KOMBUCHA DAUN SIRSAK (*Annona muricata* Linn) MENINGKATKAN JUMLAH NEKROSIS DAN STEATOSIS HEPATOSIT PADA IKAN ZEBRA (*Danio rerio*) YANG DIINDUKSI SUKROSA 4%

Liyana Rahmatika, Aris Rosidah, Dini Sri Damayanti*
Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: : Kombucha daun sirsak (*Annona muricata* Linn) memiliki kandungan senyawa fenolik yang berpotensi sebagai antioksidan, namun terdapat penelitian menyebutkan adanya efek merusak kombucha terhadap hepar. Oleh sebab itu, penelitian bertujuan untuk membuktikan pengaruh kombucha daun sirsak terhadap jumlah hepatosit nekrosis dan steatosis pada ikan zebra yang diinduksi sukrosa 4 %.
Metode: Penelitian ini berupa studi eksperimental dengan *post test control group design.* Ikan zebra (*Danio rerio*) jantan dewasa dibagi dalam 5 kelompok yaitu kontrol negatif (KN), kontrol positif (KP), kelompok perlakuan kombucha daun sirsak 1,25 % (P1), 2,5% (P2) dan 5% (P3). Jumlah sampel tiap kelompok terdiri dari 5 ekor yang diinduksi sukrosa 4 % selama 28 hari. Pada akhir perlakuan, ikan dianestesi dan dilakukan pembuatan preparat histologi hepar dengan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE). Nekrosis dan steatosis sel hepatosit dihitung secara manual oleh 3 pengamat, diamati dengan mikroskop trinokuler BX53M pada 5 lapang pandang, dihitung menggunakan *software image J.* Analisis data nekrosis dan steatotis hepatosit menggunakan *One way* ANOVA dengan $p<0.05$.
Hasil: Jumlah nekrosis hepatosit KN(11.00±1.225) lebih rendah dibandingkan KP, P1, P2, dan P3 (35.40±10.407; 26.00±4.062; 36.80±8.349; 44.20±7.050) dengan p=0,036; p=0,005; p=0,013; p=0,002. P1, P2, P3 secara berurutan (26.00±4.062; 36.80±8.349; 44.20±7.050) tidak berbeda dengan KP (p=0,545; p=1,000; p=0,709) dan P1 lebih rendah dibandingkan P3(p=0,016). Pada jumlah steatosis hepatosit KN (11.40±10.213) berbeda dengan KP, P1, P2, dan P3 (19.60±4.722; 21.80±1.304; 22.60±3.435; 24.20±5.450) dengan p=0,038; p=0,011; p=0,006; p=0,002.
Kesimpulan: Kombucha daun sirsak (*Annona muricata* Linn) pada semua dosis tidak mampu menurunkan jumlah nekrosis dan steatosis hepatosit ikan zebra jantan yang diinduksi sukrosa 4%.
***Kata Kunci*:** Ikan zebra (*D.rerio*), kombucha daun sirsak, sukrosa, nekrosis hepatosit, steatosis hepatosit
*Korespondensi: Dr.dr. Dini Sri Damayanti, M.Kes (dinisridamayanti@unisma.ac.id)
Jl. MT Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65145

KOMBUCHA OF SOURSOP LEAF (*Annona muricata* Linn) INCREASING THE AMOUNT OF ZEBRAFISH (*Danio rerio*) HEPATOCYTE NECROSIS AND STEATOSIS INDUCED WITH SUCROSE 4 %

Liyana Rahmatika, Aris Rosidah, Dini Sri Damayanti*
Faculty of Medicine, Islamic University of Malang

ABSTRACT

Introduction: Soursop leaf kombucha (*Annona muricata* Linn) contains phenolic compounds which have the potential to act as antioxidant, however there are other studies that mention that kombucha has a toxic effects on the liver. Therefore, this study aims to prove the effect of soursop leaf kombucha on the amount of necrotic and steatosis hepatocyte induced with sucrose 4 % in zebrafish.
Methods: This research is an experimental study with post test control group design. Adult male zebrafish are distributed into 5 groups consisting of negative control group (KN), positive control group (KP), soursop leaf kombucha treatment groups of 1,25 % (P1), 2,5% (P2) and 5% (P3). The number of samples in each group consisted of 5 heads induced with sucrose 4 % for 28 days. At the end of the treatment, the fish were anesthetized and liver histological preparations were made with Hematoxylin Eosin (HE) staining. Hepatocyte cell necrosis and steatosis were counted manually by 3 observers, observed with a BX53M trinocular microscope in 5 field of view, calculated using image J software. Data analysis of hepatocyte necrosis and steatosis used One way ANOVA with $p<0.05$.
Results: The amount of hepatocyte necrosis in KN was lower than in KP, P1, P2, dan P3 (35.40±10.407; 26.00±4.062; 36.80±8.349; 44.20±7.050) with p=0,036; p=0,005; p=0,013; p=0,002. P1, P2, P3 were respectively (26.00±4.062; 36.80±8.349; 44.20±7.050) not different from KP (p=0,545; p=1,000; p=0,709) and P1 was lower than in P3(p=0,016). The amount of hepatocyte steatosis in the KN (11.40±10.213) different from KP, P1, P2, dan P3 (19.60±4.722; 21.80±1.304; 22.60±3.435; 24.20±5.450) with p=0,038; p=0,011; p=0,006; p=0,002.
Conclusion: Soursop leaf kombucha (Annona muricata Linn) at all doses can't reduce the amount of necrosis and steatosis of male zebrafish hepatocytes induced with sucrose 4%
Keywords: Zebrafish (*D.rerio*), soursop leaf kombucha, sucrose, hepatocyte necrosis, hepatocyte steatosis

PENDAHULUAN

Sukrosa (disakarida) terdiri dari fruktosa dan glukosa. Sukrosa dapat berkontribusi pada peningkatan kadar gula darah karena memiliki indeks glikemik yang lebih tinggi dibandingkan gula lain, yaitu sebesar 63-73[1]. Hiperglikemia ditandai dengan kadar Glukosa Darah Sewaktu (GDS) lebih dari 200 mg/dL atau Glukosa Darah Puasa (GDP) lebih dari 126 mg/dL[2]. Hiperglikemia dapat mempercepat pembentukan AGEs yang bersifat toksik dalam tubuh[3].

Secara umum, hati bisa mengontrol banyak hal seperti jalur glikolisis dan metabolisme glikolipid. Tingginya asupan makan berlebihan bisa menyebabkan kondisi hiperglikemia yang akan mengakibatkan peningkatan glikolisis dan menghambat glukoneogenesis sehingga produksi glukosa dalam keadaan basal meningkat. Hiperglikemia bisa menimbulkan kerusakan hati yang ditandai dengan terbentuknya perlemakan hati dan nekrosis hepatosit[4]. Perlemakan hati atau disebut dengan steatosis hepatosit merupakan akumulasi abnormal trigliserida (TG) dalam sel parenkim hepar yang bersifat reversibel[3]. Tertimbunnya lipid dalam hepar bisa mengakibatkan cedera seluler berupa nekrosis hepatosit[5]. Nekrosis adalah kematian sel yang ireversibel bisa mengenai sebagian jaringan atau seluruh organ. Keadaan hiperglikemia dapat mengubah histologis hati yang tergambarkan oleh keadaan hepatosit yang mengalami kehilangan membran inti sel, kariopiknosis, dan nekrosis hepatosit[4]. Terdapat ciri-ciri nekrosis yang terlihat pada hepatosit yaitu inti hepatosit menggelap, mengkerut dengan tepi ireguler (piknosis), inti terfragmentasi (karioreksis), serta kromatin pucat dan inti sel menghilang (kariolisis)[6].

Salah satu cara untuk mencegah terjadinya diabetes atau menurunkan hiperglikemia yaitu dengan mengonsumsi minuman herbal seperti kombucha daun sirsak. Kombucha daun sirsak memiliki kandungan asam organik, vitamin, probiotik dan senyawa fenolik. Senyawa fenolik dapat menurunkan radikal bebas dan stres oksidatif serta berperan sebagai aktivitas antioksidan[7]. Selain itu, kombucha mampu menurunkan gula dan kolesterol yang tinggi dalam darah serta dapat memperbaiki imunitas tubuh[8]. Studi lain menunjukkan bahwa bakteri Lactobacillus yang terkandung dalam SCOBY membentuk senyawa fenol bentuk aglikon dengan cara menghilangkan glukosa yang terikat pada fenol yang berpengaruh meningkatkan efisiensi senyawa aktif tanpa mengubah kadarnya[9].

Keuntungan fenol dalam bentuk aglikon mudah diserap oleh intestinal daripada dalam bentuk glikosida. Selain itu, *Lactobacillus* dapat merangsang peningkatan produksi makrofag berperan dalam memfagosit patogen di dalam tubuh. Bakteri asam laktat memiliki kemampuan bakterisidal dengan cara memproduksi bakteriosin [10].

Akan tetapi terdapat penelitian lain yang menyatakan bahwa kombucha memiliki efek merusak terhadap hepar. Kombucha dapat menyebabkan hepar injury, reaksi alergi, *Acute Kidney Injury* (AKI), dan asidosis laktat[11]. Kerusakan yang terbentuk pada hepar dapat dilihat dari peningkatan kadar serum enzim hepar serta peningkatan jumlah nekrosis dan steatosis pada sel hepatosit. Banyak penelitian tentang kerusakan hepar akibat minuman herbal dengan melihat kadar AST dan ALT serum, sedangkan masih belum didapatkan penelitian yang mengukur jumlah sel hepatosit yang mengalami nekrosis dan steatosis sebagai indikator gangguan fungsi hepar. Oleh karena itu, dilakukannya penelitian ini untuk mengetahui pengaruh kombucha daun sirsak terhadap nekrosis dan steatosis pada hepar ikan zebra yang diinduksi sukrosa 4%.

METODE PENELITIAN

Desain, Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini menggunakan laboratorium T*rue Experimental* dengan desain penelitian *Post Test Group Control Only*. Penelitian dimulai dari bulan Januari hingga Februari 2025 di Laboratorium *Zebrafish* dan Laboratorium Riset Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang (FK UNISMA). Komite Etik Penelitian Kesehatan Rumah Sakit Islam Malang telah menyetujui penelitian ini dengan nomor **49/KEPK/RSI-U/X/2024.**

Sampel dan Pengelompokan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah ikan zebra (*Danio rerio*), yang berasal dari indukan lokal Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Brawijaya. Ikan zebra (*Danio rerio*) telah dideterminasi di Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga dengan nomor **53/ULMKILP/UA.FPK/10/2024.** Ikan zebra (*Danio rerio*) berjenis kelamin jantan, dewasa dengan berat 0,4-1 gram, usia 4-5 bulan, kondisi sehat dan tidak cacat. Ikan zebra jantan dikelompokkan menjadi 5 kelompok secara *random sampling* (**Tabel 1**) yang diletakkan dalam kolam yang terisi 2 liter air[12]. Air induksi diganti setiap 2 hari sekali untuk menghindari pertumbuhan bakteri atau mikroorganisme lainnya[13].

Ikan zebra jantan berusia 4-5 bulan digunakan sebagai hewan laboratorium untuk penelitian ini karena memiliki kemampuan adaptasi yang baik terhadap paparan glukosa[14]. Kelebihan ikan zebra dewasa karena ikan telah memiliki sistem organ lengkap dan stabil secara fisiologis, sehingga perubahan atau kerusakan jaringan dapat diamati secara lebih jelas dan akurat[15].

Tabel 1. Pengelompokan Hewan Coba

Kelompok	Jumlah (n)	Perlakuan
Kontrol Negatif (KN)	5	•Tanpa Sukrosa 4%
Kontrol Positif (KP)	5	• Sukrosa 4%
Perlakuan 1 (P1)	5	• Sukrosa 4% • Kombucha Daun Sirsak 1,25 %
Perlakuan 2 (P2)	5	• Sukrosa 4% • Kombucha Daun Sirsak 2,5%
Perlakuan 3 (P3)	5	• Sukrosa 4% • Kombucha Daun Sirsak 5%

Pembuatan Kombucha Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn)

Proses pembuatan kombucha daun sirsak diawali dengan menyediakan serbuk daun sirsak yang diperoleh dari Laboratorium Herbal Materia Medica Batu nomor **000.9.3/2962/102.20/2024** yang dimasukkan ke dalam kantong teh sebanyak 12 gram, lalu rebus air sebanyak 1 liter hingga mendidih. Kantong teh daun sirsak dimasukkan kedalam air rebusan selama 5 menit. Air yang telah direbus ditambahkan gula pasir 10% (b/v) dan diaduk. Larutan yang telah dibuat dituangkan ke dalam jar kaca steril, dinginkan sampai suhu 25°C. Starter kombucha SCOBY ditambahkan pada larutan daun sirsak sebanyak 5% (v/v) kemudian jar kaca ditutup rapat menggunakan serbet kertas atau kain steril dan diikat menggunakan karet yang berfungsi mencegah masuknya kontaminasi dalam jar. Jar disimpan ditempat yang terhindar sinar matahari langsung pada suhu ruang 25°C selama 10-14 hari. Penggunaan kombucha daun sirsak dilakukan setelah hari ke 10-14 dengan mengecek pH sebesar 3-5[10].

Pemberian Kombucha Daun Sirsak pada Hewan Coba

Proses aklimatisasi ikan zebra di Laboratorium *Zebrafish* FK UNISMA selama 1 minggu dengan kondisi laboratorium yang konstan (cahaya 12 jam, penyinaran gelap 12 jam, pakan, air, 28°C), dengan pemberian pakan pelet 3 kali sehari. Setelah aklimatisasi, ikan zebra diinduksi sukrosa 4% dan Kombucha Daun Sirsak (KDS) dengan dosis 1,25 %, 2,5%, dan 5% sesuai kelompok selama 28 hari. Pada akhir perlakuan di hari ke 29 sebelum dilakukan pembedahan, ikan zebra dipuasakan selama lebih dari 12 jam, selanjutnya ikan zebra dieutanasia menggunakan air dingin selama 10 menit. Setelah ikan zebra tidak sadar, ikan dikorbankan untuk dilakukan pembedahan dan pembuatan preparat histologi dengan pewarnaan HE

Pembuatan Preparat Histologi Hepar dengan Pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE)

Jaringan hepar diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang dalam larutan buffer fosfat formalin 10%. Setelah itu, jaringan dipotong tipis (±3 mm) yang dimasukkan dalam kaset akan dilakukan proses dehidrasi secara bertahap dengan alkohol 70%, 80% dan 96% selama 1,5 jam tiap masing-masing konsentrasi. Setelah 4,5 jam, jaringan dimasukkan ke dalam larutan xylol I, II dan III selama 1,5 jam. Slide jaringan dimasukkan dua kali ke dalam paraffin cair selama dua jam, kemudian dilanjutkan dengan pemblokan. Selanjutnya dilakukan pemotongan dengan mikrotom (4-5 µm) yang diletakkan dalam *floatingbath* dengan suhu 49°C dan diletakkan di gelas objek dan dikeringkan pada suhu ruang. Setelah preparat kering, dilanjut pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) diawali dengan merendam jaringan dalam xylol dan alkohol. Selanjutnya dibilas dengan air, kemudian direndam dalam Hematoxilin meyer selama tujuh menit, dibilas kembali selama lima menit. Kemudian jaringan ditenggelamkan ke dalam Eosin selama 10 detik, lalu direndam kembali dalam alkohol bertingkat dan dijernihkan dalam xylol masing-masing selama lima menit dan keringkan. Setelah preparat kering, bisa dilakukan mounting. Hasil pewarnaan bisa dilihat dengan bantuan mikroskop untuk menilai perubahan jaringan histopatologi[16].

Perhitungan Jumlah Sel Hepatosit Nekrosis dan Steatosis

Proses penghitungan jumlah sel hepatosit yang mengalami nekrosis dan steatosis secara histologi dengan pembesaran 400x, yang diamati dengan mikroskop trinokuler BX53M pada 5 lapang pandang, dihitung menggunakan *software image J* oleh 3 pengamat yang berbeda. Jumlah sel nekrosis hepatosit ditandai dengan inti piknotik, karioreksis, kariolisis dan membranolisis[6]. Jumlah sel hepatosit steatosis ditandai dengan sel hipertrofik dan inti selnya menghilang[4]. Perhitungan jumlah sel hepatosit yang mengalami kerusakan tiap lapang pandang (LP) dapat dihitung dengan cara dibawah ini :

$$\% \text{ Sel hepatosit abnormal} = \frac{a}{b} \text{ x } 100\%$$

Keterangan :
a = Jumlah nekrosis atau steatosis hepatosit
b = Total sel hepatosit keseluruhan 200 sel per LP

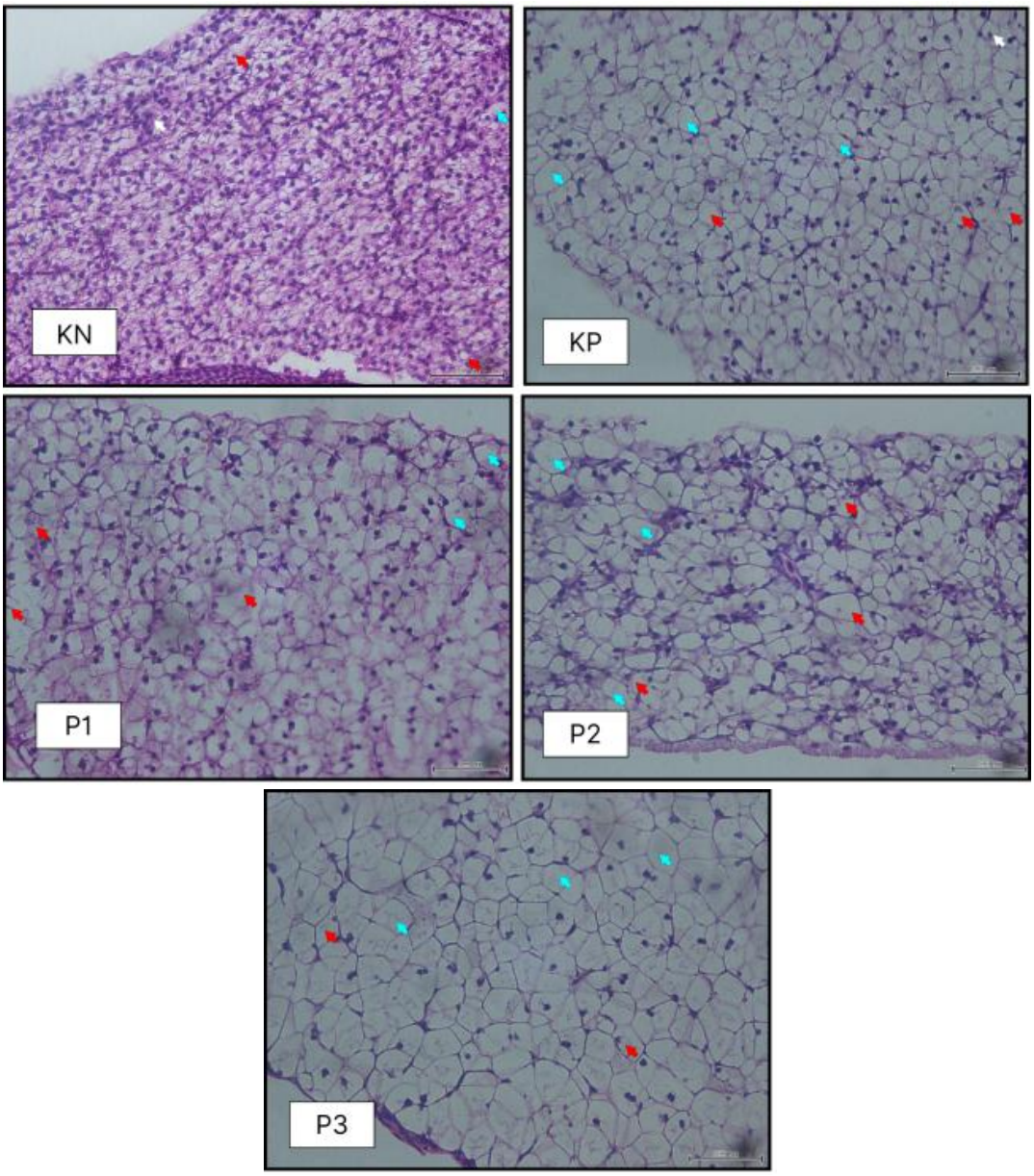
Analisis Data

Data dinyatakan dalam bentuk persentase rata-rata ±SD yang diolah dan dianalisis menggunakan *software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) *27.0 for Windows*. Analisa data dilakukan dengan menggunakan uji *One-way ANOVA* dan *LSD* dengan interval kepercayaan 95% apabila hasil uji homogen dan normal ($p>0.05$). Apabila hasilnya tidak normal/homogen atau tidak terpenuhi 1 sampai 2 kriteria, maka dilakukan uji *Kruskal Wallis* dan *Mann-Whitney* dengan signifikansi $p < 0.05$.

HASIL PENELITIAN

Hasil Paparan Kombucha Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn) Terhadap Histologi Jaringan Hepar yang Mengalami Nekrosis pada Ikan Zebra (*Danio rerio*)

Efek pemberian kombucha daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap struktur histologi nekrosis hepatosit *Danio rerio* dapat dilihat pada **Gambar 1 & 2** dan **Tabel 3** berikut ini:



Gambar 1 Struktur Histologis Nekrosis & Steatosis Hepatosit pada *Danio rerio* Dewasa (HE, 400 kali)

Keterangan:

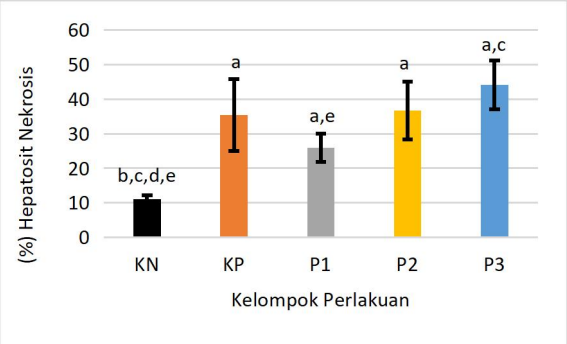
Terdapat gambar histologi hepatosit pada *Danio rerio* dewasa pada kelompok KN, KP, P1, P2, dan P3 dengan perbesaran mikroskop 400 kali. Sel hepatosit normal ditandai dengan panah putih, sel hepatosit nekrosis ditandai dengan panah merah, dan sel hepatosit steatosis ditandai dengan anak panah biru.

Tabel 3. Rerata Persentase Jumlah Nekrosis Hepatosit Ikan Zebra (*Danio rerio*) Dewasa yang Diinduksi Kombucha Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn)

Kelompok	n (sampel)	Sel Hepatosit Nekrosis (Rata-rata ± SD)
Kontrol Negatif (KN)	5	11.00± 1.225[b,c,d,e]
Kontrol Positif (KP)	5	35.40± 10.407[a]
Perlakuan 1 (P1)	5	26.00± 4.062[a,e]
Perlakuan 2 (P2)	5	36.80± 8.349[a]
Perlakuan 3 (P3)	5	44.20± 7.050[a,c]

Keterangan hasil : Jumlah hepatosit nekrosis terdiri dari piknosis, karioreksis, kariolisis, dan membranolisis.

Keterangan :
a : Berbeda signifikan dengan KN
b : Berbeda signifikan dengan KP
c : Berbeda signifikan dengan P1
d : Berbeda signifikan dengan P2
e : Berbeda signifikan dengan P3



Gambar 2. Histogram Persentase Nekrosis Hepatosit *Danio rerio* Dewasa yang Diinduksi Kombucha Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn)

Keterangan :
KN: Kelompok Normal
KP: Kelompok yang diinduksi sukrosa 4%
P1: Kelompok yang diinduksi sukrosa 4% + dosis kombucha daun sirsak 1,25 %
P2: Kelompok yang diinduksi sukrosa 4% + dosis kombucha daun sirsak 2,5%
P3 : Kelompok yang diinduksi sukrosa 4% + dosis kombucha daun sirsak 5%

Secara statistik P3 menunjukkan jumlah nekrosis hepatosit tertinggi (44.20± 7.050) dan terendah pada KN (11.00± 1.225). Pada hasil *One way* ANOVA kelompok pemberian Kombucha Daun Sirsak (KDS) dan KN menunjukkan perbedaan signifikan. Hasil analisa *Post Hoc One Way ANOVA* didapatkan KP tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan P1, P2, dan P3 ($p > 0,05$) namun signifikan dengan KN (p=0,036). Selain itu, didapatkan juga perbedaan yang signifikan antara KN dengan P1, P2, dan P3 (p=0,005; p=0,013; p=0,002). Terdapat perbedaan signifikan juga antara P1 dan P3 dengan signifikansi sebesar (p=0,016).

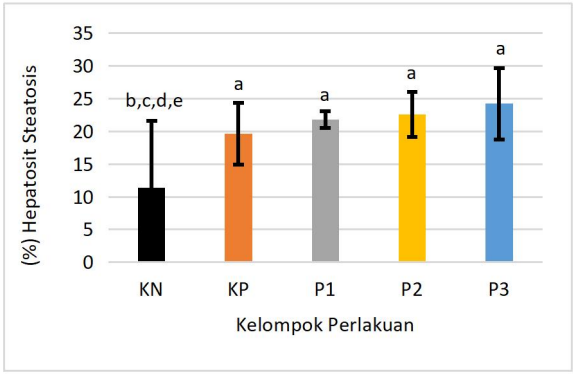
Hasil Paparan Kombucha Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn) Terhadap Histologi Jaringan Hepar yang Mengalami Steatosis pada Ikan Zebra (*Danio rerio*)

Efek pemberian kombucha daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap struktur histologi steatosis hepatosit *Danio rerio* dapat dilihat pada **Gambar 1&3** dan **Tabel 4** berikut ini:

Tabel 4. Rerata Persentase Jumlah Steatosis Hepatosit Ikan Zebra (*Danio rerio*) Dewasa yang Diinduksi Kombucha Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn)

Kelompok	n (sampel)	Sel Hepatosit Steatosis (Rata-rata ± SD)
Kontrol Negatif (KN)	5	11.40± 10.213[b,c,d,e]
Kontrol Positif (KP)	5	19.60± 4.722[a]
Perlakuan 1 (P1)	5	21.80± 1.304[a]
Perlakuan 2 (P2)	5	22.60± 3.435[a]
Perlakuan 3 (P3)	5	24.20± 5.450[a]

Keterangan :
a : Berbeda signifikan dengan KN
b : Berbeda signifikan dengan KP
c : Berbeda signifikan dengan P1
d : Berbeda signifikan dengan P2
e : Berbeda signifikan dengan P3



Gambar 3. Histogram Persentase Steatosis Hepatosit *Danio rerio* Dewasa yang Diinduksi Kombucha Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn)

Keterangan :
KN: Kelompok Normal
KP: Kelompok yang diinduksi sukrosa 4%
P1: Kelompok yang diinduksi sukrosa 4% + dosis kombucha daun sirsak 1,25 %

P2: Kelompok yang diinduksi sukrosa 4% + dosis kombucha daun sirsak 2,5%
P3 : Kelompok yang diinduksi sukrosa 4% + dosis kombucha daun sirsak 5%

Secara statistik P3 menunjukkan jumlah steatosis hepatosit tertinggi (24.20± 5.450) dan terendah pada KN (11.40± 10.213). Pada hasil *One way* ANOVA kelompok pemberian Kombucha Daun Sirsak (KDS) dan KN menunjukkan perbedaan signifikan. Hasil Analisa *Post Hoc One Way ANOVA* didapatkan KP tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan P1, P2, dan P3 ($p > 0,05$) namun signifikan dengam KN ($p=0,038$). Selain itu, didapatkan juga perbedaan yang signifikan antara KN dengan P1, P2, dan P3 ($p=0,011$; $p=0,006$; $p=0,002$).

PEMBAHASAN

Pengaruh Pemberian Sukrosa 4 % pada Hepatosit Ikan Zebra (*Danio rerio*)

Berdasarkan hasil analisa data pada nekrosis dan steatosis hepatosit terdapat perbedaan yang signifikan sebesar 1 hingga 3 kali lipat lebih tinggi pada KP dibandingkan KN. Pada kelompok kontrol positif dengan pemberian diet tinggi sukrosa dapat memicu terjadinya hiperglikemia. Pada penelitian yang dilakukan (Andiny, 2025 ongoing), didapatkan induksi sukrosa 4% dapat menyebabkan tingginya kadar glukosa darah ikan zebra pada kelompok tanpa induksi sukrosa 4% sebesar 62,33 mg/dl, sedangkan pada kelompok yang diinduksi sukrosa yaitu 109,33 mg/dl[17].

Sukrosa akan diurai menjadi fruktosa dan glukosa dengan bantuan sukrase yang keduanya akan masuk ke intestinal dan berlanjut masuk ke vaskuler. Tingginya glukosa dalam vaskuler dapat memicu terjadinya hiperglikemia. Hiperglikemia dapat memicu terbentuknya AGEs melalui reaksi non enzimatik antara glukosa dan amino. Hal ini menyebabkan terjadinya peningkatan ekspresi sel inflamasi dengan cara melepas sitokin proinflamasi dan terbentuknya *Reactive Oxigen Species* (ROS)[3]. Tingginya ROS bisa meningkatkan TNF, IL-6, & MCP-1 *chemokin* yang berkontribusi terjadinya inflamasi dan kerusakan hepar[18].

Hiperglikemia dapat mempercepat pembentukan Trigliserida (TG) yang diakibatkan dari sintesis asam lemak dari fruktosa serta pembentukan glikogen dari glukosa[18]. Peningkatan TG dalam hepar sensitif terhadap metabolit dari peroksidasi lipid yang dipicu adanya stres oksidatif yang dapat merusak mitokondria serta membran sitoplasma dan berakhir dengan terbentuknya nekrosis hepatosit[3]. Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan (Tita, 2025 ongoing) bahwasanya pemberian sukrosa 4 % bisa menyebabkan nekrosis dan steatosis pada hepatosit ikan zebra secara signifikan daripada 1% dan 2%[19]. Selain itu, pada penelitian yang lain memberikan gambaran efek hiperglikemia pada jaringan hati ikan zebra dapat menghasilkan hepatosit yang hipertrofik dengan hilangnya membran inti dalam sel, kariopiknosis, dan nekrosis hepatosit[4]. Pada sumber yang lain, penelitian yang dilakukan Zang *et al*., (2018) yang menggunakan ikan zebra (jantan dan betina) yang diberikan asupan makan berlebihan menunjukkan kelebihan nutrisi yang digambarkan hipertrigliseridemia, peningkatan *Body Mass Index* (BMI), dan hepatosteatosis[20].

Pengaruh Pemberian Kombucha Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn) Terhadap Nekrosis dan Steatosis pada Hepatosit Ikan Zebra (*Danio rerio*)

Hasil analisa data nekrosis dan steatosis hepatosit didapatkan KN berbeda signifikan dengan P1, P2, dan P3 sebesar 2 hingga 4 kali lipat lebih tinggi. Selain itu terdapat perbedaan yang signifikan juga antara kelompok perlakuan P1 dan P3 pada variabel nekrosis hepatosit. Pada semua variabel antara kelompok KP dengan P1, P2 dan P3 tidak didapatkan perbedaan yang signifikan. Semakin tinggi dosis perlakuan menyebabkan semakin tinggi kerusakan pada hepar yang diduga kombucha tidak bisa sebagai hepatoprotektor. Hal ini menjelaskan bahwasanya semua dosis kombucha daun sirsak tidak bisa menurunkan jumlah nekrosis dan steatosis hepatosit akibat sukrosa 4 %, melainkan Kombucha Daun Sirsak (KDS) berkontribusi dalam meningkatkan kerusakan hepar.

Dalam kondisi normal, sel hepatosit dapat mengalami kerusakan yang disebabkan oleh banyak faktor seperti kondisi kesehatan tubuh selama pemeliharaan, faktor genetik, infeksi dan berat badan. Terdapat penelitian sebelumnya, pemberian kombucha bunga telang bersifat toksik terhadap hepar yang ditandai dengan peningkatan kadar AST dan ALT serum hewan coba. Hal ini mendukung bahwasanya kombucha dapat menyebabkan kerusakan hepar[11].

Terdapat banyak penyebab kombucha daun sirsak bisa menjadi toksik. Salah satunya dalam pengolahan daun sirsak dalam pembuatan KDS. Pembuatan kombucha diawali dengan perebusan daun sirsak selama 5 menit. Lalu ditambahkan gula dalam infusa daun sirsak. Perebusan daun sirsak yang tidak optimal bisa menyebabkan tidak sempurnanya pengeluaran zat aktif yang terkandung dalam daun sirsak. Menurut Baragain *et al*., (2021) rebusan daun sirsak dalam waktu 5 menit memiliki aktivitas antioksidan lebih rendah dibandingkan 10 menit. Oleh karena itu, kualitas antioksidan yang dihasilkan lebih rendah dibandingkan oksidan yang ditimbulkan karena adanya hiperglikemia[9].

Salah satu kandungan zat aktif dalam KDS adalah flavonoid. Flavonoid merupakan bagian dari polifenol yang berperan sebagai antioksidan. Selain bersifat antioksidan, polifenol juga dapat bersifat prooksidan. Menurut Dzah *et al.,* (2024) polifenol dalam dosis tinggi dapat menyebabkan peningkatan apoptosis sel melalui auto-oksidasi dan menghasilkan ROS yang menyebabkan stres oksidatif. Hal tersebut dapat merusak DNA, protein,

dan membran sel. Semakin tinggi dosis KDS menyebabkan semakin tingginya kadar senyawa flavonoid dalam kombucha[21].

Selain polifenol, kombucha juga memiliki kandungan asam organik, salah satunya yaitu asam usnat. Asam usnat dalam produk fermentasi dapat menimbulkan hepatotoksisitas dan sitotoksisitas pada hepatosit manusia dan model hewan[22]. Asam usnat dapat menghambat fungsi mitokondria dengan cara inhibisi respirasi mitokondria yang mencegah proses transpor elektron. Hal ini dapat meningkatkan komponen autooksidasi yang mengakibatkan peningkatan ROS oleh mitokondria. Oleh karena itu, tingginya ROS dalam asam usnat dapat menghambat proliferasi sel dan menyebabkan nekrosis hepatosit. Nekrosis hepatosit menyebabkan penurunan ATP yang cepat yang berkontribusi dalam kematian sel[23].

Kombucha mungkin tidak berbahaya bagi orang yang sehat. Namun, risikonya tidak diketahui bagi mereka yang memiliki kondisi kesehatan atau bagi orang yang mengonsumsi kombucha secara berlebihan. Ditemukan beberapa laporan kasus terkait toksisitas kombucha. Terdapat kasus nekrosis hati pada pasien wanita berusia 42 tahun yang sebelumnya sehat. Ia mengonsumsi 946 mL kombucha dan 295 - 443 mL anggur setiap hari selama 3 bulan. Tes biokimia hati menunjukkan peningkatan ALP, AST dan ALT. Setelah pasien berhenti mengonsumsi alkohol dan kombucha, tubuhnya semakin stabil dan membaik. Disimpulkan bahwa konsumsi kombucha mungkin telah berkontribusi menyebabkan nekrosis hati. Cedera hati kemungkinan besar berhubungan dengan kombucha karena tingginya kadar serum AST dan ALT daripada yang diharapkan dari penyalahgunaan alkohol saja. Konsumsi kombucha dapat menyebabkan sakit kepala, muntah, mual, dan penyakit kuning[22]. Kombucha memiliki efek toksik yang dapat menyebabkan hepar injury, reaksi alergi, asidosis laktat, dan *Acute Kidney Injury* (AKI)[11].

Hasil penelitian ini memberikan jawaban bahwa meskipun kombucha daun sirsak telah diusulkan memiliki banyak manfaat kesehatan, masih banyak yang belum diketahui tentang jumlah yang aman untuk dikonsumsi. Mengingat efek samping yang telah dilaporkan sebelumnya, kita harus lebih berhati-hati saat mengonsumsi kombucha dan produk-produk terkait kombucha.

KESIMPULAN

Dengan mempertimbangkan penelitian yang sudah dilaksanakan, dapat disimpulkan bahwa pemberian kombucha daun sirsak *(Annona muricata* Linn*)* tidak mampu mempunyai potensi sebagai hepatoprotektor diduga karena dosis 1,25 % sudah bersifat toksik terhadap hepar.

Saran

1. Melakukan penelitian serupa dengan dosis yang lebih rendah dari 1,25 %.
2. Melakukan penelitian selanjutnya dengan menilai kadar AST dan ALT serum pada ikan zebra.

Ucapan Terima Kasih

Sehubungan atas perannya sebagai *peer reviewer*, penulis berterimakasih kepada Dr. H. Yudi Purnomo, M.Kes., Apt dan kepada FK UNISMA serta Ikatan Orangtua Mahasiswa (IOM) FK UNISMA yang sudah memberikan pendanaan riset.

DAFTAR PUSTAKA

1. Azzaky, Fairus Firdani. Njoto, Ibrahim , Setiawan, Heru, Tjandra, L. (2023) ‘Hubungan kadar diet sukrosa dengan peningkatan kadar gula darah sebagai faktor risiko diabetes mellitus pada tikus wistar, pp. 1–16.
2. Farid, M., Darwin, E., & Sulastri, D. (2014). Pengaruh Hiperglikemia terhadap Gambaran Histopatologis Pulau Langerhans Mencit. *Jurnal Kesehatan Andalas, 3*(3), 420–428.
3. Kumar, V., K. Abbas, A. and Aster, J.C. (2015) *Robbins Basic Pathology*. 9th edn. Philadelphia: Elsevier, Saunders.
4. Xi, L. *et al.* (2023) ‘Study on Carbohydrate Metabolism in Adult Zebrafish (Danio rerio)’, *Aquaculture Nutrition*, 2023.
5. Wilson, Sylvia A. Price dan Lorraine M. Patofisiologi Konsep Klinis ProsesProses Penyakit Edisi 6 Volume 1. Jakarta : EGC. 2006.
6. Indriyani, Risandiansyah, R., & Aini, N. (2020). *Meningkatkan Nekrosis Inti Hepatosit Ikan Zebra Dewasa (Danio rerio) Chronic Exposure Of* 51 *CdCl 2 On Decreases Swimming Speed And Increases Necrosis Nucleus Of Hepatocyte In Adult Zebrafish (Danio rerio)*. *62*(341), 1–9.
7. Tan, W.C., Muhialdin, B.J. and Meor Hussin, A.S. (2020) ‘Influence of Storage Conditions on the Quality, Metabolites, and Biological Activity of Soursop (Annona muricata. L.) Kombucha’ *, Frontiers in Microbiology,* 11 (December), pp. 1-10.
8. Novianty, S.D., Lestari, R.D. and Damayanti, D.S. (2021) ‘Potensi Kombucha Daun Sirsak (Annona muricata Linn.) Dalam Silico’, *Jurnal Kedokteran Komunitas*, 10(1).
9. Baragain, R.S., Bintari, Y.R. and Sri, D. (2021) ‘Penentuan Potensi Antioksidan Dan Kadar Total Fenol Kombucha Daun Annona muricata Linn Determination Of Potential Antioxidants And Total Levels Of Phenol Kombucha Leaf Annona muricata Linn’, *Fakultas kedokteran Universitas Islam Malang*, pp. 1–8.
10. Barkah, Muhammad Habib, Dini Sri Damayanti, R.H. (2020) ‘Pengaruh Lama Fermentasi Kombucha Daun Sirsak (Annona muricata L.)Terhadap Daya Hambat Pertumbuhan bakteri Escherichia coli’, *Repository University of Islam Malang*, p. 1.
11. Nadiroh, Z., Pragasta, R. and Damayanti, D.S. (2023) ‘Kombucha Of Butterfly Pea Flower (Clitoria ternatea L .) Effects On AST And ALT Serum Levels Of Male Mice (Mus musculus). Pendahuluan ’:, *Fakultas*

Kedokteran Universitas Islam Malang (UNISMA), pp. 1–8.

12. Dorsemans, A. C., Lefebvre d'hellencourt, C., Ait-Arsa, I., Jestin, E., Meilhac, O., & Diotel, N. (2017). Acute and chronic models of hyperglycemia in zebrafish: A method to assess the impact of hyperglycemia on neurogenesis and the biodistribution of radiolabeled molecules. Journal of Visualized Experiments, 124, 1–8.
13. Gleeson M., Connaughton V. & Arneson L. S.. Induction of hyperglycaemia in zebrafish (Danio rerio) leads to morphological changes in the retina. Acta Diabetol. 2007 Sep;44(3):157-63.
14. Hardianti, M., Yuniarto, A. and Hasimun, P. (2021) 'Review: Zebrafish (Danio Rerio) Sebagai Model Obesitas dan Diabetes Melitus Tipe 2', *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 8(2), p. 69.
15. Norton, W. and Bally-Cuif, L., 2010. Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. BMC Neuroscience, 11, p.90.
16. Rahmawanti, A., Setyowati, D. N., & Mukhlis, A. (2021). Histopathological of Brain, Eye, Liver, Spleen Organs of Grouper Suspected VNN in Penyambuan Village, North Lombok. Jurnal Biologi Tropis, 21(1), 140–148.
17. Andiny, T. (2025). Pengaruh Pemberian Kombucha Daun Sirsak terhadap Kerusakan Pankreas Ikan Zebra (*Danio rerio*) yang Diinduksi Sukrosa 4% Unpublished.
18. Putri, T.A., Ruyani, A. and Nugraheni, E. (2017) 'Jurnal Kedokteran Raflesia , Volume 3 , Nomor 1 Juni 2017', *Jurnal Kedokteran Raflesia*, 3(1), pp. 94–107.
19. Tita, S. (2024). Hiperglikemi dan Kerusakan Hepar Yang di Induksi Sukrosa. On going.
20. Zang, L., Maddison, L.A. and Chen, W. (2018) 'Zebrafish as a model for obesity and diabetes', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6(AUG), pp. 1–13.
21. Dzah, C.S. Zhang. H. Gobe. V. et al. 2024. Modulating glutathione synthesis, activity and cellular redox potential: Potential synergies for disease management, Advances in Redox Research, 11, p. 100099.
22. Sannapaneni, S., Philip, S., Desai, A., Mitchell, J., & Feldman, M. (2023). Kombucha-Induced Massive Hepatic Necrosis : A Case Report and a Review of Literature. *Gastro Hep Advances*, *2*(2), 196–198.
23. Han, D., Matsumaru, K., Rettori, D., & Kaplowitz, N. (2011). Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes : inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. *Biochemical Pharmacology*, *67*(2004), 439–451.