

The Influence of Giving Ethanol Extract of Soursop Leaves (*Annona muricata* Linn) Against 7,12 dymethylbenz()anthracene (DMBA) Induced Appearance of Hepar Histhopatology

Supratanda FE, Carolia N, Muhartono
Faculty of Medicine Lampung University

Abstract

Soursop (*Annona muricata* Linn) is a plant used as hepatoprotective. Soursop leaves contain flavonoids, alkaloids and acetogenis that can neutralize free radicals or ROS (*reactive oxygen species*) and also as a cytotoxic. This study aimed to investigate the effect of the leaves extract of soursop (*Annona muricata* Linn) against liver cell damage rats *Sprague Dawley* strain by DMBA-induced. In this study, 25 rats were divided into 5 groups and treated for 30 days. GI (given only distilled water), GII (DMBA only given 75 mg/kg), GIII (DMBA were given 75 mg/kg soursop leaves extract 100 mg/kg), GIV (DMBA were given 75 mg/kg and soursop leaves extract 200 mg/kgBW), and GV (DMBA were given 75 mg/kg and extracts of soursop leaves extract 400 mg/kg). The result showed that the mean number of liver cell damage are GI: 1.20 ± 0.837 ; GII: 13.20 ± 0.837 ; GIII: 11.80 ± 0.837 ; GIV: 10.80 ± 1.643 ; GV: 10.40 ± 1.140 . ANOVA test found a significant difference p value = 0.001 for all groups. In the Post Hoc LSD test found significant differences or p value = < 0.05. These results indicate that the ethanol extract of leaves of the soursop can reduce cell damage DMBA-induced rat liver due to its antioxidant content.

Keywords: *Annona muricata* Linn, antioxidant, DMBA

Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn) Terhadap Gambaran Histopatologi Sel Hepar Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur *Sprague dawley* yang Diinduksi DMBA

Abstrak

Daun sirsak (*Annona muricata* Linn) adalah tanaman yang digunakan hepatoprotektor. Daun sirsak mengandung flavonoid dan alkaloid dan *acetogenis* yang dapat menetralkan radikal bebas atau ROS (*reactive oxygen species*). Penelitian ini bertujuan mengetahui adanya pengaruh ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap kerusakan sel hepar tikus putih galur *Sprague dawley* yang diinduksi DMBA. Pada penelitian ini, 25 tikus dibagi dalam 5 kelompok dan diberi perlakuan selama 30 hari. KI (hanya diberi aquades), KII (hanya diberi DMBA 75 mg/kgBB), KIII (diberi DMBA 75 mg/kgBB ekstrak Daun sirsak 100 mg/KgBB), KIV (diberi DMBA 75 mg/KgBB dan ekstrak daun sirsak 200 mg/KgBB) dan KV (diberi DMBA 75 mg/KgBB dan ekstrak ekstrak daun sirsak 400 mg/KgBB). Uji ANOVA didapatkan perbedaan yang bermakna ($p=0,001$) terhadap semua kelompok. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah rerata kerusakan sel hepar adalah KI: $1,20 \pm 0,837$; KII: $13,20 \pm 0,837$; KIII: $11,80 \pm 0,837$; KIV: $10,80 \pm 1,643$; K5: $10,40 \pm 1,140$. Pada uji *Post Hoc* LSD didapatkan perbedaan bermakna $p < 0,05$. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak dapat menurunkan kerusakan sel hepar tikus yang diinduksi DMBA akibat kandungan antioksidannya.

Kata kunci: *Annona muricata* Linn, antioksidan, DMBA.

Pendahuluan

Hati merupakan organ yang paling penting dalam pengaturan homeostasis tubuh yang meliputi metabolisme, biotransformasi, sintesis, penyimpanan dan imunologi. Sel-sel hati atau *hepatosit* mempunyai regenerasi yang cepat. Oleh karena itu hati akan dapat mempertahankan fungsinya apabila terjadi kerusakan yang ringan, akan tetapi akan menjadi fatal jika kerusakan menjadi berat dan serius. Penyebab tersering adalah akibat virus, efek toksik obat, racun, jamur dan lain sebagainya. Di Indonesia prevalensi belum diketahui secara pasti, tetapi menurut WHO penyakit hati ini menjadi penyakit endemik di Indonesia dan menjadi penyebab kematian yang tergolong tinggi (Depkes RI, 2007).

Berbagai macam mekanisme terlibat dalam kerusakan hepar, diantaranya hilangnya antioksidan tubuh, mutasi gen, dan ketidakseimbangan proliferasi dan apoptosis sel. Pada kanker, proliferasi terjadi lebih cepat dan tidak terkontrol serta tidak berfungsinya agen *proapoptotic*. Sitokin yang paling penting dalam menginduksi apoptosis hepatosit adalah golongan reseptor *tumor necrosis factor* (TNF), CD95 (Apo1/Fas), TNF α , dan *the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) (Schattenberg *et al.*, 2011).

Terapi kerusakan hati didasarkan pada penyebab penyakit. Pengobatan yang dilakukan bila telah mencapai tahap akhir atau *end stage* adalah pembedahan, kemoterapi, radioterapi, dan transplantasi hati. Kemoterapi adalah pemberian anti tumor pada penderita kanker untuk memperpanjang umur. Dilakukan dengan memberikan obat anti kanker ke dalam arteri hepatica sehingga obat secara langsung masuk sel sel kanker pada hati. Obat tersebut akan mengecilkan tumor. Obat kemoterapi yang banyak digunakan adalah 5 Fluorourasil dan Adriamisin (Christian *et al.*, 2009). Namun, terapi tersebut masih banyak menimbulkan berbagai efek samping dan tidak menjamin akan terjadinya kesembuhan total dan kemungkinan terjadinya *reccurence* (El-Serag *et al.*, 2008).

Radioterapi dan kemoterapi memiliki beberapa keterbatasan. Kemampuan sinar yang digunakan untuk terapi mengalami penurunan efektifitas karena ukuran kanker yang semakin besar. Karena penambahan dosis yang ditambahkan juga melebihi dosis batas toksik pada organ normal manusia.

Penggunaan obat kimia seperti kemoterapi tidak hanya membunuh sel tumor namun juga merusak sel darah yang menyebabkan penurunan fungsi imun atau bahkan kematian yang disebabkan dari komplikasi akibat efek samping obat yang serius (Li *et al.*, 2008).

Akhir akhir ini masyarakat lebih memilih pengobatan tradisional dengan menggunakan bahan baku tanaman herbal sebagai obat untuk mencegah maupun menanggulangi berbagai keluhan dan penyakit. Salah satunya adalah pemanfaatan daun sirsak (*Annona muricata Linn*) sebagai pengobatan kanker (Zuhud, 2011). Kandungan kimia dari sirsak adalah saponin, flavonoid, tanin, kalsium, fosfor, hidrat arang, vitamin (A, B, dan C), fitosterol, Ca oksalat dan alkaloid murisine (Mangan, 2009).

Berdasarkan hal tersebut penelitian ini dilakukan bertujuan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata Linn*) terhadap gambaran histopatologi sel hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi DMBA.

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik yang menggunakan metode rancangan acak terkontrol dengan pola *post test only control group design*. Sebanyak 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* berumur 10-16 minggu yang dipilih secara acak dan dibagi menjadi 5 kelompok, dengan pengulangan sebanyak 5 kali. Penelitian dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung untuk mengetahui gambaran mikroskopis hepar. Waktu penelitian selama bulan Agustus-September 2013. Sampel penelitian sebanyak 25 ekor yang dipilih secara acak yang dibagi dalam 5 kelompok. Kelompok 1 merupakan kelompok kontrol negatif dengan perlakuan pemberian akuades dan makanan pelet, satu kali sehari selama 8 minggu. Kelompok 2 merupakan kelompok kontrol positif dengan perlakuan DMBA, yang dibuat model kanker hepar dengan pemberian DMBA dalam minyak zaitun dosis 75 mg/kgBB secara intraperitoneal sebanyak dua kali dengan jarak 1 minggu. Kelompok 3 merupakan kelompok perlakuan yang diberi

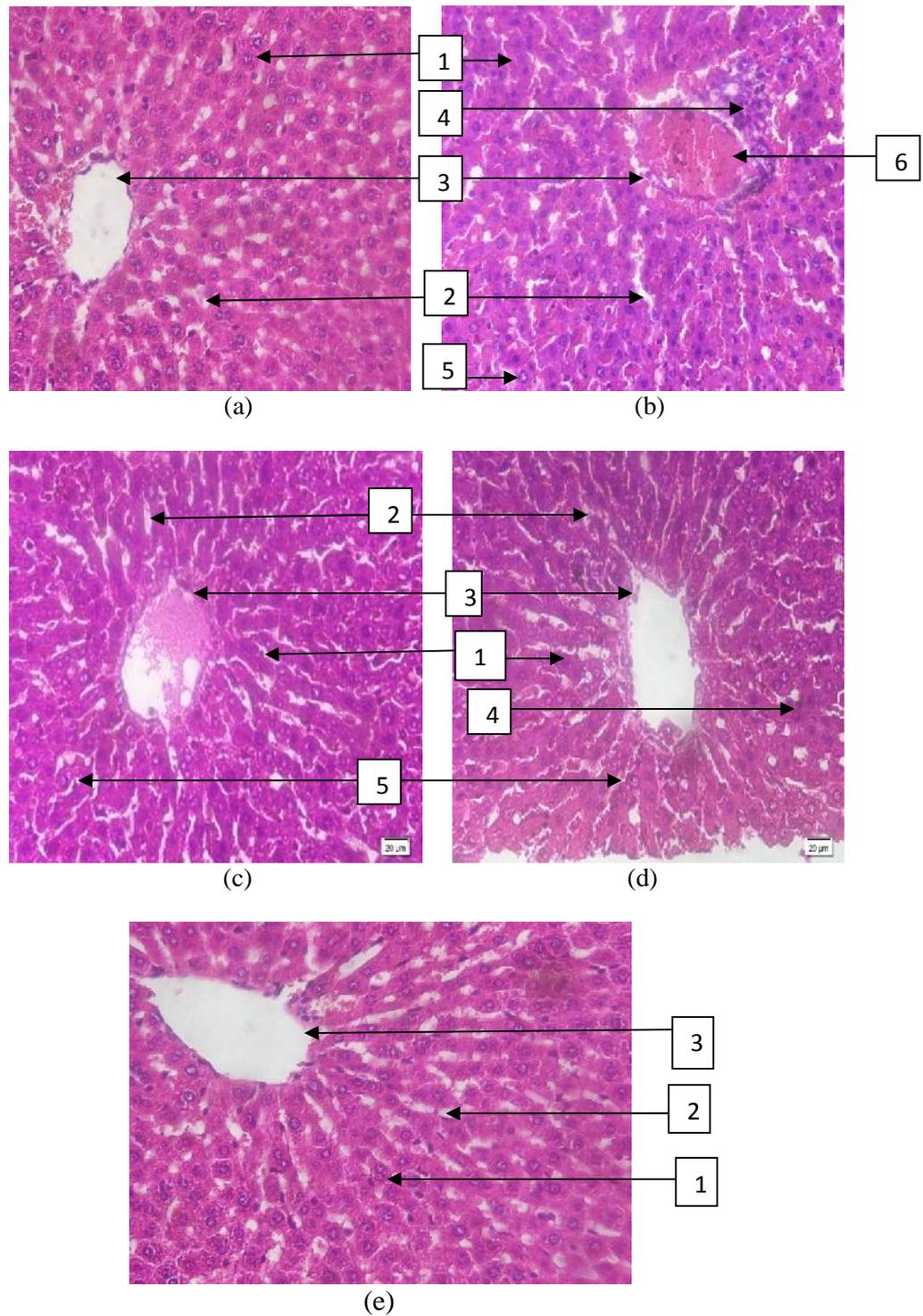
ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata Linn*) dengan dosis pemberian 100 mg/kg berat badan selama 4 minggu setelah pemberian DMBA. Kelompok 4 merupakan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata Linn*) dengan dosis pemberian 200 mg/kg berat badan selama 4 minggu setelah pemberian DMBA. Kelompok 5 merupakan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak dan sirsak (*Annona muricata Linn*) dengan dosis pemberian 400 mg/kg berat badan selama 4 minggu setelah pemberian DMBA.

Setelah pemberian DMBA yang terakhir, semua tikus diberi pakan kontrol saja hingga akhir pengamatan atau selama 4 minggu. Setelah itu, tikus pada kelompok 3, 4 dan 5 diberi ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata Linn*) sesuai dosis yang dilarutkan dengan aquadest setiap pagi selama 4 minggu. Sementara kelompok kontrol negatif (kelompok 1) maupun kontrol positif (kelompok 2) hanya diberi pakan kontrol dan akuades.

Setelah minggu ke 9, pengamatan dihentikan kemudian tikus dibius dengan kloroform dan dilakukan pembedahan. Selanjutnya dilakukan pembuatan preparat histopatologi hepar dengan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE).

Hasil

Penelitian ini menggunakan tikus yang berjumlah 25 ekor tikus (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* berumur 10-16 minggu. Sebelum pemberian perlakuan tikus diadaptasikan selama 3 hari dengan pemberian diet standar yakni dengan pemberian akuades dan diet standar ad libitum. Gambaran histopatologi dari hepar tikus masing-masing kelompok dapat dilihat pada gambar di bawah ini:



Gambar 1. Gambaran histopatologi (a) Kelompok I (b) Kelompok II (c) Kelompok III (d) Kelompok IV (e) Kelompok V

Keterangan: 1. Hepatosit 2. Sinusoid 3. V. Sentral 4. Sel radang 5. Degenerasi Bengkak Keruh 6. Eritrosit

Rerata jumlah sel hepatosit yang mengalami degenerasi bengkak keruh diuji normalitasnya dengan uji *Saphiro-Wilk* dan didapatkan semua kelompok memiliki nilai $p > 0,05$. Hal ini menandakan bahwa data berdistribusi normal.

Setelah dilakukan uji homogenitas dari data untuk mengetahui apakah data homogen atau tidak didapatkan hasil $p = 0,149$. Hal ini menunjukkan bahwa data homogen karena nilai ($p > 0,05$) dan dilanjutkan dengan uji statistik parametrik (*one way annova*).

Pada uji statistik *One way annova*, diperoleh nilai 0,000 atau $p < 0,05$ yang artinya terdapat perbedaan jumlah sel radang yang bermakna antar kelompok. Analisis data dilanjutkan menggunakan analisis *Post Hoc* LSD untuk menilai perbedaan masing–masing kelompok dan diperoleh hasil sebagai berikut, dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Statistik Jumlah Degenerasi Bengkak Keruh Perbandingan Antar Kelompok (*Post Hoc* LSD)

Perbandingan antar Kelompok		p	Keterangan
I	II	0,001	Bermakna
	III	0,001	Bermakna
	IV	0,001	Bermakna
	V	0,001	Bermakna
II	III	0,059	Tidak Bermakna
	IV	0,003	Bermakna
	V	0,001	Bermakna
III	IV	0,168	Tidak Bermakna
	V	0,059	Tidak Bermakna
IV	V	0,573	Tidak Bermakna

Pembahasan

Setelah dilakukan pengamatan terhadap gambaran histopatologi hepar tikus pada penelitian yang telah dilakukan, didapatkan hasil bahwa pada kelompok kontrol negatif/normal (K I) memiliki skor rerata degenerasi bengkak keruh terendah dan memiliki perbedaan gambaran mikroskopis secara signifikan dengan kelompok lainnya. Hal ini disebabkan kelompok kontrol hanya diberikan akuades dan pakan dan tidak diinduksi DMBA gambaran hepatositnya normal. Untuk nilai kerusakan ini mungkin dapat dipengaruhi beberapa faktor seperti kondisi individu dari masing-masing tikus, baik dari faktor stress, imunologi atau bisa juga karena kondisi awal hepar tikus disamping pemberian induksi DMBA.

Pada Kelompok kontrol positif (K II) didapatkan hasil gambaran histopatologi yang hanya diinduksi oleh zat oksidan berupa DMBA dengan dosis 75 mg/kgBB selama 2 minggu terlihat mulai mengalami kerusakan sel hepar tikus yaitu berupa degenerasi bengkak keruh pada sel hepatosit. DMBA adalah suatu senyawa oksidan yang dibioaktivasi oleh enzim sitokrom P450 di hati untuk menjadi aktif menjadi senyawa epoksid yang bersifat reaktif untuk berikatan dengan DNA. Senyawa ini akan menyebabkan stres oksidatif sehingga terjadi peroksidasi membran lipid dan kerusakan pada sel (Anshor dkk., 2011).

Pada kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak daun sirsak yaitu kelompok III, IV, dan V didapatkan gambaran histopatologi dengan derajat kerusakan yang berbeda beda dengan penurunan secara signifikan bila dibandingkan dengan kelompok II atau kelompok pemberian DMBA saja. Hasil pengamatan melalui analisis *Post Hoc* LSD jumlah sel hepatosit yang mengalami degenerasi bengkak keruh pada kelompok I jika dibandingkan dengan kelompok II, III, IV dan V menunjukkan perbedaan yang signifikan $p < 0,05$, ini menunjukkan bahwa Kelompok I memiliki perbedaan pada masing-masing kelompok. Tetapi pada kelompok III yang dibandingkan dengan kelompok II tidak ada perbedaan bermakna, sehingga belum terjadi efek protektif terhadap kerusakan hepar. Pada kelompok IV dan V jika dibandingkan dengan kelompok I memiliki nilai $p < 0,05$ yang berarti terdapat perbedaan yang bermakna tetapi, jika dibandingkan dengan kelompok III, kelompok IV dan V tidak memiliki perbedaan secara bermakna. Ini

menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan pada peningkatan dosis yang diberikan secara signifikan namun, pada kelompok IV dan V sudah memiliki efek protektif yang bermakna terhadap kelompok II atau kelompok induksi.

Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif (Waji & Sugrani, 2009). Adanya zat antioksidan seperti flavanoid, saponin, tanin, acetogenins, kalsium, fosfor, hidrat arang, vitamin (A, B, dan C), fitosterol, Ca oksalat dan alkaloid *murisine* akan menghambat proses terjadinya reaksi oksidatif yang disebabkan oleh akumulasi ROS yang berlebihan di dalam sel hepar (Mangan, 2009).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa daun sirsak memiliki efek hepatoprotektif terhadap hepar. Dalam daun sirsak terkandung antioksidan dan antiinflamasi yang berfungsi menurunkan kerusakan sel-sel hepar. Antioksidan ini bekerja dengan menetralkan radikal bebas sehingga bisa mencegah kerusakan oksidatif lebih lanjut akibat akumulasi zat oksidan seperti DMBA. Pada sebagian besar biomolekul dari antioksidan menghasilkan efek proteksi terhadap kerusakan oksidatif secara signifikan (Sreelatha & Padma, 2009).

Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif (Waji & Sugrani, 2009). Adanya zat antioksidan seperti flavanoid, saponin, tanin, acetogenins, kalsium, fosfor, hidrat arang, vitamin (A, B, dan C), fitosterol, Ca oksalat dan alkaloid *murisine* akan menghambat proses terjadinya reaksi oksidatif yang disebabkan oleh akumulasi ROS yang berlebihan di dalam sel hepar (Mangan, 2009). Dengan demikian kandungan senyawa *Annona muricata* Linn ini berpengaruh terhadap kerusakan sel hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi DMBA.

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun sirsak memiliki efek sebagai hepatoprotektor pada tikus yang diinduksi bahan oksidan DMBA. Hal ini dikarenakan aktivitas antioksidan dan antiinflamasi yang terkandung. Pemberian perbedaan dosis ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata Linn*) 20 mg, 40 mg, dan 80 mg berpengaruh terhadap gambaran histopatologi hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi DMBA yaitu semakin meningkatnya dosis, rerata jumlah hepatosit yang mengalami bengkak keruh mengalami penurunan walaupun belum mencapai pada kondisi normal.

Daftar Pustaka

- Anshor T, dominius A, Irwanda, Imiawan MI. 2013. Supresi Ekspresi CYP1A1 dan CYP1A2 pada hepatocellular carcinoma melalui potensi formula herbal terkombinasi *Gynura procumbens* dan kulit jeruk pontianak (*Citrus nobilis* var. *Microcarpa*) sebagai agen kemopreventif keganasan hepar. *IMKU*. 2(1): 1–11.
- Christian B K, Toni U, Binje V, Regina J B, Steffen H, Peter R Galle, Marcus S, Henning S. 2009. TRAIL-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells is augmented by targeted therapies. *World J Gastroenterol*. 15(47): 5924–35.
- Depkes RI. 2007. Profil Kesehatan Indonesia. Jakarta.
- El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L and Reddy KR. 2008. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology*. 134(9): 1752–63.
- Li K, Li Q, Li J, Gao D, Lin Z, Zheng F. 2008. Alkaloid from angelicae daharaicae inhibits hela cell growth by inducing apoptosis and increasing caspase-3 activity. *Labmedicine*. 39(9): 540–6.
- Li N, Shi Z, Tang Y, Chen J, Li X. 2008. Recent progress on the total synthesis of acetogenins from Annonaceae. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 4(48): 4–12.
- Mangan Y. 2009. Solusi sehat mencegah dan mengatasi kanker. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Schattenberg JM, Schuchmann M and Galle PR. 2011. Cell death and hepatocarcinogenesis: dysregulation of apoptosis signaling pathways. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2(1): 213–9.
- Sreelatha S, Padma PR. 2009. Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant foods for human nutrition*. 64(4): 303-11.
- Waji RA, Sugrani A. 2009. Makalah kimia organik bahan alam flavonoid (quercetin). Makasar: Universitas Hasanuddin. hlm. 8–9.
- Zuhud EA. 2011. Bukti daun sirsak menumpas kanker. Jakarta: PT Agromedia Pustaka. hlm. 17–89.