masson trichrome* (MT) untuk mengukur ketebalan dan luas area kolagen aorta. Analisis statistik menggunakan *kruskal wallis* dilanjutkan *mann-whitney*, $p < 0.05$.

Hasil dan Pembahasan: Ketebalan dinding aorta *zebrafish* tidak berbeda signifikan antar kelompok KN, KP, P1, P2, dan P3 dengan $p = 0.06$. Ketebalan dinding aorta pada kelompok KP lebih tinggi dibanding kelompok KN. Luas area kolagen pada aorta *zebrafish* menunjukkan KN lebih sedikit dibandingkan KP ($KN = 43543.11 \mu m^2$ dan $KP = 252568.43 \mu m^2$) $p = 0.001$. Induksi kombucha daun sirsak pada kelompok P1 dan P2 mampu menurunkan ketebalan dinding aorta masing-masing mampu menurunkan sebesar $81.29 \mu m$ dan $43.95 \mu m$ dibandingkan dengan kelompok KP. Induksi kombucha daun sirsak kelompok dosis P1 dan P2 menurunkan secara bermakna luas area kolagen sebesar ($P1 = 42833.02 \mu m^2$ dan $P2 = 93189.69 \mu m^2$) ($p < 0.05$) dan dibandingkan dengan kelompok KP ($252568.43 \mu m^2$).

Kesimpulan: Kombucha daun sirsak pada dosis 150 ppm dan 300 ppm menurunkan luas kolagen aorta dan menurunkan ketebalan dinding pembuluh darah tersebut.

Kata Kunci : Kombucha daun sirsak, *zebrafish*, ketebalan dinding pembuluh darah, luas area kolagen, hiperglikemia

*Penulis Korespondensi :

Dr. dr. Dini Sri Damayanti, M.Kes

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

Jl. MT Haryono Gg. VIII G No.915, Kota Malang, Jawa Timur 65144

+62-341-5728

Email: dinisridamayanti@unisma.ac.id

**ADMINISTRATION OF SOURSOP LEAF KOMBUCHA AT 150 AND 300 PPM
REDUCES COLLAGEN AREA AND AORTIC VESSEL WALL THICKNESS IN
ZEBRAFISH (*Danio rerio*) INDUCED WITH 4% SUCROSE**

Zuhruf Yarisuna Kholid Firdaus, Aris Rosidah, Dini Sri Damayanti*
Faculty of Medicine Islamic University of Malang

ABSTRACT

Introduction: Induction of 4% sucrose causes hyperglycemia in *zebrafish* (*Danio rerio*), which in turn leads to increased vascular wall thickness. Soursop leaf kombucha, a fermented product of *Annona muricata* leaves, possesses antioxidant and antihyperglycemic properties due to its active compounds, including phenols and organic acids. This study investigates the vasculoprotective effects of soursop leaf kombucha in hyperglycemic *zebrafish* models.

Methods: This study employed a post-test only control group design using *zebrafish* (*Danio rerio*). The samples were divided into five groups: negative control group (KN), positive control group induced with 4% sucrose (KP),

treatment group with 4% sucrose + soursop leaf kombucha 150 ppm (P1), treatment group with 4% sucrose + kombucha 300 ppm (P2), treatment group with 4% sucrose + kombucha 600 ppm (P3). The sucrose induction was administered for 28 days. Aortic tissue samples were processed for histological examination using Masson's Trichrome staining to evaluate aortic wall thickness and collagen area. Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney U test, with significance set at $p < 0.05$.

Results and Discussion: The aortic wall thickness in zebrafish showed no significant differences among the KN, KP, P1, P2, and P3 groups ($p = 0.06$). The aortic wall thickness in the KP group was higher compared to the KN group. The collagen area in the zebrafish aorta was lower in the KN group than in the KP group (KN = 43,543.11 μm^2 ; KP = 252,568.43 μm^2) with a significance of $p = 0.001$. Administration of soursop leaf kombucha in the P1 and P2 groups reduced aortic wall thickness by 81.29 μm and 43.95 μm , respectively, compared to the KP group. Soursop leaf kombucha administration at P1 and P2 doses significantly decreased collagen area (P1 = 42,833.02 μm^2 ; P2 = 93,189.69 μm^2) ($p < 0.05$) when compared to the KP group (252,568.43 μm^2).

Conclusion: Soursop leaf kombucha at doses of 150 ppm and 300 ppm effectively reduced aortic collagen area and tended to reduce aortic wall thickness in hyperglycemic zebrafish. These results support the hypothesis that kombucha has vasculoprotective properties.

Keywords: *Soursop leaf kombucha, zebrafish, vascular wall thickness, aortic collagen area, hyperglycemia*

*Corresponding Author:

Dr. dr. Dini Sri Damayanti, M.Kes

Faculty of Medicine Islamic University of Malang

Jl. MT Haryono Gg. VIII G No.915, Malang City, East Java 65144, Indonesia

Phone: +62-341-5728

Email: dinisridamayanti@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Penyakit diabetes mellitus merupakan penyakit gangguan metabolik kronis yang ditandai oleh kondisi hiperglikemia (peningkatan kadar gula) dalam tubuh yang disebabkan kondisi resistensi insulin atau tidak ada produksi insulin¹. Salah satu faktor risiko terjadinya diabetes melitus yaitu akibat mengonsumsi makanan dan minuman manis dalam hal ini asupan gula sukrosa yang tinggi. Berdasarkan penelitian sebelumnya, besarnya risiko terjadinya obesitas sentral pada responden dengan asupan gula sukrosa lebih tinggi sebesar >50 g/ hari daripada yang hanya sebesar ≤ 50 g/ hari. DM tipe 2 berkaitan dengan *partial insulin deficiency* dimana jumlah insulin berkurang (defisiensi) yang disebabkan karena *peripheral insulin resistance*².

Akibat konsumsi yang berlebih ini pankreas akan mengeluarkan insulin lebih banyak. Akan tetapi akibat reseptor insulin tidak bekerja secara baik, glukosa transporter 4 (GLUT-4) yang berada pada permukaan sel otot dan sel adiposa akan menurun, sehingga glukosa dan fruktosa hasil pemecahan dari sukrosa akan tetap berada lama di dalam darah. Pankreas pada awalnya bisa menurunkan peningkatan kadar glukosa dengan cara meningkatkan sekresi insulin sehingga normoglikemia tetap tercapai. Apabila terjadi hiperglikemia dalam kondisi kronis, seiring waktu pankreas akan beradaptasi dimana sel beta pankreas akan menjadi lebih besar karena memproduksi insulin lebih banyak sampai dia tidak mampu lagi mengkompensasi kondisi hiperglikemia. Akibat dari kondisi *prolonged* hiperglikemia ini sel- β pankreas akan mengalami atrofi³. Proses ini disebabkan karena peningkatan kadar glukosa darah di dalam sel beta pankreas akan menyebabkan peningkatan autoglikasi dan glukotoksitas sehingga menyebabkan sel beta pankreas mengalami apoptosis. Defisiensi sel beta pankreas inilah yang menyebabkan kondisi diabetes melitus tipe 2 yang ditandai dengan hipoinsulin dan hiperglikemia⁶¹.

Kondisi hiperglikemia menyebabkan perubahan pada mikrovaskular dan makrovaskular. Pemeriksaan histologi pembuluh darah menunjukkan adanya penebalan dari membrana basalis di kapiler jaringan otot rangka, kulit, hati, paru-paru, jantung dan saraf tepi. Mikroangiopati mungkin berkontribusi terhadap komplikasi diabetes seperti retinopati, nefropati dan neuropati perifer⁴. Pasien dengan insulin resistance pada DM tipe 2 juga menunjukkan kelimpahan produksi kolagen, struktural, dan susunan serat fibril pada dinding pembuluh darah yang abnormal pada matriks ekstraseluler (MEK)⁴.

Kombucha merupakan salah satu produk pangan yang diketahui memiliki manfaat sebagai agen terapi hiperglikemia dengan mekanisme penurunan serapan glukosa dari sistem pencernaan. Selain itu kombucha memiliki kandungan aktivitas

antioksidan yang dapat memberikan efek perlindungan dan perbaikan (regenerasi) sel penghasil insulin di pankreas sehingga memperbaiki produksi insulin⁴². Kombucha juga memiliki senyawa aktif fenol, asam organik, dan alkohol. Salah satu asam organik yang terkandung dalam kombucha adalah asam lemak rantai pendek/*short chain fatty acid* (SCFA) yang berperan di intestinal dalam menjaga integritas sel-sel enterosit. Senyawa fenol pada kombucha dalam bentuk aktif. Sedangkan bila menggunakan ekstrak rebusan saja senyawa fenol masih dalam bentuk fenol+gula. Dengan adanya SCOBY atau koloni bakteri dan yeast pada teh kombucha akan membantu memecah ikatan fenol dan glukosa tersebut⁵.

Salah satu bahan baku yang bisa digunakan untuk membuat kombucha adalah daun sirsak. Pada salah satu penelitian yang dilakukan sebelumnya kepada mencit didapatkan bahwa daun sirsak diketahui memiliki kandungan metabolit sekunder berupa tannin, steroid, flavonoid, dan alkaloid.

METODE PENELITIAN

Desain, Tempat, dan Waktu Penelitian

Jenis Penelitian adalah penelitian laboratorium *true experimental* dengan desain penelitian *post test group control only* pada *zebrafish* (*Danio rerio*) yang diinduksi sukrosa 4% dan kombucha daun sirsak 150, 300, 600 ppm. Sebelum dilakukan penelitian *zebrafish* (*Danio rerio*), dilakukan terlebih dahulu aklimatisasi selama 1 minggu. Penelitian dilakukan pada 9 Desember 2024 – 18 Januari 2025 di Laboratorium *zebrafish* FK UNISMA dan Laboratorium Riset FK UNISMA. Penelitian ini telah disetujui oleh Komite Etik Penelitian Kesehatan Rumah Sakit Islam Malang dengan No.49/KEPK/RSI-U/X/2024.

Metode Pengambilan Sampel Penelitian

Zebrafish yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan *zebrafish* dewasa usia antara 4-5 bulan untuk mendapat hasil yang optimal. Untuk memastikan bahwa spesies yang digunakan adalah benar *zebrafish* (*Danio rerio*) dilakukan determinasi spesies ke Unit Layanan Manajemen Kesehatan Ikan dan Lingkungan Perairan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga. Hasil surat determinasi nomor 53/ULMKILP/UA.FPK/10/2024. Penghitungan jumlah sampel dengan rumus Federer sebagai berikut:

$$(p-1)(n-1) \geq 15$$

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 \rightarrow \text{dibulatkan } 5$$

Keterangan:

p = jumlah perlakuan

n = jumlah pengulangan / minimum sampel penelitian

Tabel 1. Pengelompokan Hewan Coba

Kelompok	Jumlah (n)	Perlakuan
Kelompok Negatif (KN)	5	•Tanpa Sukrosa 4%
Kelompok Positif (KP)	5	• Sukrosa 4%
Perlakuan 150 ppm (P1)	5	• Sukrosa 4% • Kombucha Daun Sirsak 150 ppm
Perlakuan 300 ppm (P2)	5	• Sukrosa 4% • Kombucha Daun Sirsak 300 ppm
Perlakuan 600 ppm (P3)	5	• Sukrosa 4% • Kombucha Daun Sirsak 600 ppm

Metode Pembuatan Kombucha Daun Sirsak dan Sukrosa 4%

Tahapan pembuatan kombucha daun sirsak diawali dengan penyediaan rebusan serbuk daun sirsak. Air sebanyak 1000 ml direbus hingga mencapai suhu 100°C. Selanjutnya kantung teh yang telah terisi 12 gram simplisia daun sirsak dimasukkan dan direbus selama 5 menit. Air rebusan kemudian ditambahkan gula sebanyak 10% (b/v) dan dilakukan pengadukan. Larutan dimasukkan ke dalam bioreactor (stoples kaca/jar) steril ditutup rapat dan didinginkan hingga suhu $\pm 25^{\circ}\text{C}$, selanjutnya ditambahkan dengan starter kombucha SCOBY sebanyak 5% (v/v). Jar ditutup dengan serbet kertas dan diikat menggunakan karet, untuk menghindari adanya kontaminasi dari debu, kotoran, dan partikel yang tidak diinginkan. Jar diletakkan pada ruangan yang gelap dan dalam suhu ruang $\pm 25^{\circ}\text{C}$ selama 10-14 hari. Pengambilan sampel untuk analisa dilakukan setelah 10-14 hari dengan mengecek pH 3-5⁴³. Sedangkan perhitungan konsentrasi sukrosa dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$K = \left(\frac{\text{massa gula}}{\text{volume larutan}} \right) \times 100$$

Keterangan:

K : Konsentrasi gula

Penyiapan Hewan Uji

Zebrafish (*Danio rerio*) yang digunakan adalah *zebrafish* jantan dewasa, dengan ukuran panjang 1-3 cm dengan berat 0,4-1 gram, diatur dengan pencahayaan terprogram 12 jam terang dan 12 jam gelap, air yang digunakan adalah air jernih dengan temperatur 26° C, pH air harus dalam kisaran 6,0-8,1. *zebrafish* pada masing akuarium dan di aklimatisasi selama 7 hari. Selama penelitian

dilakukan beberapa prosedur perawatan sebagai berikut: khusus untuk kelompok negatif (KN) pakan diberikan 2 kali sehari (pagi dan siang hari dengan pakan ikan pf 100) sedangkan untuk kelompok perlakuan (KP) dan kelompok dosis 150, 300, dan 600 ppm tidak diberikan pakan. Penerangan : 14 jam terang dan 10 jam gelap. pH : 6,0-8,1. Suhu air : 26°C. Pemberian oksigen (diberikan dengan pemasangan aerator).

Perlakuan Hewan Uji

Semua ikan diadaptasikan dengan kondisi laboratorium yang konstan dengan frekuensi pemberian pakan pelet 2 kali setiap hari. Pergantian air dilakukan 2 hari sekali untuk menjaga lingkungan hidup ikan uji agar tetap bersih⁴⁴. Dosis kombucha daun sirsak yang digunakan untuk penelitian ini sebanyak 150, 300, dan 600 ppm. Setelah 7 hari, *zebrafish* diberi perlakuan dengan penambahan sukrosa 4% dan kombucha daun sirsak dengan kadar 150, 300, dan 600 ppm selama 28 hari ke dalam tangki akuarium, air diganti tiap 2 hari sekali dengan cara membuang 1,5 liter air dan menggantinya dengan jumlah yang sama yang berisi campuran sukrosa 4%, air dan kombucha daun sirsak⁶.

Pembuatan Preparat Histologi

Preparat histologi dibuat berdasarkan prosedur yang mengacu pada^{45,46}, terdapat beberapa prosedur di antaranya tahap fiksasi, dehidrasi, *clearing*, impregnasi, pemotongan, pewarnaan (*staining*), penempelan (*mounting*).

Pengamatan Ketebalan Dinding Aorta

Untuk melihat diameter aorta preparat histologi diperiksa di bawah mikroskop kemudian diukur pada 2 dinding paling tebal dan 2 dinding paling tipis dari aorta yang dilakukan dengan pembesaran 400x kemudian di rata-rata. Dan untuk melihat ketebalan dinding pembuluh darah aorta dilakukan pengukuran pada tunica media atau lapisan otot polos pembuluh darah aorta *zebrafish*. Pengukuran dilakukan menggunakan menu *Straight* → *Analyze* → *Measure* pada aplikasi *ImageJ*.

Pengamatan Luas Area Kolagen Aorta

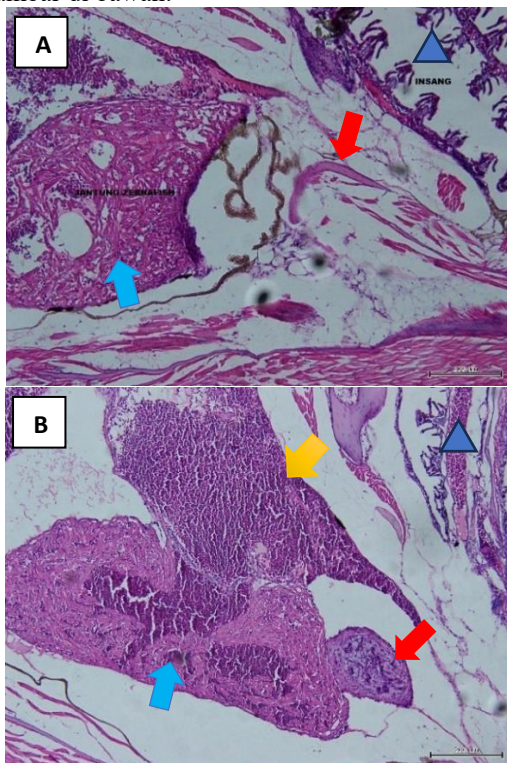
Preparat pembuluh darah aorta yang telah diambil dan dilakukan pewarnaan MT kemudian diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Untuk menghitung luas area kolagen dilakukan dengan *ImageJ* menggunakan menu *Image RGB stack* dan penyesuaian *adjust threshold* dengan menggeser tombol dan melakukan sampling agar warna kolagen yang terdeteksi sesuai dengan gambar sebenarnya. kemudian dengan menu *measure* didapatkan persentase densitas kolagen⁴⁷.

Analisis Data

Uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Dari uji normalitas, analisis data ketebalan dinding aorta terdapat data yang tidak signifikan ($p > 0.05$), dan analisis data luas area kolagen terdapat data yang tidak signifikan ($p > 0.05$). Dengan demikian dilakukan uji non-parametrik *Kruskall wallis* dan *Mann-whitney*. Uji ketebalan dinding aorta dilanjutkan dengan *Kruskall wallis* dan didapatkan tidak ada perbedaan signifikan pada kelima kelompok perlakuan KN, KP, P1, P2, dan P3 ($P=0.006$). Sedangkan untuk analisis data luas area kolagen aorta *zebrafish* dengan menggunakan *Kruskall wallis* didapatkan ada perbedaan signifikan ($p=0.001$), sehingga uji antar kelompok KN, KP, P1, P2, dan P3 dilanjutkan dengan *Mann-whitney*.

HASIL

Hasil pengamatan preparat menggunakan 2 pewarnaan yaitu HE dan MT dapat dilihat pada gambar di bawah:

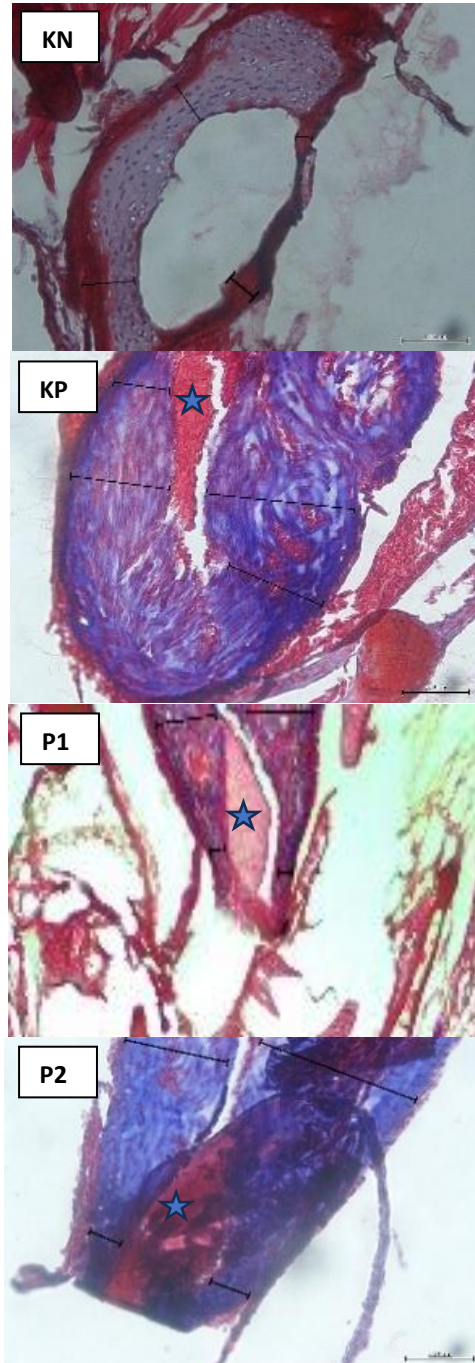


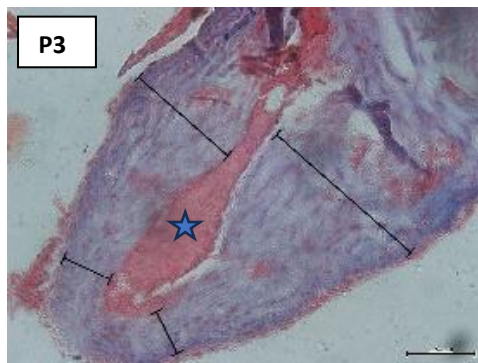
Gambar 1 Pewarnaan organ jantung dan bulbus aorta *zebrafish* (*Danio rerio*) pembesaran 100x, pewarnaan HE

Keterangan: (A) dan (B) Gambar A dan B menunjukkan pewarnaan jantung *zebrafish* menggunakan pewarna HE. Jantung ditunjukkan oleh panah biru, dan untuk mengidentifikasi bulbus aorta/aorta ditunjukkan oleh panah merah yang berada di sebelah ventral dari jantung. Sedangkan panah berwarna kuning menunjukkan atrium jantung *zebrafish*. Organ jantung dapat ditemukan berada di bawah insang (tanda segitiga biru).

Hasil Pengamatan Histologi Ketebalan Dinding Aorta *Zebrafish* (*Danio rerio*)

Ketebalan dinding aorta *zebrafish* ditunjukkan pada **Gambar 2** Ketebalan dinding aorta diukur pada 2 dinding pembuluh aorta paling tebal dan 2 dinding aorta paling tipis oleh 3 orang pengamat kemudian di rata-rata. Hasil analisis data ketebalan dinding aorta *zebrafish* dari kelima kelompok (KN, KP, P1, P2, P3) ditunjukkan pada **Tabel 2** dibawah.





Gambar 2 Hasil pengamatan histologi ketebalan dinding aorta zebrafish (*Danio rerio*) pembesaran 400x, pewarnaan MT

Keterangan: (KN), (KP), (P1), (P2), dan (P3) Berturut-turut adalah preparat kelompok kontrol negatif, kontrol positif, kelompok dosis 150 ppm, kelompok dosis 300 ppm, dan kelompok dosis 600 ppm. Garis bar hitam (4 buah garis) menunjukkan ketebalan dinding aorta yang diukur sepanjang tunika media pembuluh darah aorta. Tanda bintang biru menunjukkan adanya darah yang terdistribusi di dalam lumen bulbus aorta *zebrafish* sebelum dipompakan keluar menuju insang.

Tabel 1 Hasil analisis ketebalan dinding pembuluh darah aorta zebrafish

Kelompok	n (sampel)	Ketebalan Dinding Aorta (μm) (Rata-rata ± SD)
Kelompok Negatif (KN)	5	44.24 ±16.87 ^a
Kelompok Positif (KP)	5	154.19 ±93.76 ^b
Pertakuan 150 ppm (P1)	5	72.9 ±43.98 ^b
Pertakuan 300 ppm (P2)	5	110.24 ±72.61 ^b
Pertakuan 600 ppm (P3)	5	138.27 ±107.72 ^b

Tabel 3 Selisih ketebalan dinding pembuluh darah aorta zebrafish

Perlakuan	Kelompok		Selisih
Sukrosa 4%	KN (44.24 μm)	KP (154.19 μm)	109.95 μm ↑
	KP (154.19 μm)	P1 (72.9 μm)	81.29 μm ↓
Sukrosa 4%+Kombucha daun sirih 150, 300, 600 ppm	KP (154.19 μm)	P2 (110.24 μm)	43.95 μm ↓
	KP (154.19 μm)	P3 (138.27 μm)	15.92 μm ↓
			↓

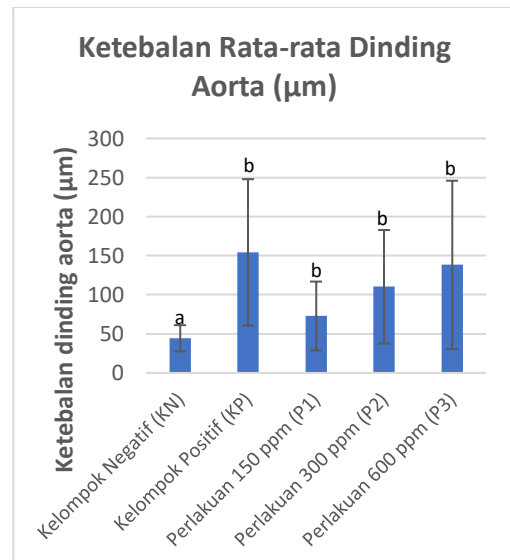


Diagram 1. Histogram Ketebalan Dinding Aorta Zebrafish

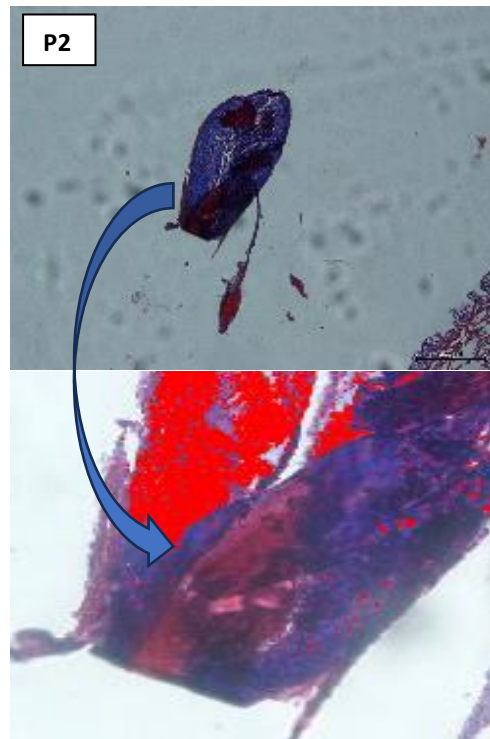
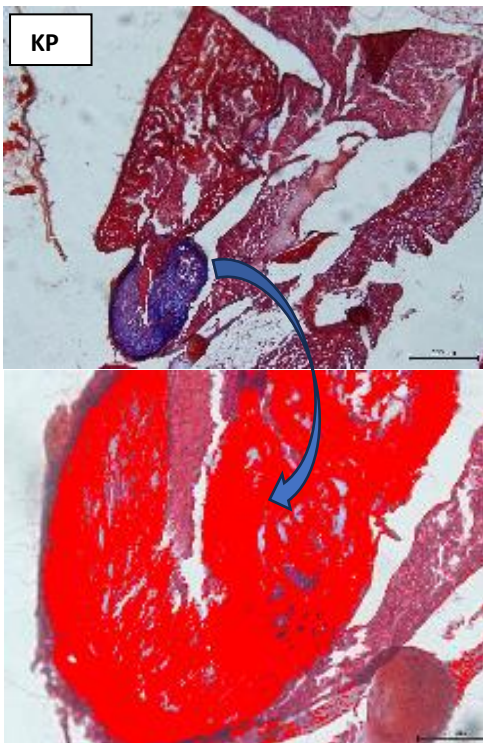
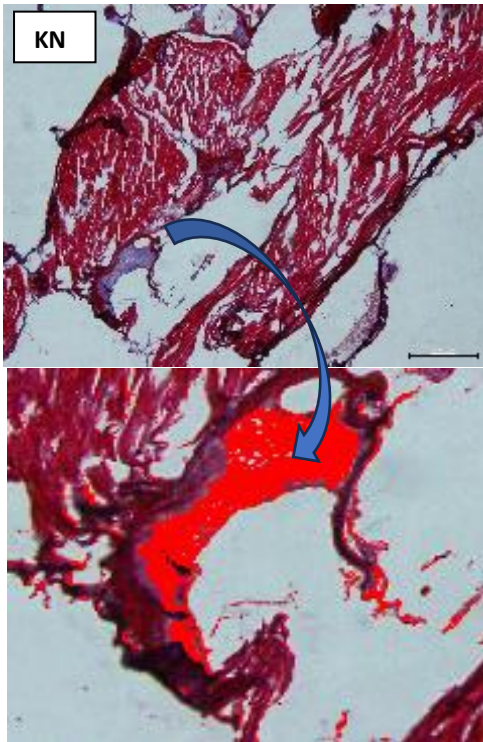
Keterangan: Ketebalan dinding pembuluh darah (rata-rata ± SD). Data pada tabel diuji menggunakan uji non-parametrik dan *kruskal wallis*. Hasil menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan pada semua kelompok (KN, KP, P1, P2, dan P3) dengan $p = 0.06$.

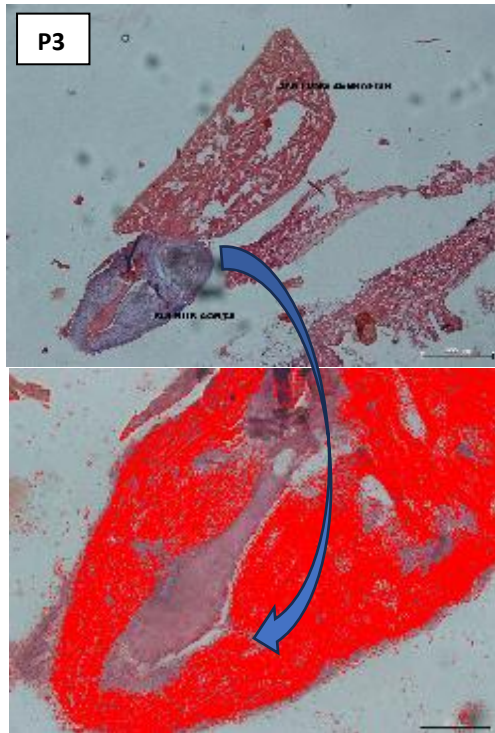
KN: Kelompok Negatif, KP: Kelompok Positif yang diinduksi sukrosa 4%, P1: Kelompok yang diinduksi sukrosa 4% + dosis kombucha daun sirih 150 ppm, P2: Kelompok yang diinduksi sukrosa 4% + dosis kombucha daun sirih 300 ppm, P3 : Kelompok yang diinduksi sukrosa 4% + dosis kombucha daun sirih 600 ppm

Berdasarkan hasil analisis statistik pada Tabel 2 tidak ada perbedaan signifikan pada ketebalan dinding aorta *zebrafish* di semua kelompok ($p = 0.06$). Apabila dilihat secara angka pada histogram kelompok P1, P2, dan P3 berturut-turut adalah 72.9 μm, 110.24 μm, dan 138.27 μm.

Hasil Pengamatan Histologi Luas Area Kolagen Aorta Zebrafish (*Danio rerio*)

Luas area kolagen pembuluh darah aorta *zebrafish* ditunjukkan pada Gambar 3 Kolagen pada tunika media atau pada lapisan sel otot polos pembuluh darah dapat dilihat pada area yang berwarna biru. Pengukuran dilakukan dengan melakukan *sampling* warna kolagen (biru) kemudian dilanjutkan *measurement* di aplikasi *image-J* oleh 3 orang pengamat kemudian di rata-rata.





Gambar 3 Hasil pengamatan histologi luas area kolagen aorta *zebrafish* (*Danio rerio*) pembesaran 400x, pewarnaan MT

Keterangan: (KN), (KP), (P1), (P2), dan (P3) Berturut-turut adalah preparat kelompok kontrol negatif, kontrol positif, kelompok dosis 150 ppm, kelompok dosis 300 ppm, dan kelompok dosis 600 ppm. Bagian aorta yang ter-blok berwarna merah menunjukkan produksi area kolagen yang ter-sampling menggunakan aplikasi *image-J*.

Tabel 4 Hasil analisis luas area kolagen aorta (*Danio rerio*) *zebrafish*

Kelompok	n (sampel)	Luas Area Kolagen Aorta (μm^2) (Rata-rata $\pm$ SD)
Kelompok Negatif (KN)	5	43543.11 $\pm$ 11151.87 ^a
Kelompok Positif (KP)	5	252568.43 $\pm$ 191198.97 ^b
Pertakuan 150 ppm (P1)	5	42833.02 $\pm$ 23582.17 ^a
Pertakuan 300 ppm (P2)	5	93189.69 $\pm$ 74867.99 ^c
Pertakuan 600 ppm (P3)	5	299944.35 $\pm$ 218757.12 ^b

Tabel 5 Selisih luas area kolagen aorta (*Danio rerio*) *zebrafish*

Perlakuan	Kelompok		Selisih
Sukrosa 4%	KN (43543.11 μm^2)	KP (252568.43 μm^2)	209025.32 μm^2 $\uparrow$
	KP (252568.43 μm^2)	P1 (42833.02 μm^2)	209735.41 μm^2 $\downarrow$
Sukrosa 4%+Kombucha daun sirih 150, 300, 600 ppm	KP (252568.43 μm^2)	P2 (93189.69 μm^2)	159378.74 μm^2 $\downarrow$
	KP (252568.43 μm^2)	P3 (299944.35 μm^2)	47375.92 μm^2 $\uparrow$

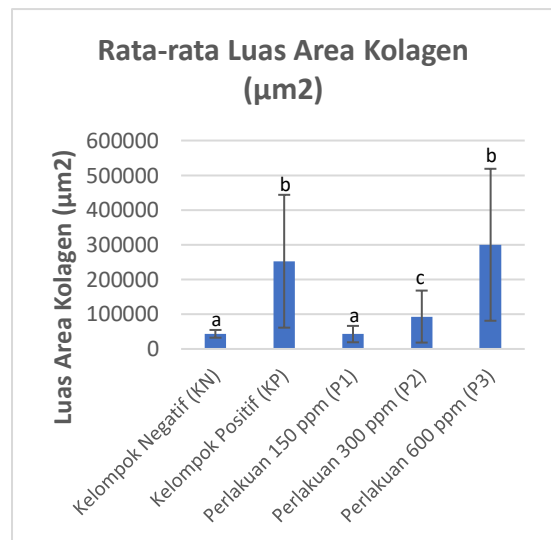


Diagram 1. Histogram Ketebalan Dinding Aorta *Zebraphish*

Keterangan :

a : KN berbeda signifikan dengan KP, P2 dan P3 ($p < 0.05$)

P1 berbeda signifikan dengan KP, P2 dan P3 ($p < 0.05$)

b : KP berbeda signifikan dengan KN, P1, dan P2 ($p < 0.05$)

P3 berbeda signifikan dengan KN, P1 dan P2 ($p < 0.05$)

c : P2 berbeda signifikan dengan KN, KP, P1, dan P3 ($p < 0.05$)

Keterangan: Luas kolagen aorta *zebrafish* (rata-rata $\pm$ SD). Data pada tabel diuji menggunakan uji non-parametrik *kruskal wallis* dan dilanjutkan *mann-whitney*. Hasil menunjukkan ada perbedaan signifikan pada kelompok P1 dan P2 dibandingkan dengan kelompok KP, dengan nilai signifikansi P1, $p = 0.001$ dan P2, $p = 0.006$.

Luas area kolagen pada aorta *zebrafish* pada **Tabel 4** menunjukkan KN lebih kecil dibandingkan KP (KN=43543.11 μm^2 dan KP=252568.43 μm^2), ($p=0.001$), dengan selisih peningkatan luas area *collagen* sebesar 209025.32 μm^2 . Pada **Tabel 5** Induksi kombucha daun sirsak kelompok dosis P1 dan P2 menurunkan luas area kolagen sebesar 209735.41 μm^2 dan 159378.74 μm^2 (P1=42833.02 μm^2 dan P2=93189.69 μm^2) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (KP=252568.43 μm^2) ($p<0.05$), namun pada kelompok dosis P3 semakin meningkatkan jumlah produksi kolagen melebihi kelompok KP dengan selisih nilai peningkatan produksi kolagen sebesar 47375.92 μm^2 (P3=299944.35 μm^2).

PEMBAHASAN

Hasil uji *kruskal wallis* menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik terhadap ketebalan dinding aorta antar lima kelompok yang dibandingkan ($p>0,05$). Temuan ini menunjukkan bahwa berdasarkan uji non-parametrik, secara umum hipotesis nol (H_0), yaitu tidak ada perbedaan ketebalan antar kelompok. Namun demikian, pola visualisasi data ketebalan dinding aorta melalui histogram pada **Tabel 2** menunjukkan adanya tren peningkatan ketebalan dinding aorta antara kelompok KP yang lebih tinggi dari kelompok KN, dan tren penurunan ketebalan dinding aorta pada kelompok P1 dan P2 bila dibandingkan dengan KP. Secara numerik, selisih data pada **Tabel 3**, nilai rata-rata kelompok KP dan KN ketebalan aorta *zebrafish* yang diinduksi sukrosa 4% menunjukkan kecenderungan meningkat pada kelompok KP, serta nilai rata-rata ketebalan aorta *zebrafish* yang diinduksi sukrosa 4% dengan kombucha daun sirsak 150 ppm (P1) dan 300 ppm (P2), menunjukkan kecenderungan menurun. Dalam konteks penelitian kesehatan, terutama yang menyangkut struktur anatomi vaskular seperti dinding aorta, perubahan kecil dalam ketebalan dapat memiliki implikasi klinis yang penting, bahkan jika tidak mencapai signifikansi statistik.

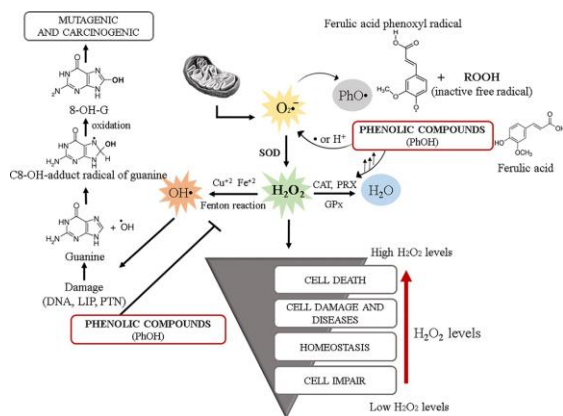
Paparan sukrosa 4% menyebabkan peningkatan ketebalan pembuluh darah aorta *zebrafish* yang mana hasil pemecahan sukrosa berupa glukosa darah akan masuk melalui endothelial sel yang nantinya akumulasi glukosa berlebih ini akan berubah menjadi *reactive oxygen species (ROS)* dan *AGEs formation*. Baik *ROS* atau *AGEs formation* akan menstimulasi jalur PKc dan PKb. Pengaktifan kedua jalur ini akan meningkatkan *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)*, *growth factor*, angiogenesis, dan pertumbuhan sel sehingga menyebabkan peningkatan ketebalan lapisan otot polos pembuluh darah. Yang dapat dilihat pada kelompok KP yang memiliki ketebalan dinding aorta yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok KN dikarenakan paparan glukosa darah yang lebih tinggi.

Penurunan produksi kolagen pada pembuluh darah aorta *zebrafish* sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh (Sanni, 2020) ⁷. Mengenai peran daun sirsak yang berfungsi sebagai anti hiperglikemia melalui perannya dalam inhibisi dari *carbohydrate hydrolyzing enzymes*. Adanya penundaan (*delay*) dari glukosa darah postprandial ini dapat digunakan sebagai bentuk pendekatan terapeutik dalam pengobatan diabetes. Fraksi dari daun sirsak mampu menginhibisi enzim α -amylase and α -glucosidase. Selain itu daun sirsak yang dibuat menjadi teh kombucha berfungsi sebagai pencegah diabetes dengan adanya keberadaan antioksidan penghambat radikal bebas dan memiliki kandungan asam glukonat, serta teh kombucha diketahui memiliki vitamin C dan polifenol. Asam glukonat sendiri penting dalam menjaga membran sel dan menjaga integritas dinding intestinal agar mampu melawan infeksi misalnya dari bakteri *pathogen*. Selain itu, asam glukonat juga berfungsi dalam penyerapan kalsium dalam tubuh dan berperan dalam menurunkan kadar glukosa di dalam darah ⁵. Manfaat kombucha sebagai antioksidan dapat kita peroleh, disebabkan senyawa antioksidan dalam kombucha akan menyerahkan satu elektronnya kepada ROS. Sehingga akan menjadi bentuk molekul yang normal kembali yang mana akan menghambat terjadinya reaksi berantai dari efek radikal bebas (ROS) ⁵.

Pemberian kombucha daun sirsak 150 dan 300 ppm mampu menurunkan luas area kolagen pada aorta *zebrafish* yang diinduksi sukrosa 4 %. Kelompok P1 memiliki luas area kolagen sebesar 42833.02 μm^2 dan kelompok P2 memiliki luas area kolagen sebesar 93189.69 μm^2 . Pada **Tabel 5** kita dapat melihat selisih luas kolagen aorta *zebrafish*, kelompok P1 mampu menurunkan luas area kolagen aorta *zebrafish* sebesar 209735.41 μm^2 dibandingkan dengan KP dengan nilai signifikansi ($p=0.001$). Sedangkan untuk kelompok P2 mampu menurunkan luas area kolagen aorta *zebrafish* sebesar 159378.74 μm^2 dibandingkan dengan KP dengan nilai signifikansi ($p=0.006$). Kelompok P3 menunjukkan luas area kolagen yang sedikit lebih tinggi dibandingkan kelompok KP yakni 299944.35 $\mu\text{m}^2 > 252568.43 \mu\text{m}^2$. Luas area kolagen pada kelompok KN, KP, P1, P2, dan P3 berturut-turut adalah 43543.11 μm^2 , 252568.43 μm^2 , 42833.02 μm^2 , 93189.69 μm^2 , dan 299944.35 μm^2 seperti yang ditunjukkan pada **Tabel 4**.

Fungsi utama antioksidan adalah untuk membersihkan atau menetralkan pembentukan radikal bebas dan menghambat efek buruk ROS. Keseimbangan ROS diperoleh dari molekul non-enzimatik (glutathione, senyawa fenolik, vitamin A, C, dan E) dan antioksidan enzimatik, seperti SOD, reduktase superoksida, CAT, GPx, glutathione reduktase (GR), PRX, dan tioredoksin (TRX). Dimana senyawa fenol aktif dapat kita temukan banyak di kombucha daun sirsak. Regulasi

keseimbangan dari ROS diatur melalui antioksidan endogen dan eksogen. Mitokondria dapat melepaskan superoksida atau H_2O_2 . Senyawa fenolik (misalnya, asam ferulat) dapat bereaksi dengan anion superoksida, menghasilkan radikal fenoksil ($PhO^\bullet$) (misalnya, radikal fenoksil asam ferulat). Di sitosol, anion superoksida dapat diubah menjadi H_2O_2 oleh SOD. Kemudian, H_2O_2 ini diubah menjadi air oleh enzim antioksidan (CAT, GPx, PRx) dan senyawa fenolik merangsang aktivitasnya. Dengan adanya penurunan ROS ini akan memperbaiki matriks komponen yang dikeluarkan oleh otot polos pembuluh darah dan menurunkan produksi kolagennya⁸.



Adanya penurunan kolagen pada kombucha dosis 150 ppm dan 300 ppm sedangkan pada 600 ppm justru semakin meningkatkan kemungkinan timbul akibat *dual face behaviour* senyawa fenol pada proliferasi sel. Selain sebagai antioxidant agent, kandungan senyawa fenol juga bisa menjadi pro-oxidant agent seperti dijelaskan pada penelitian⁴⁸. Dengan kata lain, semakin besar kapasitas antioksidan senyawa fenolik, semakin besar pula potensi pro-oksidannya. Faktor utama yang akan menentukan apakah senyawa fenolik bertindak sebagai antioksidan atau pro-oksidan adalah: pH, konsentrasi senyawa fenolik, keberadaan ion oksigen dan tembaga⁸.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Pemberian sukrosa 4% punya kecenderungan meningkatkan ketebalan dinding aorta *zebrafish* pada kelompok kontrol positif (KP) dibandingkan dengan kontrol negatif (KN), dengan analisa *kruskal wallis* menunjukkan signifikansi ($p=0.06$).
2. Dengan melihat pola visualisasi data ketebalan dinding aorta melalui histogram, dan selisih data secara numerik, pemberian kombucha daun sirih 150 ppm dan 300 ppm pada *zebrafish* yang diinduksi sukrosa 4% menunjukkan kecenderungan menurunnya ketebalan dinding aorta. Dengan demikian, hipotesis alternatif (H1) bahwa pemberian

kombucha daun sirih menurunkan ketebalan dinding pembuluh darah aorta *zebrafish* masih layak dipertimbangkan dalam konteks klinis, walaupun tidak didukung secara signifikansi statistik pada analisis awal ini.

3. Pemberian sukrosa 4% meningkatkan luas area kolagen aorta *zebrafish* pada kelompok kontrol positif (KP) dibandingkan dengan kontrol negatif (KN), ($p=0.001$).

4. Pemberian kombucha daun sirih 150 ppm (P1) dan 300 ppm (P2) menurunkan luas area kolagen pada aorta *zebrafish* yang diinduksi sukrosa 4 % secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (KP), dengan nilai signifikansi P1 ($p=0.001$) dan P2 ($p=0.006$). Penurunan ini menunjukkan adanya efek vaskuloprotektif terhadap akumulasi kolagen aorta yang berlebihan, yang berperan dalam proses patologi vaskular. Dengan demikian, hipotesis alternatif (H1) dapat diterima, yaitu bahwa pemberian kombucha daun sirih menurunkan luas area kolagen di pembuluh darah aorta *zebrafish* yang diinduksi sukrosa 4%.

Perlu perhitungan dosis kombucha yang lebih akurat. Terlalu banyak kombucha justru akan merubah anti-oksidan menjadi pro-oksidan. pH yang semakin turun menyebabkan lingkungan air semakin asam. Hal ini diperkirakan menyebabkan asidosis dalam darah dan menyebabkan *zebrafish* bekerja keras untuk mampu mengatasi keasaman tersebut dan akhirnya merusak pembuluh darah aorta jantungnya. Perlu adanya cara untuk mengatasi/memodifikasi kondisi keasaman tanpa mengurangi atau menghilangkan asam dari kombucha karena memang asam/fermentasi kombucha yang kita gunakan untuk herbal. Untuk menghindari simpangan baku data yang tinggi, sampel preparat histologi aorta jantung *zebrafish* dibuat dengan orientasi yang sesuai.

DAFTAR PUSTAKA

1. Soelistijo S. Pedoman Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 Dewasa di Indonesia 2021. Glob Initiat Asthma [Internet]. 2021;46. Available from: www.ginasthma.org.
2. Heckler K, Kroll J. Zebrafish as a model for the study of microvascular complications of diabetes and their mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9):1–9.
3. van Gerwen J, Shun-Shion AS, Fazakerley DJ. Insulin signalling and GLUT4 trafficking in insulin resistance. *Biochem Soc Trans*. 2023;51(3):1057–69.
4. Adeva-Andany MM, Castro-Quintela E, Fernández-Fernández C, Carneiro-Freire N, Vila-Altesor M. The role of collagen homeostasis in the pathogenesis of vascular disease associated to insulin resistance. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev*.

- 2019;13(3):1877–83.
5. Wahab SMA, Jantan I, Haque MA, Arshad L. Exploring the leaves of *Annona muricata* L. as a source of potential anti-inflammatory and anticancer agents. *Front Pharmacol*. 2018;9(JUN):1–20.
6. Narko T, Wibowo MS, Damayanti S, Wibowo I. Acute toxicity tests of fermented robusta green coffee using zebrafish embryos (*Danio rerio*). *Pharmacogn J*. 2020;12(3):485–92.
7. Sanni O, Erukainure OL, Oyeboode OA, Islam MS. Fractions from *Annona muricata* attenuate oxidative stress in pancreatic tissues, inhibits key carbohydrate digesting enzymes and intestinal glucose absorption but enhances muscle glucose uptake. *J Food Biochem*. 2020;44(6):1–10.
8. Andrés CMC, Pérez de la Lastra JM, Juan CA, Plou FJ, Pérez-Lebeña E. Polyphenols as Antioxidant/Pro-Oxidant Compounds and Donors of Reducing Species: Relationship with Human Antioxidant Metabolism. *Processes*. 2023;11(9).
9. Dorsemans AC, Lefebvre d'hellencourt C, Ait-Arsa I, Jestin E, Meilhac O, Diotel N. Acute and chronic models of hyperglycemia in zebrafish: A method to assess the impact of hyperglycemia on neurogenesis and the biodistribution of radiolabeled molecules. *J Vis Exp*. 2017;2017(124):4–11.
10. Fadlilah S, Sucipto A, Rahil NH, Sumarni. Soursop Leaf (*Annona Muricata* L.) Effective on Reducing Blood Sugar Levels. *Media Kesehat Masy Indones*. 2020;16(1):15–25.
11. Gleeson M, Connaughton V, Arneson LS. Induction of hyperglycaemia in zebrafish (*Danio rerio*) leads to morphological changes in the retina. *Acta Diabetol*. 2007;44(3):157–63.
12. Rahmawanti A, Setyowati DN, Mukhlis A. Histopathological of Brain, Eye, Liver, Spleen Organs of Grouper Suspected VNN in Penyambuan Village, North Lombok. *J Biol Trop*. 2021;21(1):140–8.
13. Mäkimattila S, Yki-Järvinen H. Endothelial dysfunction in human diabetes. *Curr Diab Rep*. 2002;2(1):26–36.
14. Srivastava P, Badhwar S, Chandran DS, Jaryal AK, Jyotsna VP, Deepak KK. Imbalance between Angiotensin II - Angiotensin (1-7) system is associated with vascular endothelial dysfunction and inflammation in type 2 diabetes with newly diagnosed hypertension. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* [Internet]. 2019;13(3):2061–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.04.042>
15. Lukitawati W. *Rattus norvegicus* THE EFFECT OF KOMBUCHA TEA ON BLOOD GLUCOSE LEVELS OF *Rattus norvegicus* Windy Lukitawati Prodi Kimia, Jurusan Kimia, Universitas Negeri Surabaya. *UNESA J Chem*. 2013;2(1).
16. Hadi HAR, Al Suwaidi JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag*. 2007;3(6):853–76.
17. Jia G, Bai H, Mather B, Hill MA, Jia G, Sowers JR. Diabetic Vasculopathy: Molecular Mechanisms and Clinical Insights. *Int J Mol Sci*. 2024;25(2):1–18.
18. Ribeiro-Oliveira A, Nogueira AI, Pereira RM, Vilas Boas WW, Souza dos Santos RA, Simões e Silva AC. The renin-angiotensin system and diabetes: An update. *Vasc Health Risk Manag*. 2008;4(4):787–803.
19. Wasserman DH, Wang TJ, Brown NJ. The vasculature in prediabetes. *Circ Res*. 2018;122(8):1135–50.
20. Zorofchian Moghadamtousi S, Karimian H, Rouhollahi E, Paydar M, Fadaeinasab M, Abdul Kadir H. *Annona muricata* leaves induce G1 cell cycle arrest and apoptosis through mitochondria-mediated pathway in human HCT-116 and HT-29 colon cancer cells. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2014;156:277–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.08.011>
21. 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.
22. Ragasa CY, Soriano G, Torres OB, Don MJ, Shen CC. Acetogenins from *Annona muricata*. *Pharmacogn J*. 2012;4(32):32–7.
23. Bidell MP. Research Paper. *Couns Psychol Rev*. 2016;31(1):67–76.
24. Rady I, Bloch MB, Chamcheu RCN, Banang Mbeumi S, Anwar MR, Mohamed H, et al. Anticancer Properties of *Graviola* (*Annona muricata*): A Comprehensive Mechanistic Review. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018.
25. Laksmiawati DR, Prasanti AP, Larasinta N, Syauta GA, Hilda R, Ramadaniati HU, et al. Anti-inflammatory potential of gandarusa (*Gendarussa vulgaris* nees) and soursoup (*Annona muricata* L) extracts in LPS stimulated-macrophage cell (RAW264.7). *J Nat Remedies*. 2016;16(2):73–81.
26. Villarreal-Soto SA, Beaufort S, Bouajila J, Souchard JP, Taillandier P. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *J Food Sci*. 2018;83(3):580–8.
27. Torres MP, Rachagani S, Purohit V, Pandey P, Joshi S, Moore ED, et al. *Graviola*: A novel promising natural-derived drug that

- inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo through altering cell metabolism. *Cancer Lett.* 2012;323(1):29–40.
28. Khakim MI. Program studi kedokteran fakultas kedokteran universitas islam malang 2020. Repos Univ Islam Malang. 2020;1.
29. Hansen NUB, Willumsen N, Sand JMB, Larsen L, Karsdal MA, Leeming DJ. Type VIII collagen is elevated in diseases associated with angiogenesis and vascular remodeling. *Clin Biochem* [Internet]. 2016;49(12):903–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.05.023>
30. Harun NH, Septama AW, Jantan I. Immunomodulatory effects of selected Malaysian plants on the CD18/11a expression and phagocytosis activities of leukocytes. *Asian Pac J Trop Biomed* [Internet]. 2015;5(1):48–53. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691\(15\)30170-2](http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691(15)30170-2)
31. Harper A, Chapel M, Hodgson G, Malinowski K, Yates I, Garle M, et al. GYY4137, a hydrogen sulfide donor, protects against endothelial dysfunction in porcine coronary arteries exposed to myeloperoxidase and hypochlorous acid. *Vascul Pharmacol* [Internet]. 2023;152(April 2022):107199. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vph.2023.107199>
32. Neutel CHG, Wesley CD, Van Praet M, Civati C, Roth L, De Meyer GRY, et al. Empagliflozin decreases ageing-associated arterial stiffening and vascular fibrosis under normoglycemic conditions. *Vascul Pharmacol.* 2023;152(August).
33. Mastrogiovanni M, Martínez-Navarro FJ, Bowman T V., Cayuela ML. Inflammation in Development and Aging: Insights from the Zebrafish Model. *Int J Mol Sci.* 2024;25(4).
34. Ali Z, Zang J, Lagali N, Schmitner N, Salvenmoser W, Mukwaya A, et al. Photoreceptor degeneration accompanies vascular changes in a zebrafish model of diabetic retinopathy. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2020;61(2).
35. Zhang J, Liang Y, Zeng W, Gao X, Wang D. Inducing aortic aneurysm / dissection in zebra fi sh : evaluating the e ffi cacy of β - Aminopropionic Nitrile as a model. 2024;28(1):84–92.
36. Gore A V., Monzo K, Cha YR, Pan W, Weinstein BM. Vascular development in the zebrafish. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(5):1–22.
37. Van den Branden A, Verhulst A, D'haese PC, Opdebeeck B. New Therapeutics Targeting Arterial Media Calcification: Friend or Foe for Bone Mineralization? *Metabolites.* 2022;12(4).
38. Hoareau M, El Kholti N, Debret R, Lambert E. Zebrafish as a Model to Study Vascular Elastic Fibers and Associated Pathologies. *Int J Mol Sci.* 2022;23(4).
39. Hoareau M, Lorion C, Lecoq L, Berthier A, Pierrat B, Debret R, et al. A synthetic elastic protein as molecular prosthetic candidate to strengthen vascular wall elasticity Keywords. 2023;1–35.
40. Hoareau M, El Kholti N, Debret R, Lambert E. Characterization of the Zebrafish Elastin a (elnasa12235) Mutant: A New Model of Elastinopathy Leading to Heart Valve Defects. *Cells.* 2023;12(10).
41. Quarta S, Santarpino G, Carluccio MA, Calabriso N, Maffia M, Siculella L, et al. Contents continued. *Vascul Pharmacol.* 2023;152:107227.
42. Aloulou A, Hamden K, Elloumi D, et al. Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats. *BMC Complement Altern Med.* 2012;12:63. doi:10.1186/1472-6882-12-63.
43. Barkah MH. Pengaruh lama fermentasi kombucha daun sirsak (*Annona muricata* L.) pada daya hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* [skripsi]. Malang: Universitas Islam Malang; 2021. Tersedia dari: <http://repository.unisma.ac.id/handle/123456789/XXXX> (URL lengkap perlu diperiksa kembali karena tidak lengkap).
44. Gleeson M, Connaughton V, Arneson LS. Induction of hyperglycaemia in zebrafish (*Danio rerio*) leads to morphological changes in the retina. *Acta Diabetol.* 2007;44(3):157–63. doi:10.1007/s00592-007-0257-3.
45. Rahmawanti A, Setyowati DN, Mukhlis A. Histopathological of brain, eye, liver, spleen organs of grouper suspected VNN in Penyambuan Village, North Lombok. *J Biol Trop.* 2021;21(1):140–8. doi:10.29303/jbt.v21i1.2439.
46. Soesilawati P. Histologi Kedokteran Dasar. Surabaya: Airlangga University Press; 2020. ISBN: 9786024733551.
47. Ferreira T, Rasband W. ImageJ user guide: version 1.46r. ImageJ User Guide. 2012. doi:10.1038/nmeth.2019.

48. do Carmo MAV, Granato D, Azevedo L. Antioxidant/pro-oxidant and antiproliferative activities of phenolic-rich foods and extracts: A cell-based point of view [Internet]. 1st ed. Vol. 98, Advances in Food and Nutrition Research. Elsevier Inc.; 2021. 253–280 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.afnr.2021.02.010>