

**EFEK PROTEKSI EKSTRAK DAUN SIRSAK (*Annona muricata*  
Linn.) TERHADAP DISFUNGSI SEL ENDOTEL PADA  
MENCIT PUTIH JANTAN DENGAN PENGINDUKSI  
LARUTAN NaCl**

**SKRIPSI**



**OLEH :**  
**KURNIA HIDAYAT**  
**13 04 034**

**SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA  
YAYASAN PERINTIS  
PADANG  
2018**

## KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah, segala puji bagi Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini. Shalawat beserta salam kepada nabi Muhammad SAW. Skripsi ini disusun sebagai salah satu persyaratan untuk menyelesaikan program pendidikan sarjana strata satu (S-1) pada Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia Yayasan Perintis Padang, dengan judul **“Efek Proteksi Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) Terhadap Disfungsi Sel Endotel Pada Mencit Putih Jantan Dengan Penginduksi Larutan NaCl”**.

Terimakasih yang sebesar-besarnya ingin penulis sampaikan kepada keluarga tercinta atas dukungan moril dan material yakni Ayahanda H. Amrizal S.Pd, Ibunda Asmalini S.Pdi, Adik Veni Baitul Qomah, dan Latif Am untuk segala kasih sayang, semangat, nasihat beserta do'a tulus yang tiada tara bagi penulis.

Pada kesempatan ini perkenankan penulis mengucapkan terimakasih dan penghargaan yang tak terhingga kepada :

1. Ibu Dr.Suhatri MS, Apt dan ibu Mimi Aria M.Farm, Apt selaku dosen pembimbing yang dengan perhatian dan kesabaran telah meluangkan waktu, tenaga dan pikiran untuk membimbing penulis dalam penulisan hingga penyelesaian skripsi.
2. Bapak Dr. H. M. Husni Muktar, MS, DEA, Apt selaku ketua Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia Yayasan Perintis Padang.

3. Kepala Laboratorium Penelitian bagian Farmakologi dan Kepala Laboratorium Instrumen Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia Yayasan Perintis Padang serta Kepala Laboratorium Biomedik yang telah menyediakan alat dan bahan dalam pengerjaan penelitian ini.
4. Bapak Drs. B.A Martinus, M.Si selaku Pembimbing Akademik, yang telah memberikan bimbingan dan arahan kepada penulis selama masa perkuliahan hingga menyelesaikan pendidikan program strata 1 (S1).
5. Suci Indah Kartika, S.Farm, Khairina Fadhillah, S.Farm, Rozin Zilfa, Harrinda Maulana, Amelisa, Silvia Devita, Kakak – Abang senior, Teman – teman angkatan 2013 (Com13iPhar), serta semua pihak yang telah membantu penulis dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Semoga Allah SWT melimpahkan rahmat dan karuniiaNya kepada semua pihak yang telah membantu penulis. Mudah-mudahan hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi penulis dan pembaca lainnya.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Untuk itu penulis mengharapkan kritik dann saran yang bersifat membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini.

Padang, Maret 2018  
Hormat Saya

Penulis

## ABSTRACT

A study of the effects of soursop leaf extract (*Annona muricata* Linn.) Has been conducted on endothelial cell dysfunction. Endothelial cell dysfunction was induced by a 3% NaCl solution characterized by decreased nitric oxide (NO) levels. In this study the experimental animals used were male white mice weighing 20-30 g and 2-3 months old, divided into five groups: negative control group, positive control group, dose group 50 mg / kgBW, dose group 100 mg / kgBW, and dose group 200 mg / kgBW. Administration of 3% NaCl solution and test preparation was performed orally for 3 weeks. The negative control group was given only 0.5% NaCMC suspension, the positive control group was given only 3% NaCL. The parameters of the observed dysfunction effect were measurements of serum NO levels in experimental animals. Based on the results of soursop leaf extract (*Annona muricata* Linn.) Can protect endothelial cells from damage induced by 3% NaCl solution. Variation of dosage of soursop leaf extract (*Annona muricata* Linn.) Can protect endothelial cells from induced damage with 3% NaCl solution, 100 mg / kgBW dose showed the best result compared with dose 50 mg / kgBW and 200 mg / kgBW with marked high levels of NO.

## ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang uji efek ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap disfungsi sel endotel. Disfungsi sel endotel diinduksi dengan larutan NaCl 3% yang ditandai dengan menurunnya kadar *nitric oxide* (NO). Pada penelitian ini hewan percobaan yang digunakan adalah mencit putih jantan dengan berat badan 20-30 g dan berumur 2-3 bulan yang dibagi atas lima kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok dosis 50 mg/kgBB, kelompok dosis 100 mg/kgBB, dan kelompok dosis 200 mg/kgBB. Pemberian larutan NaCl 3% dan sediaan uji dilakukan secara oral selama 3 minggu. Kelompok kontrol negatif hanya diberikan suspensi Na.CMC 0,5%, kelompok kontrol positif hanya diberikan NaCL 3%. Parameter adanya efek disfungsi yang diamati adalah pengukuran kadar NO serum pada hewan percobaan. Berdasarkan hasil penelitian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) dapat memproteksi sel endotel dari kerusakan yang diinduksikan dengan larutan NaCl 3%. Variasi pemberian dosis ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) dapat memproteksi sel endotel dari kerusakan yang diinduksikan dengan larutan NaCl 3%, dosis 100 mg/kgBB menunjukkan hasil yang paling baik dibandingkan dengan pemberian dosis 50 mg/kgBB dan 200 mg/kgBB dengann ditandai tingginya kadar NO.

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Tumbuhan obat merupakan bagian yang tidak terpisahkan dari kehidupan manusia, karena manfaatnya yang demikian besar dalam menyembuhkan berbagai penyakit (Donatus, 1983). Obat tradisional sudah menjadi pilihan bagi lebih dari 80% populasi di negara berkembang sebagai terapi pengobatan dan upaya dalam menjaga kesehatan (WHO, 2002). Menurut Undang-Undang nomor 23 1992 tentang kesehatan, obat tradisional adalah bahan atau ramuan bahan yang berupa bahan tumbuhan, bahan hewan, bahan mineral, sediaan sarian (galenika) atau campuran dari bahan tersebut yang turun temurun telah digunakan untuk pengobatan berdasarkan pengalaman (Supardi, 2005).

Salah satu tanaman yang secara tradisional digunakan untuk tujuan terapi pengobatan yaitu daun sirsak (*Annona muricata* L.) oleh masyarakat dimanfaatkan sebagai antibakteri, antivirus, antioksidan, antijamur, antiparasit, dan antihipertensi (Gajalakshmi *et al.*, 2011). Pada penelitian sebelumnya, tanaman sirsak (*Annona muricata* L.) merupakan salah satu jenis tanaman buah yang mengandung senyawa bioaktif seperti golongan tannin, fitosterol, flavonoid, saponin, dan alkaloid (Baskar R *et al.*, 2007). Menurut penelitian yang dilakukan Baskar dan Kumar berjudul *In Vitro Antioxidant studies in leave of Annona Species*, didapatkan bahwa daun sirsak mengandung flavonoid yang memiliki antioksidan yang kuat (Baskar R *et al.*, 2007), Dari penelitian lain juga telah dibuktikan bahwa daun sirsak (*Annona muricata* L.) memiliki aktivitas antihipertensi (Nwokocha *et al.*, 2012).

Sel endotelium adalah selapis sel pada intima pembuluh darah yang berperan dalam mengatur tonus otot polos pembuluh darah (Ignarro, *et al.*, 1987). Endotel yang normal berperan mempertahankan tonus vaskuler dan menghambat pertumbuhan sel otot polos, adesi leukosit dan agregasi trombosit oleh pengaruh *Nitric Oxide* (NO) yang dihasilkannya (Mappahya & Ilyas, 2006). Sel endotel bertanggung jawab pada perubahan aliran, regangan, bermacam-macam substansi dalam sirkulasi dan mediator peradangan. Sel endotel juga memproduksi pengatur pertumbuhan dan substansi vasoaktif (Ganong, 2002).

Disfungsi endotel adalah perubahan status fungsional sel endotel yang terjadi sebagai respon terhadap rangsangan lingkungan (Kumar *et al.*, 2007). Disfungsi endotel akan menurunkan daya vasodilatasi pembuluh darah, karena terjadi penurunan produksi dan bioaktivitas faktor vasodilatasi lokal, khususnya nitrogen monoksida (NO) atau Endothelium Derivate Relaxing Factors (EDRF) (Lawrence, 2004).

Asupan garam yang berlebihan akan merangsang pembentukan rennin yang akhirnya menimbulkan vasokonstriksi dan meningkatkan volume darah. Vasokonstriksi dan peningkatan volume darah memicu terjadinya hipertensi (Dharma, 2016). Pada keadaan hipertensi endotel dapat menghasilkan substrat yang bersifat vasokonstriktor, termasuk EDCF (Endothelium Derivat Constricting Factors) yang dibentuk melalui jalur siklooksigenase, seperti PGH<sub>2</sub> (Prostaglandin H<sub>2</sub>), TxA<sub>2</sub> (Tromboksan A<sub>2</sub>) dan anion superoksida. Anion superoksida tersebut secara langsung dapat mempengaruhi tonus struktur pembuluh darah serta menghancurkan NO (Taddei *et al.*, 1998). Pada penderita hipertensi essensial terjadi gangguan vasodilatasi pembuluh darah dan terbentuknya superoksida

radikal oleh endotel. Hal ini disebabkan karena berkurangnya aktivitas NO (Panza *et al.*, 1995).

Berdasarkan uraian diatas, maka peneliti mencoba melakukan penelitian mengenai “ Efek Proteksi Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap Disfungsi Sel Endotel Pada Mencit Putih Jantan Dengan Penginduksi NaCl”. Konsentrasi NaCl yang digunakan sebesar 3% dan parameter proteksi sel endotel dilihat melalui kadar NO serum pada hewan percobaan, dimana apabila semakin tinggi kada NO maka, semakin besar kemampuan proteksi sel endotel dari ekstrak daun sirsak.

## **1.2 Perumusan Masalah**

1. Apakah ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) dapat memproteksi disfungsi sel endotel yang diinduksikan dengan larutan NaCl 3% melalui parameter kadar *nitrit oxide* (NO) serum hewan percobaan?
2. Apakah variasi dosis ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) dapat mempengaruhi efek proteksi sel endotel dari kerusakan yang diinduksikan dengan larutan NaCl 3%?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

1. Untuk mengetahui efek proteksi ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap disfungsi sel endotel yang diinduksikan dengan larutan NaCl 3%.
2. Untuk mengetahui apakah pemberian dosis ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang bervariasi dapat memberikan efek proteksi disfungsi sel endotel berbeda yang diinduksi dengan larutan NaCl 3%.

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

1. Dapat menambah informasi ilmiah mengenai khasiat dan aktivitas senyawa yang terkandung dalam daun sirsak (*Annona muricata* L.)
2. Dapat menjadi dasar pengembangan lebih lanjut terhadap daun sirsak (*Annona muricata* L.) sebagai obat tradisional.
3. Sebagai bahan pembelajaran dan pengetahuan bagi peneliti tentang penggunaan tumbuhan sebagai obat.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tinjauan Biologi Sirsak

##### 2.1.1 Klasifikasi

Adapun klasifikasi dari tumbuhan *Annona Muricata* L. adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Sub Divisio	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Ranunculales
Famili	: Annonaceae
Genus	: Annona
Spesies	: <i>Annona muricata</i> L. (Badan POM RI, 2010).

##### 2.1.2 Nama Daerah

Sumatera : Deureuyan belanda (Aceh); taruyung olanda (Batak); durio olunda (Nias); durian belanda, angka walanda (Melayu); durian betawi, durian batawi (Minangkabau); jambu landa (Lampung). Jawa : Nangkawalanda (Sunda); angka londa, nangkamila, nangkamanila, angka sabranng, mulwa londa, surikaya, welonda, srikaya welandi (Jawa); angka buris, angka englan, angka moris (Madura). Bali : srikaya jawa. Nusatenggara : naka, nakat, annona (Flores).

Sulawesi : atis, mangka walanda (Sulawesi utara); lange lo walanda (Gorontalo); siriknya belanda (Makasar) sirikaya balanda (Bugis) maluku : anad walanda, tafena warata (seram) (Badan POM RI, 2010).

### **2.1.3 Nama Asing**

Di negara-negara lain, buah sirsak dikenal dengan nama soursop (Inggris), corossol atau anone (Perancis), zuurzak (Belanda), guanabana (Spanish), graviola (Portugal) (Heyne, 1987).

### **2.1.4 Morfologi**

Sirsak (*Annona muricata* L.) merupakan tumbuhan berbentuk pohon dengan tinggi  $\pm$  8 meter. Batang berkayu, bulat, bercabang, dan berwarna coklat kotor. Daun berupa daun tunggal berwarna hijau kekuningan dengan bentuk bulat telur atau lanset, ujung runcing tepi rata, sedangkan pangkalnya meruncing, berukuran panjang 6-18 cm, lebar 2-6 cm, pertulangan menyirip memiliki tangkai berukuran  $\pm$  5 mm. Bunga tunggal berwarna kuning muda terdapat pada batang dan ranting, daun kelopak kecil, kuning keputih-putihan, benang sari banyak berambut, kepala putik silinder, mahkota berdaging, berbentuk bulat telur dengan panjang 3-5 cm, diameter 10-15 cm, berbentuk bulat telur. Biji bulat telur, keras, dan berwarna hitam. Akar tunggang, bulat berwarna coklat muda (Depkes RI, 1985).

### **2.1.5 Asal dan Tempat Tumbuh**

Tanaman *Annona muricata* L. berupa tanaman berbentuk pohon kecil tegak banyak tumbuh di daerah tropis dan merupakan tanaman asli di daerah Amerika Utara dan Selatan, termasuk Amazon. Tanaman ini dapat tumbuh diberbagai tempat pada ketinggian 1000 meter diatas permukaan laut, namun paling cocok ditahan di daerah yang mengandung air. Sekarang banyak ditanam di area halaman rumah sebagai pohon buah pekarangan (Wicaksono, 2011).

### **2.1.6 Kegunaan Tanaman**

Daun *Annona muricata* L. memiliki efek yang bermanfaat dalam meningkatkan aktifitas enzim antioksidan dan hormon insulin pada jaringan pankreas serta melindungi dan menjaga sel-sel  $\beta$  pankreas. Daun sirsak juga berpotensi sebagai antihipertensi, antispasmodik, obat pereda nyeri, hipoglikemik, antikanker, emetic (menyebabkan muntah), vermivuge (pembasmi cacing) (Holdsworth, 1990).

Pada daun sirsak ditemukan senyawa acetogenin yang bermanfaat mengobati berbagai penyakit. Acetogenins memiliki sitotoksitas terhadap sel kanker. Acetogenins berperan dalam melindungi sistim kekebalan tubuh serta mencegah infeksi yang mematikan (Erlinger, 2004).

## **2.2 Tinjauan Kimia**

Kandungan utama sirsak (*Annona muricata* L.) adalah senyawa flavonoid dan senyawa fenolat antara lain : asam kafeat, asam p-kumarat, asam p-hidroksibenzoat, asam venilat, dan asam ferulat. Salah satu senyawa flavonoid diduga sebagai flavonol yang gugus hidroksi pada posisi 3 yang terikat sebagai glikosida dan gugus hidroksi pada posisi 4,5 dan 7 bebas (Ideasanti, 1995).

Sirsak (*Annona muricata* L.) mengandung senyawa seperti fruktosa, lemak, besi, vitamin A, vitamin B, dan kalsium. Metabolit sekunder lain yang terkandung di dalamnya adalah senyawa golongan tanin, fitosterol, saponon, dan alkaloid. Senyawa lain juga terdapat pada sirsak (*Annona muricata* L.) adalah acetogenins yang khasiatnya erat berkaitan dengan aktivitas antitumor, anti bakteri, dan insektisida (Wicaksono, 2011).

### **2.3 Tinjauan Farmasetik**

Salah satu bentuk sediaan daun sirsak yang beredar dipasaran yaitu Sidomuncul Sari Daun Sirsak®, sediaan obat tradisional jamu dalam bentuk kapsul yang memiliki komposisi tiap kapsul mengandung ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) 400 mg setara dengan 2 gram bahan segar. Sidomuncul Sari Daun Sirsak® berfungsi sebagai antioksidan alami, meningkatkan kekebalan tubuh dan meningkatkan penampilan fisik yang lebih baik. Aturan minum sebagai berikut :

1. Untuk pemeliharaan 1-3 x sehari @1 kapsul
2. Untuk penyembuhan 3 x sehari @1 kapsul

Pemakaian tidak dianjurkan bagi wanita hamil, menyusui dan yang menderita tekanan darah rendah.

Sumber : rumahjamu.com

## **2.4 Antioksidan**

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi yang disebabkan oleh radikal bebas. Antioksidan mempunyai struktur molekul yang dapat memberikan elektron kepada molekul radikal bebas tanpa mengganggu kestabilan molekulnya (Winarsih, 2007).

Berdasarkan sumbernya, antioksidan dibagi dalam dua kelompok, yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetik :

### **A. Antioksidan Alami**

Antioksidan alami yaitu antioksidan yang diperoleh dari hasil ekstraksi bahan alam. Senyawa antioksidan alami dari tumbuhan semuanya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kuramin dan asam-asam organik polifungsional. Golongan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan meliputi flavon, flavonol, isoflavon, katekin, dan kalkon. Turunan asam sinamat meliputi asam kafeat, asam ferulat, asam klogonat, dan lain-lain. Beberapa contoh antioksidan alami yang sudah diketahui sebagai antioksidan adalah (Ramelan, 2003) :

#### **1. Vitamin C**

Vitamin C adalah substansi yang larut dalam air dan mempunyai efek multifungsi, diantaranya ada yang bersifat antioksidan, peroksidan, pengikat logam, pereduksi dan penangkap oksigen. Dalam bentuk larutan yang mengandung logam yang menjadi katalis aktif untuk oksidasi tingkat rendah. Bila tidak terdapat logam, vitamin C sangat efektif sebagai

antioksidan pada konsentrasi tinggi. Tubuh sangat memerlukan vitamin C, kekurangan vitamin C dapat menyebabkan penyakit asma, kanker, diabetes, dan penyakit hati. Selain itu, vitamin C dapat memperkecil terbentuknya katarak dan penyakit mata lainnya. Kelebihan vitamin C menyebabkan dapat terbentuknya batu ginjal dan diare.

## 2. Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol)

Vitamin E adalah substansi yang larut dalam lemak dan merupakan antioksidan yang cukup kuat dan dapat memproduksi membran sel serta kolesterol LDL (*Low Density Lipoprotein*) dari kerusakan radikal bebas. Selain itu, vitamin E juga dapat membantu memperlambat proses penuaan pada arteri dan melindungi tubuh dari kerusakan sel-sel yang dapat menyebabkan penyakit kanker, hati dan katarak. Bila vitamin ini dikonsumsi dengan vitamin C dapat mencegah penyakit kronik lainnya.

## 3. $\beta$ -karoten

$\beta$ -karoten merupakan pro-vitamin A yang berfungsi meredam radikal bebas pada sel tubuh, serta melindungi sel dari kerusakan oksidatif.  $\beta$  –karoten bekerja pada tekanan parsial oksigen tinggi. Sumber  $\beta$ -karoten adalah sayuran yang berwarna hijau tua dan kuning jingga seperti bayam dan wortel.

#### 4. Flavonoid

Dari penelitian sebelumnya diketahui bahwa flavonoid mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi. Aktivitas antioksidan dari flavonoid ini dapat diperkirakan berhubungan dengan strukturnya. Aktivitas akan meningkat sesuai dengan jumlah OH pada cincin B aromatik. Flavonoid sebagai antioksidan dapat bereaksi dengan radikal bebas melalui pemerangkapan langsung terhadap radikal bebas oksigen dan menghambat enzim penyebab terbentuknya radikal bebas seperti siklooksigenase dan lipooksigenase.

#### **B. Antioksidan Sintetik**

Antioksidan sintetik yaitu antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesis reaksi kimia. Beberapa contoh antioksidan sintetik yang diizinkan penggunaannya dalam makanan adalah butyl hidroksi anisol (BHA), Butil Hidroksi Toluen (BHT), propyl galat, tetra- butyl hidrokuinon (TBHQ), dan tokoferol.

Dalam tulisan Winarsih (2007) antioksidan sintetik dikelompokkan menjadi 2 yaitu :

##### 1. Antioksidan enzimatis

Antioksidan enzimatis ini disebut juga antioksidan primer atau endogen. Antioksidan ini meliputi enzim-enzim seperti superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutations peroksidase (GSH-Px). Antioksidan enzimatis merupakan system pertahanan utama terhadap

kondisi stress oksidatif. Cara kerja antioksidan kelompok ini dengan mencegah terbentuknya senyawa radikal bebas baru.

## 2. Antioksidan non-enzimatis

Antioksidan kelompok ini disebut juga antioksidan sekunder yang dapat diperoleh dari asupan bahan makanan seperti vitamin C, E, A dan  $\beta$ -karoten. Sayur dan buah-buahan merupakan sumber utama penghasil antioksidan non-enzimatis. Cara kerja kelompok ini dengan jalan memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas. Akibatnya radikal tidak akan bereaksi dengan komponen seluler.

### 2.5 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital luarnya, contohnya seperti superoksida ( $O_2^+$ ) dan hidrosil ( $OH^{\cdot}$ ). Radikal bebas ini bersifat tidak stabil sehingga untuk menjadi stabil cenderung untuk mengambil elektron dari molekul lain, dan hal ini akan menimbulkan radikal bebas terhadap molekul yang elektronnya diambil. Oleh karena itu radikal bebas cenderung berupa reaksi rantai dan menghasilkan radikal bebas yang sangat reaktif, sehingga dapat menimbulkan perubahan kimiawi dan merusak berbagai komponen sel seperti protein, lipid, karbohidrat dan nukleotida (Gitawati, 1995).

Secara garis besar radikal bebas dapat terbentuk melalui melalui 2 cara (Setiati, 2003) :

a. Secara Endogen

Radikal bebas yang terbentuk adalah sebagai respon normal dari peristiwa biokimia dalam tubuh. Radikal bebas ini diproduksi didalam mitokondria membran plasma, lisosom, retikulum endoplasma dan inti sel yang berupa hasil sampingan dari proses metabolisme tubuh.

b. Secara Eksogen

Radikal bebas didapat dari polusi yang berasal dari luar tubuh, seperti asap rokok, asap kendaraan bermotor, obat-obatan, pestisida dan radiasi yang masuk serta bereaksi dalam tubuh melalui inhalasi, injeksi, makanan dan penyerapan oleh kulit.

### **2.5.1 Efek Radikal Bebas Dalam Tubuh**

Dalam jumlah yang berlebihan di dalam tubuh, radikal bebas akan memberikan dampak negatif. Membran sel merupakan tempat utama terjadinya reaksi radikal bebas, karena membran sel memiliki struktur yang terdiri dari *polyunsaturated fatty acids* yang sangat mudah mengalami oksidasi. Akibat dari proses oksidasi tersebut, maka permeabilitas membran sel terganggu sehingga radikal bebas akan mudah masuk ke dalam sel dan mempengaruhi atau bereaksi dengan organel sel didalamnya.

## 2.6 Hipertensi

Hipertensi adalah peningkatan tekanan darah di dalam arteri (pembuluh darah nadi) di atas angka normal. Seringkali hipertensi terjadi tanpa gejala sehingga penderita tidak merasa sakit. Pada pemeriksaan tekanan darah akan didapat dua angka, yakni angka yang diatas yaitu tekanan saat jantung berkontraksi (sistole) dan sedangkan angka bawah saat jantung relaksasi (diastole). Hipertensi sering dijumpai pada orang tua dimana sistole meningkat sedangkan diastolanya stabil atau menurun (disfungsi diastole) (Dharma, 2016). Klasifikasi tekanan darah pada manusia dewasa berdasarkan laporan ketujuh dari *Joint Committee on the delection, evaluation and Treatment of High Blood Preasure* (JNC7) dapat dilihat dalam tabel I (JNC VII, 2003).

Tabel I. Klasifikasi tekanan darah pada manusia dewasa

Kategori	Sistolik (mmHg)	Diastolik (mmHg)
Normal	< 120	<80
Prehipertensi	120-139	80-89
Hipertensi derajat 1	140-159	90-99
Hipertensi derajat 2	≥160	≥100

Berdasarkan etiologinya, hipertensi digolongkan menjadi 2 (dua) yaitu :

A. Hipertensi Primer atau Essensial

Hipertensi esensial adalah hipertensi yang tidak jelas etiologinya. Lebih dari 90% kasus hipertensi termasuk dalam kelompok ini. Kelainan hemodinamik utama yang terjadi pada hipertensi esensial adalah peningkatan resistensi perifer. Berbagai mekanisme yang mungkin berperan dalam patogenesis dari hipertensi esensial telah diidentifikasi dan penyebab hipertensi ini adalah multifaktor, yang terdiri dari faktor genetik dan lingkungan. Faktor genetik bersifat poligenik dan dapat terlihat dari adanya riwayat penyakit kardiovaskular dalam keluarga. Faktor predisposisi genetik ini dapat berupa sensitivitas vaskular terhadap natrium, kepekaan terhadap stres, peningkatan reaktivitas vaskular terhadap vasokonstriktor, serta resistensi insulin. Sedangkan faktor lingkungan penyebab hipertensi esensial antara lain, konsumsi garam (natrium) berlebihan, stres psikis, dan obesitas (Saseen dan Carter, 2005).

B. Hipertensi sekunder (Nafrialdi, 2009)

Prevalensi hipertensi tipe ini kurang dari 10% dari penderita hipertensi. Hipertensi sekunder dapat disebabkan oleh penyakit ginjal (hipertensi renal), penyakit endokrin (hipertensi endokrin), obat, dan lain-lain. Hipertensi renal dapat berupa hipertensi renovaskular (hipertensi akibat lesi pada arteri ginjal dan vaskulitis intrarenal) atau hipertensi akibat lesi pada parenkim ginjal yang menimbulkan gangguan fungsi ginjal, seperti glomerulonefritis, pielonefritis, penyakit ginjal plokistik, nefropati, diabetik, dan lain-lain. Hipertensi endokrin dapat terjadi

misalnya karena kelainan korteks adrenal (aldosteronisme primer, sindrom cushing), tumor pada medula adrenal (feokromositoma), akromegali, hipotiroidisme, hiperparatiroidisme, dan lain-lain.

Penyakit lain yang dapat menimbulkan hipertensi adalah koarktasio aorta, kelainan neurologik (tumor otak, ensefalitis), stres akut (seperti luka bakar, bedah), polisitemia, dan lain-lain. Beberapa obat juga dapat mengakibatkan hipertensi baik secara langsung maupun tidak langsung. Beberapa obat yang dapat mengakibatkan hipertensi antara lain kontrasepsi hormonal, hormon adrenokortikotropik, kortikosteroid, simpatomimetik amin (efedrin, fenilefrin, fenilpropanolamin, amfetamin), kokain, siklosporin, eritropoietin, sibutramin, dan lain-lain.

### **2.6.1 Perana Garam Dalam Hipertensi**

Asupan garam yang berlebihan dapat menjadi salah satu faktor penyebab terjadinya hipertensi. Hal ini mungkin disebabkan oleh adanya peningkatan volume cairan yang meningkatkan *cardiac output*. Penumpukan garam di dalam tubuh akan meningkatkan volume cairan ekstra sel secara tidak langsung karena osmolaritas cairan tubuh akan meningkat dan merangsang pusat haus. Hal ini dapat meningkatkan volume cairan ekstraseluler. Kenaikan osmolaritas cairan ekstraseluler juga dapat merangsang mekanisme sekresi kelenjar hipotalamus-hipofisa posterior untuk mensekresi lebih banyak hormon antidiuretik. Hormon ini dapat menyebabkan ginjal mengabsorpsi kembali air dalam jumlah yang besar dari caira tubulus ginjal. Tingginya asupan garam (khususnya natrium) juga diperkirakan berhubungan dengan peningkatan sirkulasi hormon natriuretik yang menghambat transport natrium intraseluler sehingga dapat menyebabkan

peningkatan reaktivitas vaskular dan peningkatan tekanan darah (Port dan Matfin, 2009).

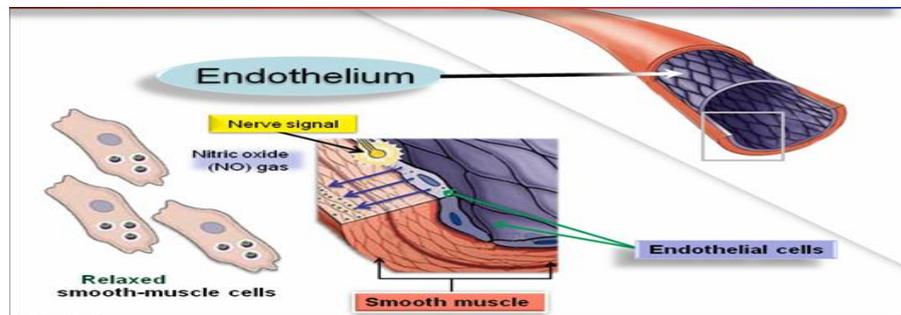
## **2.7 Sel Endotel**

Sel endotel adalah suatu lapisan tunggal yang melapisi seluruh system vascular, terletak di bagian intima pembuluh darah dan melekat pada membran basalis. Sel endotel memiliki inti panjang 5-25 $\mu$ m dan tebal 3 $\mu$ m. Sel endotel ini dapat diidentifikasi dengan menggunakan reaksi antibody terhadap *Faktor von Willebrand* (Faktor pembekuan darah) dan *CD31*. Pada orang dewasa berat badan 70 kg, endotel meliputi area seluas 700 m<sup>2</sup> dengan berat 11,5 kg. Dalam keadaan normal, usia sel endotel sekitar 30 tahun dan setelah itu sel tersebut akan terlepas dan menghilang melalui proses apoptosis, selanjutnya dengan bantuan sel endotel di sekitarnya terjadi regenerasi sel endotel baru (Guyton & Hall, 2007).

Selain itu, sel endotel berperan dalam pemeliharaan pertemuan darah jaringan non trombogenik, modulasi aliran darah dan resistensi vascular, regulasi pertumbuhan tipe sel lain. Sel endotel yang tumbuh secara struktural dapat merespon terhadap berbagai rangsang patofisiologi dengan menyesuaikan fungsi lazimnya dan dengan mengekspresikan sifat baru yang nama proses nya disebut pengaktifan sel endotel (Kumar *et al.*, 2007).

Sel endotel dikenal mempunyai peranan penting dalam sistem kardiovaskular melalui mediator vasodilator dan vasokonstriksi. Pada arteri dengan resistensi kecil, endotel tampaknya mempunyai peran penting dalam keseimbangan antara vasokonstriksi dan vasodilatasi. Kerusakan fungsi sel endotel, dievaluasi oleh respon vasodilator terhadap asetilkolin, yang telah dideteksi pada hipertensi sekunder maupun essensial. Abnormalitas struktur resistensi pembuluh

darah umumnya bersamaan dengan hipertensi kronik dan memiliki peran penting dalam peningkatan resistensi vascular (Sargowo, 2015).



Gambar 1. Sel endotel pada pembuluh darah

### 2.7.1 Fungsi Sel Endotel

Sebagai suatu membran semipermeabel, sel endotel mengendalikan perpindahan molekul besar dan kecil ke dalam dinding pembuluh. Selain itu, endotel berperan dalam memelihara antarmuka darah jaringan nontrombogenik, memodulasi aliran darah dan resistensi vaskuler, metabolisme hormon, pengendalian sel lain, terutama sel otot polos pembuluh darah (Kumar, 2007).

Fungsi endotel sangat banyak dan bermacam-macam, tergantung dari ukuran dan distribusi pembuluh darah. Endotel merupakan sumber yang potensial dari berbagai mediator kimia yang akan memengaruhi aliran darah, deposisi bekuan, lisis bekuan dan aktivitas fagositik selektif. Pemeliharaan tekanan vaskular, permukaan yang thromboresistant, transport nutrien dan cairan yang lain, aktivasi dan inaktivasi berbagai macam fisiologis dari endotel. Penyebab kerusakan endotel termasuk diantaranya lipid, imun kompleks, angioplasti, mikro-organisme, dan toksin yang bekerja sama.

Sel endotel melapisi bagian dalam lumen dari seluruh pembuluh darah dan berperan sebagai penghubung antara sirkulasi darah dan sel-sel otot polos pembuluh darah. Disamping berperan sebagai barier fisik antara darah dan jaringan, sel endotel memfasilitasi berbagai fungsi yang kompleks dari sel otot polos pembuluh darah dan sel-sel di dalam kompartemen darah. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa sel endotel memegang peran penting dalam proses homeostatis yang terjadi melalui integrasi berbagai mediator kimiawi. Sistem ini mempunyai efek baik terhadap sel-sel otot polos pembuluh darah maupun sel-sel darah sehingga dapat menimbulkan berbagai perubahan anatara lain (Sargowo, 2015) :

1. Vasodilatasi atau vasokonstriksi untuk mengatur kebutuhan suplai darah bagi seluruh organ tubuh manusia.
2. Pertumbuhan dan atau perubahan-perubahan khas dari sel-sel otot polos pembuluh darah.
3. Perubahan-perubahan proinflamasi atau inflamasi
4. Memepertahankan kekentalan darah dan mencegah pendarahan.

Tabel II. Fungsi sel endotel (Sargowo, 2015)

Traget fungsional dari sel endotel	Fungsi spesifik	
Lumen	Vasokonstriksi	Vasodilatasi
	<i>Endothelin</i> <i>Angiotensin II</i> <i>ET-1</i> <i>Thromboxane A2</i> <i>PGH<sub>2</sub></i>	<i>NO</i> <i>Bradykinin</i> <i>Hyperpolarizing factor</i>
Pertumbuhan	Stimulasi	Inhibisi
	<i>PGDF</i> <i>FGF</i> <i>IGF-1</i> <i>Endothelin</i> <i>Angiotensin II</i>	<i>NO</i> <i>PGI<sub>2</sub></i> <i>TGF</i>
Inflmasi	Proinflamasi	Antiinflamasi
	<i>Adhesion molecules</i> <i>ELAM, VCAM, ICAM</i>	
Hemostatis	Protombotik	Antitrombotik
	<i>PAI-1</i>	<i>Prostacylin</i> <i>TPA</i>

Keterangan :

1. ELAM = Endothelial leucocyte adhesion molecule
2. ET-1 = Endotelin-1
3. FGF = Fibroblast growth factor
4. ICAM = Intercellular adhesion molecule
5. IGF-1 = Insulin-like growth factor 1

6. PGDF = Platelet growth derivat factor
7. PGH2 = Prostaglandin H2
8. PGI2 = Prostaglandin I2
9. TGF = Transforming growth factor
10. VCAM = Vascular cell adhesion molecule

### **2.7.2 Disfungsi Sel Endotel**

Disfungsi sel endotel sangat penting pada patogenesis penyakit pembuluh darah. Pemicu disfungsi sel endotel antara lain sitokin dan produk bakteri, inflamasi dan syok sepsis, stress hemodinamik dan hiperkolesterol (Kumar, 2007).

Letak sel endotel pada pembuluh darah sangat menguntungkan tapi juga sekaligus merugikan, karena pada keadaan hipertensi, diabetes melitus dan hiperlipidemia, sel endotel menjadi sasaran dari kerusakan akibat penyakit-penyakit tersebut. Istilah disfungsi sel endotel menerangkan beberapa jenis perubahan (secara reversibel) status fungsional sel endotel yang terjadi sebagai respon terhadap rangsangan lingkungan. Disfungsi sel endotel menyebabkan gangguan vasodilatasi dependen endotel, penurunan sintesis NO, peningkatan kadar endotelin dan pembentukan radikal bebas oksigen (Cooke, 1997).

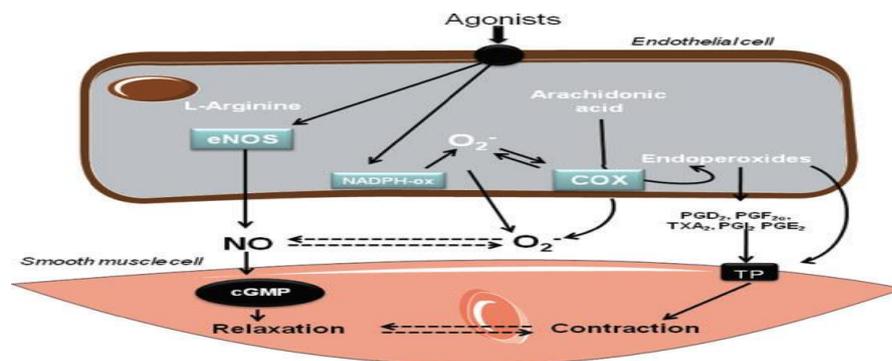
Dari penelitian yang dilakukan untuk menjelaskan disfungsi sel endotel pada penderita hipertensi, dimana diteliti pengaruh aliran darah pada lengan atas dengan memberikan asetikolin dan hasilnya dibandingkan dengan penderita normotensi. Dari penelitian tersebut ditemukan bahwa disamping usia, hal lain yang mempengaruhi terjadinya disfungsi sel endotel adalah tekanan darah yang tinggi. Dari penelitian tersebut didapat bahwa pada penderita normotensi adanya perubahan respon asetilkolin terhadap aliran darah mulai tampak pada usia diatas

30 tahun. Sebaliknya pada penderita hipertensi adanya perubahan pada jalur NO dapat diketahui sejak usia 18 tahun. Dengan demikian hipertensi akan mempercepat terjadinya disfungsi endotel (Taddei *et al.*, 1998).

Pada penderita hipertensi essensial terjadi gangguan vasodilatasi pembuluh darah dan dominannya faktor konstriksi serta terbentuknya superoksida radikal oleh endotel. Hal ini disebabkan karena berkurangnya aktivitas NO. Aktivitas NO yang berkurang oleh beberapa hal antara lain oleh (Panza *et al.*, 1995) :

1. Sintesa NO pada endotel berkurang
2. Penghancuran NO oleh anion superoksida, prostanioid (melalui jalur siklooksigenase)
3. Terbentuknya endotelin-1 yang berlebihan.

Pada gambar dibawah ini dapat dilihat pembentukan NO oleh sel endotel dan peranannya pada pembuluh darah.



Gambar 2 : pembentukan NO oleh sel endotel dan peranannya pada pembuluh darah (Versari *et al.*, 2009).

### **2.7.3 Hubungan Garam (NaCl) dengan Disfungsi Sel Endotel**

Asupan garam (NaCl) yang tinggi dapat menurunkan produksi nitrogen monoksida, hal ini terjadi akibat terganggunya sintesis nitrogen monoksida dari asam amino L-arginin pada endothelium pembuluh darah ginjal (Higashi, *et al.*, 1996). Konsentrasi nitrogen monoksida plasma menurun akibat adanya asupan garam berlebih. Hal ini menunjukkan produksi nitrogen monoksida endogen dipengaruhi oleh asupan garam (Fujiwara, *et al.*, 2000).

Pada kebanyakan model hipertensi, tekanan darah yang tinggi disertai oleh hambatan relaksasi otot polos pembuluh darah. Peningkatan tekanan darah akan menyebabkan terjadinya disfungsi sel endotel. Mekanisme disfungsi sel endotel pada berbagai model hipertensi. Pada kasus hipertensi induksi garam terjadi gangguan pada aktivitas NO synthase dari sel endotel, sedangkan produksi endothelin dan aktivitas fungsional endothelium converting enzyme (ECE) pada pembuluh darah tikus Wistar-Kyoto mengalami peningkatan (Thomas, *et al.*, 1997).

## **2.8 Nitrogen Monoksida (N.O)**

Nitrogen monoksida (NO) juga disebut nitrogen oksida atau nitrit oksida (*Nitric Oxide*) adalah suatu gas tak berwarna, larut di dalam air, pada kondisi seperti ini NO sangat stabil. Gas NO dihasilkan dari asam amino L-arginin oleh enzim *nitric oxide synthase* dalam sel-sel mamalia termasuk sel manusia (Silalahi, 2005).

NO yang diproduksi secara kontinu oleh sel-sel endothelium berperan mengendalikan tonus pembuluh darah, aliran darah, tekanan darah, fungsi platelet, gerakan saluran pencernaan, saluran pernafasan dan saluran kemih. NO dalam

jumlah banyak dapat menimbulkan perubahan patofisiologis seperti hipotensi yang fatal dan kerusakan jaringan (Silalahi, 2005).

Pada endotel NO diproduksi dari L-Arginin dengan bantuan enzim NO sintase (NOS). Enzim ini dirangsang oleh adanya aliran darah melewati permukaan endotel, bradikinin, serotonin dan trombin. Selanjutnya NO tersebut secara difusi memasuki sel otot polos pembuluh darah dan mengaktifkan enzim guanilat siklase yang terdapat dalam otot polos tersebut. Enzim guanilat siklase ini selanjutnya menghasilkan siklik guanidine mono pospat (cGMP) yang menyebabkan relaksasi pada otot polos pembuluh darah. Disamping bersifat vasodilator, NO juga berfungsi menghambat proliferasi sel otot polos pembuluh darah dan menghambat leukosit (Mac Allister, 1998).

### **2.8.1 Biosintesa Nitrogen Monoksida (NO)**

Nitrogen monoksida (NO) atau dikenal juga dengan nitrit oksida disintesa di dalam sel oleh enzim *Nitric Oxide Syntase* (NOS) melalui reaksi yang kompleks. *Nitric Oxide Syntase* (NOS) pada manusia mempunyai tiga macam bentuk, yaitu *Neuron Nitric Oxide* (nNOS) yang ditemukan pada sel saraf, *Inducible Nitric Oxide* (iNOS) yang ditemukan pada makrofag dan *Endothelial Nitric Oxide* (eNOS) yang ditemukan pada sel endotel pembuluh darah. Kadar nNOS dan eNOS dalam tubuh relative stabil, sedangkan untuk kadar iNOS dipengaruhi oleh rangsangan seperti ingesti dari parasit (Silalahi, 2005).

Semua jenis NOS dapat membentuk nitrit oksida dari arginin dengan bantuan oksigen molekuler dan NADPH, hasil lain dari reaksi ini adalah sitrulin. NO diproduksi karena pengaruh asetilkolin, bradikinin, serotonin yang mempengaruhi reseptor spesifik pada sel endotel. Di dalam darah NO hanya

bertahan 100 milidetik dan di jaringan hanya beberapa detik karena zat ini berikatan dengan oksigen membentuk nitrit. Nitrit kemudian diubah menjadi nitrat dan diekskresikan dalam urin (Silalahi, 2005).

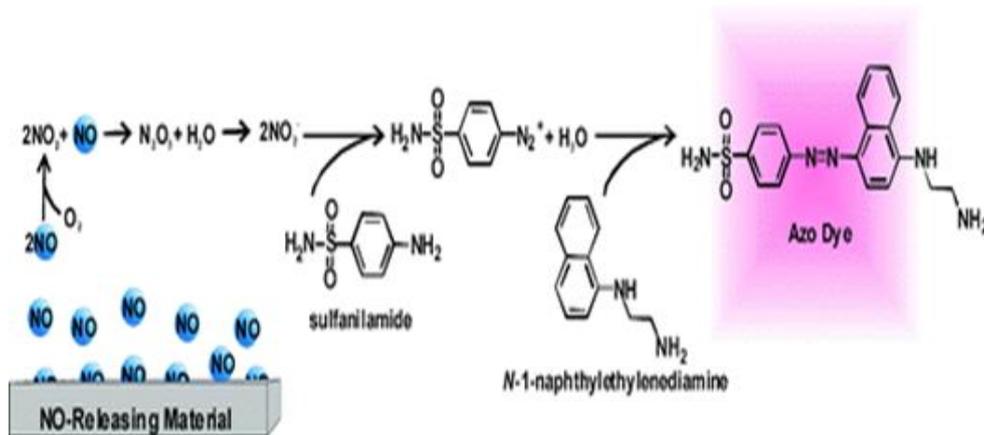
### **2.8.2 Faktor – faktor Yang Mempengaruhi Nitrogen Monoksida (N.O)**

Faktor resiko seperti hipertensi, merokok, diabetes, umur, obesitas, dislipidemia, dan *sedentary life style*, semuanya dapat menyebabkan disfungsi endotel. Proses sistemis yang menginduksi disfungsi endotel adalah melibatkan aktivasi *intracellular oxidative signaling*, juga terjadi oksidasi LDL (Xi *et al.*, 2007).

Telah terbukti adanya penurunan bioavailabilitas NO akibat disfungsi endotel. Terjadi gangguan vaskuler karena kelebihan produksi ROS, diantaranya anion superoksida dan LDL (*low density lipoprotein*) teroksidasi. Penurunan antioksidan diduga bertanggung jawab terhadap peningkatan degradasi NO. Anion superoksid dapat secara langsung menginaktifkan NO melalui proses reaksi oksidasi membentuk peroksi nitrit, yang merupakan komponen radikal bebas yang sangat kuat (Xi *et al.*, 2007).

### 2.8.3 Pengukuran NO Menggunakan Reagen GRIESS

NO merupakan gas yang tidak stabil dengan waktu paruh yang pendek sehingga sulit untuk diukur secara langsung. Meskipun begitu, dua produk stabil dari NO yaitu nitrat ( $\text{NO}_3$ ) dan Nitrit ( $\text{NO}_2$ ) dapat diukur dengan fotometri menggunakan percobaan GRIESS berdasarkan reaksi diazotasi diperkenalkan oleh Peter Griess pada tahun 1879.



Gambar 3 : Reaksi kimia yang terlibat pada pengukuran Nitrit dengan Reagen GRIESS.

Konversi nitrat menjadi nitrit menggunakan Enzim Nitrat Reduktase. Nitrit di deteksi dari pembentukan warna merah muda akibat reaksi nitrit ditambahkan dengan reagen GRIESS melalui dua langkah. Pada saat nitrit ditambahkan sulfanilamide, nitrit membentuk garam diazonium. Dengan penambahan alpha-naphthylamine atau N-(1-naphthyl)-ethylenediamine akan terbentuk senyawa azo yang berwarna merah muda (Ghasemi *et al*, 2007).

## 2.9 Pengobatan Disfungsi Endotel pada Hipertensi (Sargowo, 2015)

Mengingat peran penting dari endotel dalam mengontrol fungsi vaskular, inflamasi, trombosis dan proliferasi, serta mempertimbangkan perubahan dalam fungsi endotel pada hipertensi, jelas bahwa disfungsi endotel harus dianggap sebagai target utama untuk pengobatan hipertensi.

Beberapa pengobatan disfungsi endotel telah diuji pada hipertensi, misalnya antioksidan, *tetrahydrobiopterin* (BH4), atau L-arginin. Namun, saat ini pengobatan “selektif” untuk disfungsi sel endotel masih kurang. Sebagai hasilnya, saat ini sulit untuk menentukan dengan tepat kemungkinan kaitan antara disfungsi endotel dan hipertensi atau pengaruhnya pada organ target seperti jantung, otak atau ginjal. Namun, pengaruh pada disfungsi endotel dari berbagai obat antihipertensi telah diuji meskipun umumnya sulit untuk membedakan antara efek langsung yang mungkin timbul dari obat pada fungsi endotel dari proteksi tidak langsung terhadap penurunan tekanan darah.

### 1. Penghambat sistem renin-angiotensin

Banyak penelitian telah menunjukkan bahwa *angiotensin converting enzyme* (ACE) inhibitor meningkatkan fungsi endotel pada hipertensi. Misalnya, dalam SHR, ACE inhibitor cilazapril meningkatkan dilatasi endotel terhadap asetilkolin di aorta. Suatu peningkatan yang serupa juga ditemukan dengan kombinasi ACE inhibitor-diuretik perindopril-indapamide, yang mengembalikan produksi NO dan mengurangi respon kontraktilitas endotel aorta SHR.

Bukti untuk perlindungan endotel oleh *blocker* sistem renin-angiotensin juga ada pada manusia. Pada hipertensi essensial,

penghambatan ACE inhibitor dan angiotensin II reseptor tipe I (AT<sub>1</sub>) meningkatkan pelepasan NO basal dan respon aliran darah koroner atau lengan terhadap asetilkolin, sementara ACE inhibitor atau kombinasi perindopril-Indapamide juga meningkatkan vasodilatasi yang diperantarai aliran dari arteri brakhialis.

## 2. Antagonis kalsium

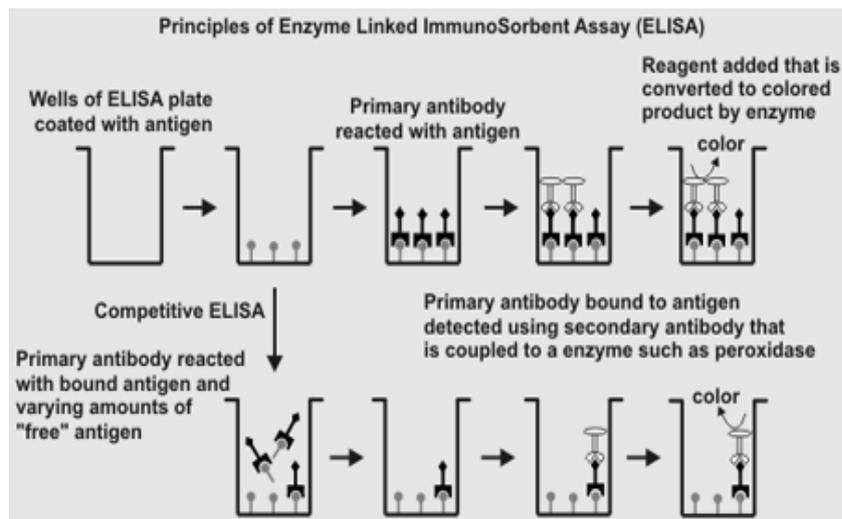
*Calcium channel blockers* dapat meningkatkan fungsi endotel pada hipertensi eksperimental dan pada pasien hipertensi. Perbaikan diinduksi oleh *dihydropyridine* *Lacidipine* yang tidak ditemukan dengan  $\beta$ -blocker dan disertai dengan perbaikan dalam beberapa *marker* stres oksidatif. Namun, tampaknya penurunan serupa pada tekanan arteri, Ca antagonis dari generasi pertama seperti nifedipine kurang efektif dari pada ACE inhibitor dalam hal peningkatan fungsi endotel. Mekanisme pengaruh pelindung endotel dari Ca antagonis dalam hipertensi masih belum diketahui tetapi bisa terjadi akibat pencegahan stres oksidan.

## 3. $\beta$ -blocker

Sejumlah studi menunjukkan bahwa fungsi endotel tidak terpengaruh oleh kelas obat ini. Namun, obat-obatan seperti nebivolol, suatu  $\beta_1$ -blocker dengan NO, telah ditunjukkan untuk meningkatkan fungsi endotel pada hipertensi. Bahkan jika pengaruh ini jelas hasil peningkatan NO, ini menunjukkan bahwa  $\beta$ -blocker dengan sifat vaskular spesifik dapat memiliki efek menguntungkan pada fungsi endotel.

## 2.10 *Enzyme – Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

ELISA merupakan metode analisis kuantitatif yang pada salah satu reagensinya dilabelkan dengan enzim, baik itu antigen atau antibodi. Sumur medium pembawa (biasanya plat mikrotiter) dilapisi dengan antigen yang berhubungan dengan antibodi sasaran. Bila antibodi tersebut berada pada sampel (contohnya serum), antibodi ini akan mengikat antigen. Setelah itu, enzim akan terikat pada antibodi. Enzim yang telah dilabelkan oleh antibodi sekunder tersebut akan menyebabkan warna pada substrat. Konsentrasi antibodi dapat ditentukan dengan membandingkan warna yang dihasilkan dengan standar yang telah diketahui konsentrasinya (Burmester *et al*, 2003).



Gambar 4 : Prinsip kerja *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

## **BAB III**

### **PELAKSANAAN PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini telah dilakukan kurang lebih sampai bulan November 2017 di Laboratorium Farmakologi Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia (STIFI) dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat-alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah botol maserasi, seperangkat alat *rotary evaporator*, wadah hewan, timbangan analitik (Adam®), timbangan hewan, *erlemeyer* (Iwaki®), oven (Mummert®), desikator (Dormax®), sentrifugator (Heraeus®), lumpang dan stamper, lemari pendingin, alat spektrofotometer *BIO-RAD (xMark®)*.

##### **3.2.2 Bahan-bahan**

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun sirsak (*Annona muricata* L.), etanol 70%, serbuk Magnesium, Norit, Asam asetat anhidrat, asam klorida pekat (HCl), asam sulfat pekat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), kloroform, amoniak, pereaksi Mayer (raksa klorida + kalium iodida), besi klorida (FeCl<sub>3</sub>), Natrium karboksimetil selulosa (Na CMC), air suling (aquades), makanan mencit biasa, Natrium klorida (NaCl), dan Kit *Nitric Oxide calorimetric Assay*.

### **3.2.3 Hewan Percobaan**

Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit putih (*Mus musculus*) jantan dengan berat badan 20-30 gram dan berumur 2-3 bulan.

## **3.3 Metode Penelitian**

### **3.3.1 Pengambilan Sampel**

Pengambilan sampel dilakukan dengan cara mengambil daun sirsak (*Annona muricata* L.) di daerah Kenagarian Sibakur, Kabupaten Sijunjung, Sumatera barat.

### **3.3.2 Identifikasi Sampel**

Identifikasi sampel dilakukan di Herbarium Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas.

### **3.3.3 Pembuatan ekstrak etanol Daun sirsak (*Annona muricata* L.)**

Daun sirsak (*Annona muricata* L) segar sebanyak 750 g dicuci dan dibersihkan dari pengotor dirajang kemudian dikering anginkan, simplisia daun sirsak dimasukkan ke dalam botol maserasi dan ditambahkan etanol 70% sampai terendam. Rendam selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Pisahkan maserat dengan cara filtrasi menggunakan kain flanel, ulangi proses penyarian sebanyak dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Kumpulkan semua maserat, kemudian uapkan dengan penguap vakum atau penguap tekanan rendah hingga diperoleh ekstrak kental (DepKes RI, 1985).

### 3.3.4 Evaluasi Ekstrak Etanol Daun sirsak (*Annona muricata* L.)

#### A. Pemeriksaan Organoleptis ekstrak

Pengamatan dilakukan secara visual dengan mengamati bentuk, rasa, warna dan bau.

#### B. Pemeriksaan Rendemen Ekstrak

Rendemen ekstrak dihitung dengan cara membandingkan berat ekstrak etanol yang didapat dengan berat awal sampel.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat awal sampel}} \times 100\%$$

#### C. Uji Fitokimia Daun Sirsak (*Annona muricata* L.)

Ekstrak kental daun sirsak dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian tambahkan 5 ml aquadest dan 5 ml kloroform, dibiarkan sampai terbentuk dua lapisan, lapisan air dan kloroform. (Harborne, 1987). Beberapa uji yang dapat dilakukan terhadap ekstrak etanol daun sirsak adalah sebagai berikut :

##### 1. Uji Flavonoid (Metoda “Sianidin Test”)

Ambil lapisan air 1-2 tetes, teteskan pada plat tetes lalu tambahkan serbuk Mg dan HCl (p), terbentuknya warna merah menandakan adanya flavonoid.

##### 2. Uji Terpenoid dan Steroid (Metoda “Simes”)

Ambil sedikit lapisan kloroform tambahkan norit kemudian disaring, tambahkan asam asetat anhidrat, tambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (p), terbentuknya warna biru ungu menandakan adanya steroid, sedangkan bila terbentuk warna merah menandakan adanya terpenoid.

### 3. Uji Saponin

Diambil lapisan air, kocok kuat-kuat dalam tabung reaksi, terbentuknya busa yang permanen ( $\pm$  15 menit) menunjukkan adanya saponin.

### 4. Uji Fenolik

Diambil lapisan air 1-2 tetes, teteskan pada plat tetes lalu tambahkan pereaksi  $\text{FeCl}_3$ , terbentuknya warna biru menunjukkan adanya fenolik.

### 5. Uji Alkaloid (Metode “Culvenore – Fristgerald”)

Diambil sedikit lapisan kloroform tambahkan 10 ml kloroform amoniak 0,05 N, aduk perlahan tambahkan beberapa tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N kemudian dikocok perlahan, biarkan memisah. Lapisan asam ditambahkan beberapa tetes pereaksi Mayer, reaksi positif alkaloid ditandai dengan adanya kabut putih hingga gumpalan putih.

## **D. Pemeriksaan Susut Pengerinan**

Prosedur : Timbang krus porselen yang sebelumnya telah dikeringkan selama 30 menit di dalam oven pada suhu  $105^0$  C dan didinginkan dalam desikator (A). Timbang ekstrak sebanyak 1 gram. Masukkan ekstrak ke dalam krus tersebut dan timbang (B). Kemudian perlahan-perlahan krus digoyang agar ekstrak merata. Masukkan ke dalam oven, buka tutupnya dan biarkan tutup ini berada dalam oven. Panaskan selama 1 jam pada suhu  $105^0\text{C}$ , dinginkan dan masukkan ke dalam desikator, timbang kembali. Ulangi perlakuan seperti di atas

hingga bobot tetap (selisih penimbangan terakhir dengan penimbangan sebelumnya 0,001) (C). Hitung susut pengeringan dengan rumus:

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{(B-A)-(C-A)}{(B-A)} \times 100\%$$

Keterangan :A = Berat krus kosong (g)

B = Berat krus ditambah ekstrak sebelum pengeringan(g)

C = Berat krus ditambah ekstrak setelah pengeringan (g)

### **E. Pemeriksaan Kadar Abu**

Prosedur : Timbang ekstrak sebanyak 2 gram, dimasukkan ke dalam krus porselen yang telah dipijarkan dan ditara, kemudian ekstrak diratakan. Pijarkan perlahan-lahan sampai terbentuk arang. Krus dimasukkan ke dalam furnes suhu 600°C selama 8 jam, kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang berat abu, kadar abu ditentukan dalam persen terhadap berat sampel yang digunakan.

$$\text{Kadar abu} = \frac{(C-A)}{(B-A)} \times 100\%$$

Keterangan : A = Berat krus kosong

B = Berat krus ditambah ekstrak sebelum pengeringan

C = Berat krus ditambah ekstrak setelah pengeringan

### **3.3.5 Penyiapan Hewan Percobaan**

Hewan percobaan yang digunakan dalam percobaan ini adalah mencit putih jantan dengan berat badan 20 - 30 g dan berumur 2-3 bulan. Jumlah mencit yang digunakan adalah 25 ekor, dibagi menjadi 5 kelompok. Masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit. Satu

minggu sebelum penelitian mencit diaklimatisasi. Mencit yang digunakan adalah yang sehat dan selama aklimatisasi berat badannya tidak berubah lebih dari 10%.

### 3.3.6 Pembuatan Larutan NaCl

NaCl dibuat dalam konsentrasi 3%, dimana dosis 3 gram dilarutkan dalam 100 mL air suling. Sebanyak 0,2 mL larutan NaCl diberikan pada mencit tiap harinya selama 3 minggu secara oral (Modifikasi Siska dkk, 2010).

### 3.3.7 Perencanaan Dosis

Sebanyak 750 gram daun sirsak segar, dirajang dan dikering anginkan kemudian diekstraksi, diperoleh ekstrak kental sebanyak 31.38 gram, nilai rendemen yang didapat adalah sebesar 5,08%. Penggunaan tradisional sebanyak 15 helai daun sirsak dengan berat sebesar  $\pm 10$  gram.

$$\begin{aligned} \text{Dosis ekstrak untuk manusia} &= \frac{5,08}{100} \times 10 \text{ gram} \\ &= 0,508 \text{ gram} \end{aligned}$$

$$= 508 \text{ mg}$$

$$\text{Faktor konversi ke mencit} = 0,0026$$

$$\text{Dosis ekstrak untuk mencit} = 508 \text{ mg} \times 0,0026$$

$$= 1,3208 \text{ mg}/20 \text{ gramBB}$$

$$= 1,3208 \text{ mg} \times \frac{1000 \text{ gram}}{20 \text{ gram}}$$

$$= 66,04 \text{ mg/kgBB}$$

$$= \sim 50 \text{ mg/kgBB}$$

$$\text{Dosis ekstrak terendah} = 50 \text{ mg/kgBB}$$

$$\text{Dosis ekstrak tertinggi} = 200 \text{ mg/kgBB}$$

$$\text{Jumlah dosis ekstrak} = 3$$

$$\begin{aligned} \text{Nilai F} &= \sqrt[3-1]{200 \frac{\text{mg}}{\text{kgBB}} / 50 \text{mg/kgBB}} \\ &= \sqrt[2]{4} \\ &= 2 \end{aligned}$$

$$\text{Dosis ekstrak 1} = 50 \text{ mg/kgBB}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis ekstrak 2} &= 50 \text{ mg/kgBB} \times 2 \\ &= 100 \text{ mg/kgBB} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis ekstrak 3} &= 100 \text{ mg/kgBB} \times 2 \\ &= 200 \text{ mg/kgBB} \end{aligned}$$

Dosis pemberian ekstrak daun sirsak yang direncanakan adalah 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB. VAO (volume Administrasi Obat) ekstrak yang diberikan kepada mencit yaitu 1% dari berat badan mencit normal (20 gram).

$$\text{VAO} = 1\% \times 20 \text{ g} = 0,2 \text{ ml}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi ekstrak yang dibuat} &= \frac{\text{dosis} \left( \frac{\text{mg}}{\text{kgBB}} \right) \times \text{berat bada (g)}}{\text{VAO}} \\ &= \frac{50 \frac{\text{mg}}{\text{kgBB}} \times 20 \text{ gram}}{0,2 \text{ ml}} \\ &= \frac{50 \frac{\text{mg}}{1000} \text{gBB} \times 20 \text{ gram}}{0,2 \text{ ml}} \\ &= 5 \text{ mg/ml} \\ &= 50 \text{ mg/10 ml} \\ &= 500 \text{ mg/100 ml} \\ &= 0,5 \text{ gram/100 ml} \\ &= 0,5\%. \end{aligned}$$

### 3.3.8 Pembuatan Sediaan Uji

Ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L) ditimbang sebanyak 50 mg. Kemudian timbang Na CMC sebanyak 50 mg ditaburkan ke dalam lumpang yang berisi air suling panas sebanyak 1 ml, ditutup dan biarkan selama 15 menit hingga diperoleh masa yang transparan, digerus lalu masukkan ekstrak yang telah ditimbang untuk dosis pertama 50 mg, gerus sampai homogen encerkan dengan air suling hingga 10 ml. Untuk dosis 100 mg/kgBB dan 200 mg/kgBB, lakukan pembuatan sediaan seperti diatas.

### 3.3.9 Perlakuan Pada Hewan Uji

Hewan percobaan dikelompokkan menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit putih jantan dan diperlakukan dengan cara berikut :

Tabel III : Pengelompokkan Hewan Percobaan

<b>Perlakuan</b>	<b>Dosis</b>
Kontrol Negatif	Na.CMC 0,5%
Kontrol Positif	NaCL 3%
Ekstrak dosis I	NaCL 3% + 50 mg/kg BB
Ekstrak dosis II	NaCL 3% + 100 mg/kg BB
Ekstraks dosis III	NaCl 3% + 200 mg/kg BB

Hewan kelompok I diberi makanan mencit biasa dan suspensi Na CMC 0,5% setiap hari selama penelitian. Hewan kelompok II diberi NaCl 3% secara peroral. Hewan kelompok III, IV dan V diberi NaCL, 1 jam setelahnya diberi ekstrak dosis berturut-turut 50 mg/kg BB, 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB. Perlakuan dilakukan selama 3 minggu.

### 3.3.10 Penyiapan Serum

Setelah perlakuan selama 3 minggu hewan percobaan dikorbankan untuk mendapatkan serum. Pengambilan serum dilakukan dengan cara mengambil darah melalui pembuluh darah leher hewan percobaan. Darah diambil dengan cara memotong pembuluh darah pada leher mencit dan ditampung dengan tabung mikrotube, dan didiamkan selama 15 menit. Kemudian dilakukan sentrifuge dengan 4000 rpm selama 20 menit. Serum diambil dengan jarum suntik dan dituangkan ke dalam tabung mikro dan disimpan dalam *freezer* dengan posisi tegak.

### 3.3.11 Pemeriksaan Rasio Berat Organ (Thomas, 1998)

Hewan yang dikorbankan pada hari ke 22 setelah perlakuan dibedah pada bagian abdomen secara vertikal. Organ hati, ginjal, dan jantung diambil lalu dibersihkan kemudian ditimbang. Selanjutnya ditentukan rasio berat organ terhadap berat badan dengan menggunakan persamaan :

$$RO = \frac{BO}{BB}$$

Keterangan : RO = Rasio berat organ

BO = Berat organ (gram)

BB = Berat badan mencit (gram)

### 3.3.12 Pemeriksaan Kadar NO Serum

Pemeriksaan kadar NO dilakukan dengan menggunakan Kit *Nitric Oxide Colorimetric Assay* dan alat spektrofotometer produksi Bio-Rad. Jumlah sumur pada plat mikrotiter yang digunakan sebanyak 56 buah yang terdiri dari 6 sumur standar, 25 sumur blanko dan 25 sumur sampel.

Pemeriksaan kadar NO serum dilakukan dengan cara memipet 85  $\mu\text{L}$  sampel dan tambahkan 115  $\mu\text{L}$  *Assay Buffer* ke dalam sumur sampel. Tambahkan 5  $\mu\text{L}$  *Nitrate Reductase* dan tambahkan 5  $\mu\text{L}$  *Enzyme Cofactor*. Tutup plat dan inkubasi dalam temperatur ruangan selama 1 jam untuk mengubah nitrat menjadi nitrit. Setelah itu, tambahkan 5  $\mu\text{L}$  *Enhancer* dan inkubasi selama 10 menit. Kemudian tambahkan 50  $\mu\text{L}$  *Griess Reagen R1* dan 50  $\mu\text{L}$  *Griess Reagen R2* ke dalam sumur sampel. Untuk sumur blanko, pipet 85  $\mu\text{L}$  serum dan tambahkan 115  $\mu\text{L}$  *Assay Buffer* masukkan ke dalam sumur blanko. Sedangkan untuk sumur standar, dibuat 6 seri konsentrasi dengan cara memipet 0  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$ , 4  $\mu\text{L}$ , 6  $\mu\text{L}$ , 8  $\mu\text{L}$ , dan 10  $\mu\text{L}$  larutan *Nitrate Standard* kemudian ditambahkan *Assay Buffer* sampai volume 85 $\mu\text{L}$ . Kemudian *Microplate* dimasukkan ke dalam *plate reader* spektrofotometer-BioRad<sup>®</sup>, absorban diukur pada panjang gelombang 540 nm.

### **3.3.13 Analisis Data dan Pengolahan Data Hasil Penelitian**

Data hasil penelitian yang didapatkan diolah dengan uji analisa variasi (ANOVA), penggunaan uji analisa variasi (ANOVA) untuk mengetahui signifikansi perbedaan rata-rata antara kelompok sampel yang satu dengan yang lain, dimana variabelnya adalah variabel kategorik (hewan kelompok percobaan) dan variabel numerik (kadar NO serum), sementara itu jenis uji anova yang dipakai menggunakan uji anova satu arah, dikarenakan membandingkan data dua variabel yaitu variabel bebas dan variabel terikat, variabel bebas adalah dosis atau konsentrasi sedangkan variabel terikat adalah nilai atau kadar dari masing-masing

konsentrasi dianalisa dengan menggunakan SPSS 16 dan dilanjutkan dengan uji Duncan untuk memvalidasi data yang didapat.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 HASIL

##### 1. Identifikasi Sampel

Identifikasi sampel dilakukan di Herbarium Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas dengan hasil identifikasi yaitu spesies *Annona muricata* Linn. Famili Annonaceae (Lampiran 1).

##### 2. Hasil Pemeriksaan Rendemen Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.)

Hasil penelitian 750 gram sampel daun sirsak segar dikeringanginkan selama beberapa hari. Sebanyak 618 gram sampel daun sirsak kering dimaserasi dengan pelarut etanol 70% diperoleh ekstrak kental sebanyak 31,38 gram dengan hasil rendemen 5,08%. (Lampiran 3, Tabel IV).

##### 3. Hasil Pemeriksaan Organoleptis Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.)

Pada pengujian organoleptis ekstrak daun sirsak hasil yang diperoleh bahwa sampel berupa ekstrak kental, berwarna hijau kehitaman, bau khas aromatik, dan rasa pahit (Lampiran 3, Tabel V).

##### 4. Hasil Pemeriksaan Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.)

- a. Hasil Pemeriksaan susut pengeringan ekstrak daun sirsak adalah 15,98% (Lampiran 3, Tabel VI). Hasil pemeriksaan kadar abu ekstrak daun sirsak adalah 2,75% (Lampiran 3, Tabel VII).

b. Hasil pemeriksaan fitokimia diperoleh hasil bahwa ekstrak daun sirsak terdapat kandungan flavonoid, terpenoid, fenolik, saponin, dan alkaloid (Lampiran 3, Tabel VIII).

## **5. Pengukuran Kadar Nitrit Oxide (NO) Serum**

Hasil pengukuran kadar NO serum rata-rata dari kelompok negatif 2,056 nmol/ $\mu$ L, kontrol positif 1,150 nmol/ $\mu$ L, dosis ekstrak daun sirsak 50 mg/kgBB 1,836 nmol/ $\mu$ L, dosis ekstrak daun sirsak 100 mg/kgBB 2,122 nmol/ $\mu$ L, dan dosis ekstrak daun sirsak 200 mg/kgBB 1,625 nmol/ $\mu$ L (Lampiran 5, tabel X). Berdasarkan analisa secara statistik menunjukkan bahwa dosis ekstrak daun sirsak 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB mengalami peningkatan kadar NO yang berbeda nyata bila dibandingkan dengan kontrol positif  $P < 0,05$  (Lampiran 4, tabel IX).

## **6. Pengukuran Rasio Berat Organ terhadap Berat Badan**

### **a. Pengukuran Rasio Berat Hati**

Rata-rata rasio berat organ hati kelompok kontrol negatif ( $0,0507 \pm 0,0127$ ), kontrol positif ( $0,0431 \pm 0,0088$ ), dosis ekstrak daun sirsak 50 mg/kgBB ( $0,048 \pm 0,009$ ), dosis ekstrak daun sirsak 100 mg/kgBB ( $0,0507 \pm 0,0076$ ), dan dosis ekstrak daun sirsak 200 mg/kgBB ( $0,0418 \pm 0,0076$ ) (Lampiran 9, tabel IVX). Berdasarkan analisa secara statistik, rasio berat organ hati ekstrak daun sirsak dosis 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB menunjukkan bahwa tidak adanya perbedaan dilihat dari nilai  $P > 0,05$  (Lampiran 5, tabel XIII)

#### b. Pengukuran Rasio Berat Ginjal

Rata-rata rasio berat organ ginjal kelompok kontrol negatif ( $0,0127\pm 0,0009$ ), kontrol positif ( $0,007\pm 0,0036$ ), dosis ekstrak daun sirsak 50 mg/kgBB ( $0,0132\pm 0,0053$ ), dosis ekstrak daun sirsak 100 mg/kgBB ( $0,012\pm 0,003$ ), dan dosis ekstrak daun sirsak 200 mg/kgBB ( $0,011\pm 0,0011$ ) (Lampiran 10, tabel XVI). Berdasarkan analisa secara statistik, rasio berat organ ginjal ekstrak daun sirsak dosis 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB menunjukkan bahwa tidak adanya perbedaan dilihat dari nilai  $P>0,05$  (Lampiran 6, tabel XV).

#### c. Pengukuran Rasio Berat Jantung

Rata-rata rasio berat organ jantung kelompok kontrol negatif ( $0,0036\pm 0,0005$ ), kontrol positif ( $0,0047\pm 0,0004$ ), dosis ekstrak daun sirsak 50 mg/kgBB ( $0,0048\pm 0,0012$ ), dosis ekstrak daun sirsak 100 mg/kgBB ( $0,0048\pm 0,0002$ ), dan dosis ekstrak daun sirsak 200 mg/kgBB ( $0,0048\pm 0,0007$ ) (Lampiran 11, tabel XVIII). Berdasarkan analisa secara statistik, rasio berat organ jantung ekstrak daun sirsak dosis 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB menunjukkan bahwa tidak adanya perbedaan dilihat dari nilai  $P>0,05$  (Lampiran 7, tabel XVII).

## 4.2 Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek proteksi ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap kerusakan sel endotel. Simplisia yang digunakan pada penelitian ini diambil di daerah kenagarian Sibakur Kecamatan Tanjung Gadang, kabupaten Sijunjung, Sumatera Barat. Alasan pengambilan sampel di daerah tersebut karena banyak ditemukan dan digunakan oleh

masyarakat untuk pengobatan tradisional dengan cara meminum air rebusan daun sirsak, dimana diharapkan khasiatnya sebagai obat antihipertensi. Telah dilakukan identifikasi di Herbarium Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang. Dari hasil identifikasi daun sirsak yang digunakan pada penelitian ini, sama dengan koleksi yang ada di Herbarium. Pada pemakaian masyarakat, biasanya daun yang diambil adalah daun yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua karena apabila daun yang terlalu tua dikhawatirkan kandungann zat aktif yang diharapkan telah menurun, begitupun dengan daun yang terlalu muda. Para praktisi pengobatan dan industri herbal biasanya memilih daun sirsak pada lembar ke dari pucuk. Daun yang dipakai pada penelitian ini adalah daun segar yang telah dikering anginkan.

Daun sirsak (*Annona muricata* L.) sebelum diekstraksi, sampel dirajang bertujuan untuk memperluas bidang permukaan dan mempercepat penetrasi pelarut kedalam sel sampel, dan mempercepat pelarutan senyawa-senyawa yang terkandung didalam sampel (Harbone, 1987). Daun sirsak segar yang diambil sebanyak 750 gram, kemudian dikering anginkan hingga didapatkan berat daun sirsak kering 618 gram, Kemudian diekstraksi diperoleh berat ekstrak kental 31,38 gram dengann randemen ekstrak 5,08% (Lampiran 3, tabel IV).

Ekstraksi sampel dilakukan dengan menggunakan metoda maserasi karena pengerjaannya lebih mudah tidak memerlukan perlakuan khusus daan tidak menggunakan panas, sehingga dapat mencegah terjadinya kerusakan zat termolabil akibat suhu tinggi. Pelarut yang digunakan adalah etanol karena sifatnya sebagai pelarut universal yang mampu melarutkan hampir semua senyawa, baik yang berifat polar, semi polar, maupun non polar. Etanol memiliki

kemampuan untuk mengendapkan protein dan menghambat kerja enzim sehingga zat aktif terhindar dari proses hidrolisis dan oksidasi (Harbone, 1987). Etanol yang digunakan adalah etanol 70% karena sampel yang digunakan adalah sampel kering. Ekstrak etanol yang didapatkan dipekatkan dengan menggunakan alat rotary evaporator sehingga didapatkan ekstrak kental. Kemudian dilakukan pemeriksaan organoleptis dengan bentuk masa kental, berwarna hijau kehitaman, memiliki bau khas aromatik dan rasa yang pahit (Lampiran 3, tabel V).

Hasil pemeriksaan pendahuluan dari kandungan kimia menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) positif mengandung alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, dan terpenoid. Hasil pengujian susut pengeringan ekstrak daun sirsak sebesar 15,98%, dimana tujuan dari susut pengeringan adalah untuk mengetahui persentase senyawa yang hilang selama proses pemanasan, tidak hanya air tapi juga senyawa menguap lainnya (Depkes RI, 1985) (Lampiran 3, Tabel VI). Sementara untuk hasil pengujian kadar abu diperoleh sebesar 2,75%, dimana tujuan dilakukan kadar abu adalah untuk mengetahui dan memberikan gambaran kandungan mineral yang berasal dari proses awal sampel sampai akhir terbentuknya ekstrak, dimana senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap sehingga tinggal unsur mineral dan senyawa anorganik saja (Depkes RI, 1985) (Lampiran 3, Tabel VII).

Hewan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit putih jantan. Pemilihan mencit sebagai hewan percobaan karena mencit lebih mudah ditangani, mudah didapat dan harganya relatif murah. Pemberian sediaan ekstrak kepada hewan percobaan dilakukan secara oral, cara ini disesuaikan dengan

pemakaian sehari-hari oleh masyarakat. Sebelum dilakukan pengujian, hewan percobaan di aklimatisasi selama 7 hari untuk mengadaptasikan hewan percobaan dengan lingkungan percobaan. Hewan percobaan yang dipilih adalah hewan yang sehat dan selama aklimatisasi berat badan tidak mengalami perubahan 10% dari berat awal. Sebelum diperlakukan, mencit dikelompokkan menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit putih jantan

Penginduksi yang digunakan dalam meningkatkan tekanan darah hewan percobaan adalah larutan NaCl 3%, dimana pemberian garam dengan konsentrasi tersebut merupakan modifikasi konsentrasi dari Siska dkk, 2010 yang dapat meningkatkan tekanan darah pada hewan percobaan. Dimana asupan garam yang berlebihan dapat merangsang pembentukan renin yang akhirnya menimbulkan vasokonstriksi dan meningkatkan volume darah sehingga memicu terjadinya hipertensi (Dharma, 2016). Dalam keadaan hipertensi dapat meningkatkan produksi anion superoksida. Anion superoksida dapat merusak dan menghancurkan NO, sehingga kadar NO menurun (Versari *et al*, 2009)

Untuk mengoptimalkan terjadinya disfungsi sel endotel pada mencit diberikan induksi NaCl 3% dilakukan selama 3 minggu. Ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) diberikan 3 variasi dosis, yaitu 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB. Tujuan pemberian dengan beberapa varian adalah untuk melihat dosis mana yang lebih efektif dalam meningkatkan kadar NO pada mencit. Masing-masing kelompok hewan percobaan diperlakukan dengan cara, pada hewan kelompok negatif diberikan suspensi Na.CMC 0,5%. Hewan kelompok positif diberikan larutan NaCl 3%. Hewan kelompok III, IV, dan V

dilakukan pemberian suspensi ekstrak daun sirsak dengan selang waktu satu jam setelah pemberian NaCl 3%. Hal ini bertujuan untuk menghindari terjadinya interaksi yang tidak diharapkan saat perlakuan. Adanya efek proteksi diamati dengan mengukur kadar NO pada serum semua mencit dari keseluruhan kelompok perlakuan sehingga dapat dilihat kemampuan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) memproteksi sel endotel yang telah dirusak oleh larutan NaCl 3%. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak dapat meningkatkan kadar NO.

Pemeriksaan kadar NO dilakukan setelah penginduksian selama 3 minggu dengan cara mengambil serum darah mencit. Kadar NO ditentukan dengan menggunakan *Kit Assay Total Nitrit Oxide* dan alat ELISA spektrofotometri *Bio-Rad*. Pengujian dengan metode ELISA ini menggunakan reagen Griess yang terdiri dari Griess I dan Griess II. NO merupakan gas yang tidak stabil dengan waktu paruh yang pendek sehingga sulit untuk diukur secara langsung. Meskipun begitu, dua produk stabil dari NO yaitu nitrat ( $\text{NO}_3$ ) dan nitrit ( $\text{NO}_2$ ) dapat diukur dengan fotometri menggunakan percobaan GRIESS berdasarkan reaksi diazotasi. NO dengan adanya  $\text{O}_2$  akan diubah menjadi nitrit, nitrit akan diekskresikan dalam bentuk nitrat melalui urin ataupun darah, dengan penambahan enzim nitrat reduktase diubah kembali menjadi nitrit. Griess I mengandung asam sulfanilat yang jika direaksikan dengan nitrit akan menghasilkan garam diazonium. Griess II mengandung *1-Naphtyl etilendiamin dihidroklorida* yang akan membentuk reaksi azo dan ditandai dengan terbentuknya warna merah muda (pink) pada panjang gelombang 540 nm. pengukuran NO menggunakan plat mikrotiter yang berisi larutan standar, larutan

sampel, dan larutan blanko. Larutan standar terdiri dari beberapa konsentrasi berbeda yang digunakan untuk menentukan kadar standar pada pengukuran. Pada larutan standar terlihat bahwa semakin pekat warna merah muda (pink) yang dihasilkan dari reaksi, semakin tinggi pula kadar NO yang terkandung didalam sampel uji.

Hasil penelitian disfungsi sel endotel dengan penginduksian larutan NaCl 3% dapat ditandai dengan terjadinya penurunan kadar NO yang ditunjukkan oleh rendahnya kadar NO pada kelompok kontrol positif (1,150 nmol/ $\mu$ l) jika dibandingkan dengan kadar NO kelompok kontrol negatif (2,056 nmol/ $\mu$ l). Penentuan adanya aktivitas proteksi dari ekstrak daun sirsak terhadap disfungsi sel endotel ditandai dengan meningkatnya kadar NO dapat dibandingkan dengan kadar NO kelompok kontrol positif. Dari data penelitian nilai rata-rata kadar NO kontrol negatif 2,056 nmol/ $\mu$ l dan kontrol positif 1,150 nmol/ $\mu$ l terlihat bahwa kadar NO kontrol negatif lebih tinggi dibandingkan kontrol positif. Berdasarkan analisis data secara statistik didapatkan nilai signifikansi  $P < 0,05$  (Lampiran 4, tabel IX). Hal ini menunjukkan bahwa kontrol positif mengalami kerusakan sel endotel karena penginduksian oleh larutan NaCl ditandai dengan turunnya kadar NO yang berbeda nyata.

Berdasarkan hasil data analisa varian (ANOVA) yang membandingkan nilai rata-rata kadar NO dari kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif, kelompok dosis 50 mg/kgBB, kelompok 100 mg/kgBB, dan kelompok dosis 200 mg/kgBB didapat nilai signifikansi  $P < 0,05$  (Lampiran 4, tabel XI). Hal ini menunjukkan bahwa adanya perbedaan yang nyata antara kadar NO kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan (kelompok kontrol

negatif, kelompok dosis 50 mg/kgBB, kelompok dosis 100 mg/kgBB, dan kelompok dosis 200 mg/kgBB).

Berdasarkan analisa data uji lanjut Duncan, nilai rata-rata kadar NO kelompok kontrol positif berbeda nyata dengan kelompok perlakuan lainnya dengan signifikansi  $P < 0,05$ . Nilai rata-rata kadar NO kelompok kontrol negatif (2,056 nmol/ $\mu$ l) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (1,150 nmol/ $\mu$ l) mengalami kenaikan kadar NO dan berbeda nyata dengan nilai signifikansi  $P < 0,05$  (Lampiran 4, tabel XII).

Nilai rata-rata kadar NO kelompok dosis 50 mg/kgBB (1,836 nmol/ $\mu$ l) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (1,150 nmol/ $\mu$ l) terjadi peningkatan nilai rata-rata kadar NO dan berbeda nyata dengan signifikansi  $P < 0,05$ , dan mendekati nilai rata-rata kadar NO kelompok kontrol negatif (2,056 nmol/ $\mu$ l) namun tidak berbeda nyata  $P > 0,05$ . Apabila dibandingkan dengan kelompok dosis 100 mg/kgBB (2,122 nmol/ $\mu$ l) dan kelompok dosis 200 mg/kgBB (1,625 nmol/ $\mu$ l) tidak berbeda secara nyata  $P > 0,05$  (Lampiran 4, tabel XII).

Nilai rata-rata kadar NO kelompok dosis 100 mg/kgBB (2,122 nmol/ $\mu$ l) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (1,150 nmol/ $\mu$ l) terjadi peningkatan nilai rata-rata kadar NO dan berbeda nyata dengan signifikansi  $P < 0,05$ , serta meningkat dari kelompok kontrol negatif (2,056 nmol/ $\mu$ l), kelompok dosis 50 mg/kgBB (1,625 nmol/ $\mu$ l) namun tidak berbeda nyata dengan signifikansi  $P > 0,05$ , dan meningkat dari kelompok dosis 200 mg/kgBB (1,625 nmol/ $\mu$ l) serta berbeda secara nyata  $P < 0,05$  (Lampiran 4, tabel XII).

Nilai rata-rata kadar NO kelompok dosis 200 mg/kgBB (1,625 nmol/ $\mu$ l) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (1,150 nmol/ $\mu$ l) terjadi peningkatan nilai rata-rata kadar NO dan berbeda nyata dengan signifikansi  $P < 0,05$ , dan memiliki nilai rata-rata kadar NO terendah bila dibandingkan dengan nilai rata-rata kadar NO kelompok kontrol negatif ( 2,056 nmol/ $\mu$ l), kelompok dosis 50 mg/kgBB (1,836 nmol/ $\mu$ l) tetapi tidak berbeda nyata  $P > 0,05$ , namun berbeda nyata dengan kelompok dosis 100 mg/kgBB (2,122 nmol/ $\mu$ l) (Lampiran 4, tabel XII). Keadaan ini diduga diakibatkan oleh kelebihan jumlah antioksidan sehingga terjadi ketidakseimbangan antioksidan yang dikenal dengan keadaan pro-oksidan, hal ini menunjukkan bahwa antioksidan yang berlebih akan tidak memiliki pasangan sehingga berbalik menjadi radikal bebas dan menyebabkan penurunan kadar NO (Afviyeni, 2017).

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa variasi pemberian dosis ekstrak daun sirsak dosis 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB mengalami peningkatan nilai rata-rata kadar NO serum dibandingkan kelompok kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa ketiga variasi dosis sudah dapat memproteksi sel endotel dan meningkatkan konsentrasi NO dalam darah. Dosis daun sirsak 100 mg/kgBB pilih sebagai dosis yang paling efektif diantara variasi dosis lainnya, karena memiliki nilai rata-rata kadar NO yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif , dosis daun sirsak 50 mg/kgBB dan dosis daun sirsak 200 mg/kgBB, dimana penggunaan dosis yang terlalu tinggi menunjukkan penurunan kadar rata-rata NO (Lampiran 4, tabel XII).

Penelitian ini juga dilakukan pengamatan rasio berat organ hati, ginjal, dan jantung. Penentuan rasio berat organ dapat berguna untuk melihat apakah

pemberian ekstrak daun sirsak selama 3 minggu akan memberikan efek terhadap organ hati, ginjal, dan jantung. Hasil analisa statistik terhadap rasio berat organ hati, ginjal, dan jantung tidak mengalami perbedaan karena memiliki nilai  $P > 0,05$  (Lampiran 9 – 11). Nilai rata-rata rasio organ hati, ginjal, dan jantung kelompok dosis ekstrak daun sirsak 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif secara analisa statistik tidak mengalami perbedaan dan berada pada subset yang sama. Hal ini menunjukkan pemberian ekstrak daun sirsak selama 3 minggu tidak mempengaruhi organ hati, ginjal, dan jantung.

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat dijelaskan bahwa pemberian ekstrak daun sirsak dapat meningkatkan kadar NO pada mencit putih jantan yang diinduksi dengan larutan NaCl 3%. Ekstrak daun sirsak dosis 100 mg/kgBB memberikan hasil yang paling baik dibandingkan dengan dosis 50 mg/kgBB, dan dosis 200 mg/kgBB dalam meningkatkan kadar NO serum mencit putih jantan. Adanya kandungan senyawa bioaktif seperti golongan tannin, fitosterol, flavonoid, saponin, dan alkaloid (Baskar R *et al.*, 2007), mampu memproteksi sel endotel dari kerusakan yang diinduksi dengan larutan NaCl. Peran antioksidan terhadap sel endotel yaitu menghambat oksidasi, mengurangi inaktivasi NO, menurunkan adhesi monosit terhadap endotel dan merangsang aktivasi enzim endothelial NO (eNO) (Lawrence, 2004). Pemberian ekstrak daun sirsak dalam jangka waktu lama tidak mempengaruhi organ hati, ginjal, dan jantung jika dilihat dari perbandingan rasio berat organnya.

## BAB V

### KASIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian pengaruh ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap kadar *nitrit oxide* (NO) pada mencit putih jantan yang diinduksi dengan larutan NaCl 3%, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) dapat memproteksi sel endotel dari kerusakan yang diinduksi dengan larutan NaCl 3%.
2. Variasi pemberian dosis ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) dapat mempengaruhi efek proteksi sel endotel dari kerusakan yang diinduksikan dengan larutan NaCl 3%. Pada dosis 100 mg/kgBB menunjukkan hasil yang baik dibandingkan dengan pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) dosis 50 mg/kgBB dan 200 mg/kgBB dengan ditandai tingginya kadar NO.

#### 5.2 Saran

Adanya pengaruh ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap sel endotel, maka diharapkan penelitian ini dilanjutkan dengan melihat adanya perbaikan hispatologi pembuluh darah.

## DAFTAR PUSTAKA

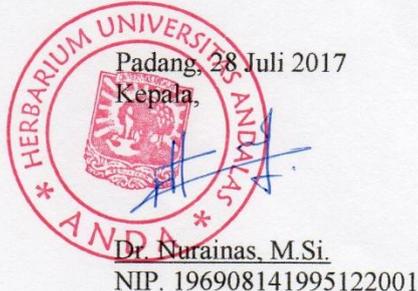
- Afviyeni, Riri., 2017, Pengaruh Ekstrak Bawang Putih (*Allium Sativum* L.) Terhadap Kadar *Nitrit Oxide* (NO) Serum Mencit Hiperkoleterol, Skripsi, STIFI, Padang.
- Badan POM RI., 2010, *Monografi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia (Revisi Volume I)*, Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia, Jakarta.
- Baskar R, Rajeswari V, Kumar TS., *Invitro antioxidant studies in leave of annona species*, Indian J Exp Biol, 2007 May; 45 (5) 480-5.
- Burmester, G-R., Pezzuto, A., 2003, *Color Atlas of Immunology*, Thieme, Stuttgart, New York.
- Cooke, JP, 1997, Therapeutics Interventions in Endothelial Dysfunction, Endothelium as Target Organ, *Jurnal Clin Cardiol*, Vol. 2, No.2, Hal. 45-51.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1979. *Farmakope Indonesia* Ed III, Jakarta , Departemen Kesehatan RI.
- Departemen Kesehatan Republik indonesia, 1985, *Cara Pembuatan Simplisia*. Jakarta , Departemen Kesehatan republik Indonesia.
- Dharma, S., 2016, Patofisiologi Farmakologi Famakoterapi, Gre Publishing, Yogyakarta.
- Donatus, I.A., 1983, *Peranan Farmakologi Dalam Pengembangan Obat Tradisional*, Fakultas Farmasi Gajah Mada, Yogyakarta.
- Eka Hasnawati., 2013, *Keajaiban Sirsak Menumpas 7 Penyakit*, Yogyakarta : Easymedia.
- Erlinger Thomas P, 2004, WBC Count and the Risk of Cancer Mortality in a National Sample of U.S., Adults: Results from the Second National Health and Nutrition Examination Survey Mortality Study, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 13 : 1052.
- Fujiwara, N., Osanai, T., Kamada, T., Katoh, T., Takahashi, K., & Okumura, K. (2000). Study on the Relationship Between Plasma Nitrite Andnitrate Level and Salt Sensitivity in Human Hypertensionmodulation of Nitric Oxide Synthesis by Salt intake. *J. Circ.* 101,(8), 856-861.
- Ganong, William, F., 2002, *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran (Ed.20)*, H.M Djauhari Widjajakusumah, Buku Kedokteran EGC: Jakarta.

- Gajalakshmi, S., Vijayalakshmi, S., dan Devi Rajeswari V., 2011, Phytochemical and Pharmacological Properties of *Annona Muricata* : A Review, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(2) :5.
- Ghasemi, A., Hedayati, M., Biabani, H., 2007, Protein Precipitation Methods Evaluated for Determination of Serum Nitric Oxide End Products by the Griess Assay, *Journal of Medical Science Research*, Vol. 15, Hal. 29-32.
- Gitawati. (1995). Radikal Bebas, Antioksidan dan Proses Menua. *Kedokteran Dan Farmasi*, 6, 366–369.
- Granger, J. P. (2006). An Emerging Role for Inflammatory Cytokines in Hypertension. *Am J. Physiol Heart Circ Physiol*, 290, 923–924.
- Guyton, A. C., Hall, J. E., 1997, *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*, (Ed. 9), I, Setiawan, Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Harborne J, B., 1987, *Metode Fitokimia*, Edisi II, Terjemahan Padmawinata dan L.Sudiro, ITB, Bandung.
- Heyne, K., 1987, *Tumbuhan Berguna Indonesia*, jilid III, Diterjemahkan Oleh Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan, Yayasan Sarana Wahajya, Jakarta, pp 1385-1386.
- Holdsworth D. K., 1990,: —Traditional Medicinal Plants of Rarotonga, Cook Islands. Part I. *Int. J. Crude Drug Res.* 28(3), 209-218.
- Higashi, Y., Oshima, T., Watanabe, M., Matsuura, H., & Kajiyama, G. (1996). Renal Response to L-arginine in Salt-Sensitive Patients with Essential Hypertension. *Hypertension*, 27, 643-648.
- Ideasanti, 1995, Telaah senyawa fenolik Daun Sirsak, *Annona muricata* L., Skripsi, Dept. Farmasi ITB, Bandung
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E and Chaudhuri, G., 1987, Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide, *Proceeding National Academic Sciences*, 84, 9265-69.
- JNC VII, 2003, The seventh report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure, *Hypertension*, 42; 1206-52.
- Kumar, V., Cotran, R. S., Robin, S. I., 2007, *Buku Ajar Patologi (Ed. 7)*, Penerjemah, Brahm, U. Pendit, Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Lawrence GS. 2004. Implikasi Klinis Disfungsi Endotel dan Radikal Bebas. Makassar: Unit Riset Vaskular, bagian Patologi, FK Unhas, RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo.

- Lee, Y.B., Bae, H.E., Ma, K. S., & Kim, W.S. (2016). Altered Nitric Oxide System in Cardiovascular and Renal Diseases. *Chonnam Med J*, 52, 81-90
- Mac Allister, R. J., Ficklinf, S A., Kimoto, M., Ogawa, T., Ressel, R. J., Hodson, H., Whitley, G. S. J. and Vallence, P., 1996, Regulation of nitric synthesis by dimethylarginine dimethylamino-hydrolase, *British Journal of Pharmacology*. 119, 1-8.
- Mapahya, Ali Aspar and Ilyas, Muh., 2006, *Kadar Nitric Oxide (NO) dan Sensitivity C. Reactive Protein (hs-CRP) pada Penderita Sindroma Koroner Akut di Makassar*, Bagian Kardiologi FK UNHAS, Makassar.
- Nafrialdi., 2009, *Antihipertensi dalam Farmakologi dan terapi, edisi 5*, Penerbit Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, Hal 341-360.
- Nwokocha CR, Owu DU, Gordon A, Thaxter K, McCalla G, Ozolua RI, Young L. (2012). Possible mechanisms of action of the hypotensive effect of *Annona muricata* (soursop) in normotensive Sprague-Dawley rats. *Pharmaceutical Biology*. 50(11): 1436- 1441.
- Panza, J. A, Casino, P. R, Badar, D. M, and Quyyumi, A. A., 1993, Effect of Increased Availability of Endothelium-Derived Nitric Oxide Precursor on Endothelium-Dependent Vascular Relaxation in Normal Subjects and in Patients with Essential Hypertension, *Circulation*, 87 (5): 1475-1481.
- Ramelan, W., 2003, Antioksidan dan Peranannya dalam dalam Kedokteran, *Jurnal Kedokteran dan Farmasi*, Vol. 6, Hal, 370-371.
- Sargowo, Djanggan., 2015, *Disfungsi Endotel*. Universitas Brawijaya Press (UB Press), Malang.
- Saseen, Joseph J. dan Carter, Barry L., 2005, *Hypertension. Dalam Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach, Sixth Edition*, United States: McGraw-Hill, 555-558.
- Setiati, S., 2003, Radikal Bebas, Antioksidan dan Proses Menua, *Jurnal Kedokteran dan Farmasi*, Vol. 6, Hal.366-369.
- Silalahi, J., 2005, Gas Nitrogen Oksida Polutan atau Vital Bagi Kehidupan Kita, *Jurnal Cermin Dunia Kedokteran*, Vol. 147, Hal. 26-30.
- Weiss R, Caprio S. The metabolic consequences of childhood obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19(3): 405-19.
- Siska., Nursai, F K., 2010, Pemanfaatan Akar Seledri (*Apium Graveolens*.Linn) Sebagai Antihipertensi, *Farmasains*, Vol 1 No. 1-6.
- Supardi, S., Jamal, S., & Raharni, R., 2005. Pola Penggunaan Obat, Obat Tradisional dan Cara Tradisional dalam Pengobatan Sendiri di Indonesia. *Buletin Penelitian Kesehatan*, 33(4), 192-198.

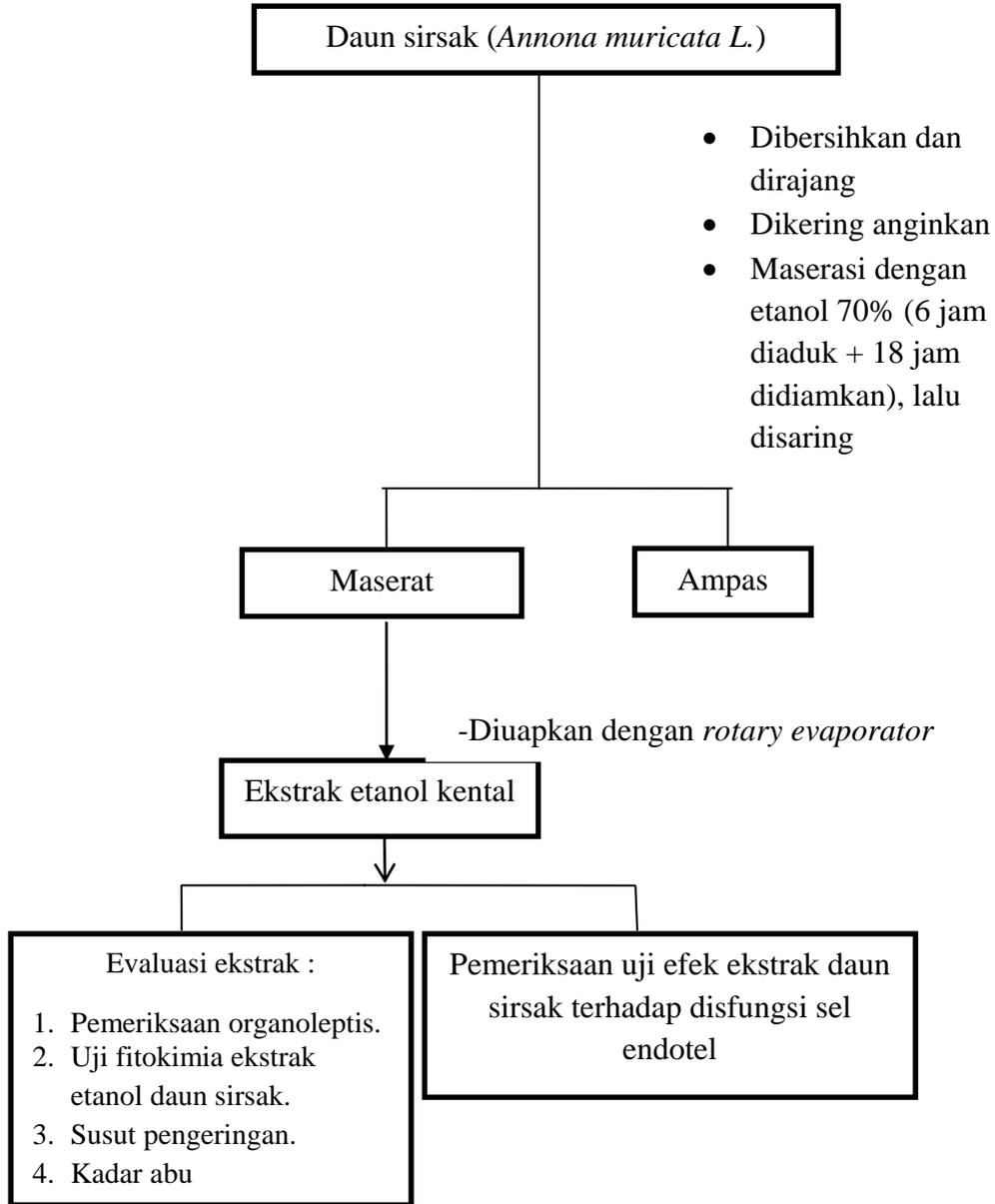
- Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Salvetti A., 1998, The Role of Endothelium in Human Hypertension, *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 7:203-209.
- Thomas, L., 1998, Clinical laboratory diagnostic, *the Basic Verlagsesell Schaft*, Vol. 37 (7).
- Versari, D., Daghini, E., Viridis, A., Ghiadoni, L., Taddei, S., 2009, Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. *British journal of Pharmacology*. 157: 527-536.
- Wicaksono, A., 2011, *Kalahkan kanker dengann Sirsak*, Citra Media Mandiri, Jakarta.
- Winarsih, H., 2007, *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*, Kanisius, Yogyakarta.
- World Health Organization (WHO), 2002. WHO Drug Information, Vol. 16 (3): 237.
- Xi H, M Akishita, K Nagai, W Yu, H Hasegawa, M Eto, 2007, Potent free radical scavenger, edaravone, suppresses oxidative stress-induced endothelial damage Pand early atherosclerosis, *Atherosclerosis*, 191: 281-289.

## Lampiran 1. Surat Identifikasi Daun Sirsak (*Annona Muricata* L.)

	<b>HERBARIUM UNIVERSITAS ANDALAS (ANDA)</b> Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas Kampus Limau Manih Padang Sumbar Indonesia 25163 Telp. +62-751-777427 ext. *811 e-mail: herbariumandaunand@gmail.com; nas_herb@yahoo.com						
<hr/>							
Nomor	: 281/K-ID/ANDA/VII/2017						
Lampiran	: -						
Perihal	: Hasil Identifikasi						
Kepada Yth, Kurnia Hidayat di Padang							
Dengan hormat, Sehubungan dengan surat mengenai bantuan untuk "Identifikasi Tumbuhan" di Herbarium Universitas Andalas Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas, kami telah membantu mengidentifikasi tumbuhan yang dibawa, atas nama:							
Nama	: Kurnia Hidayat						
NIM	: 13 04 034						
Instansi	: STIFI YP-Padang						
Berikut ini diberikan hasil identifikasi yang dikeluarkan dari Herbarium Universitas Andalas.							
<table border="1"><thead><tr><th>No</th><th>Famili</th><th>Spesies</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Annonaceae</td><td><i>Annona muricata</i> L.</td></tr></tbody></table>		No	Famili	Spesies	1	Annonaceae	<i>Annona muricata</i> L.
No	Famili	Spesies					
1	Annonaceae	<i>Annona muricata</i> L.					
Demikian surat ini dibuat untuk dapat digunakan seperlunya.							
							

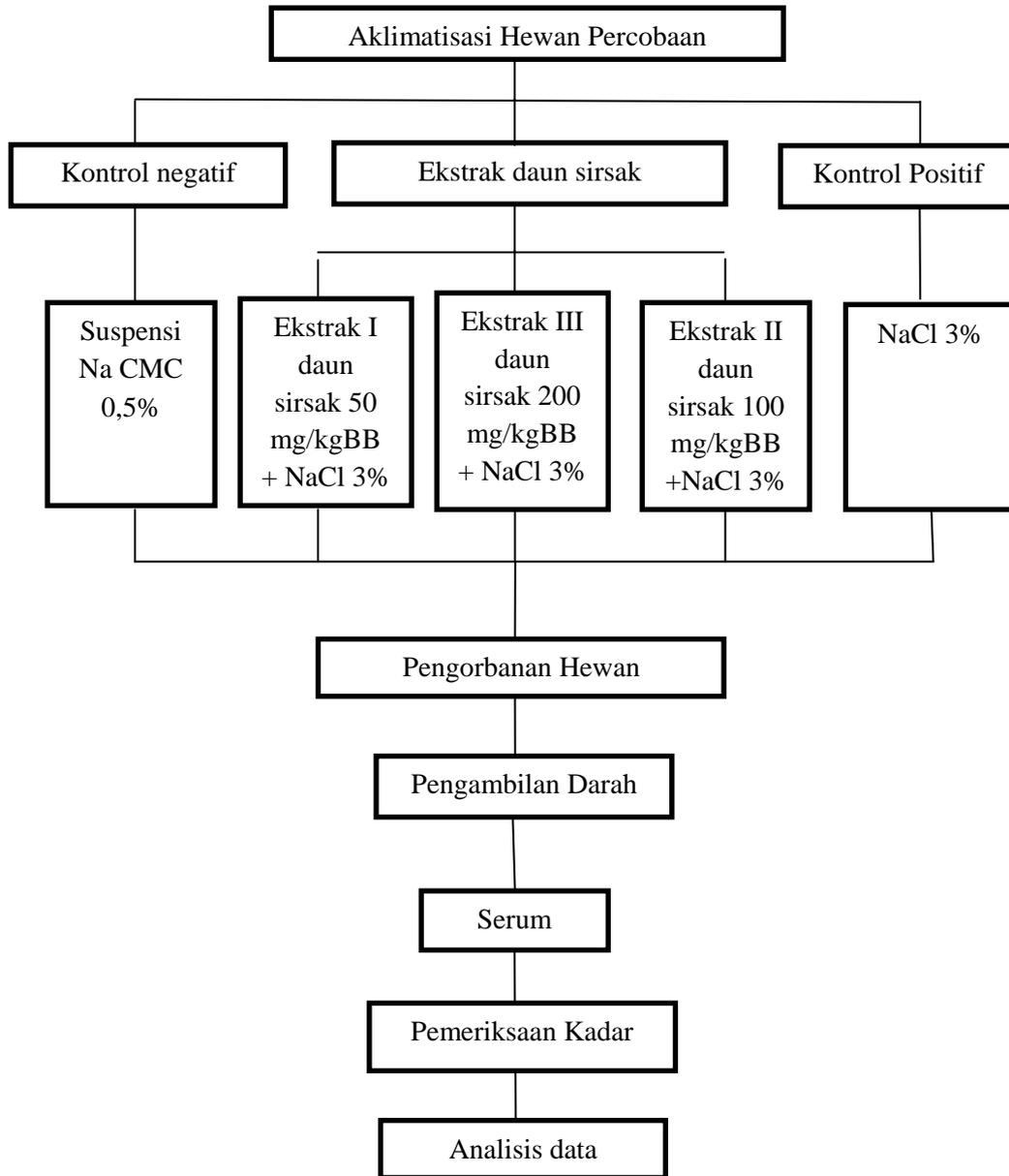
Gambar 5. Surat Identifikasi Daun Sirsak (*Annona Muricata* L.)

## Lampiran 2. SkemaKerja



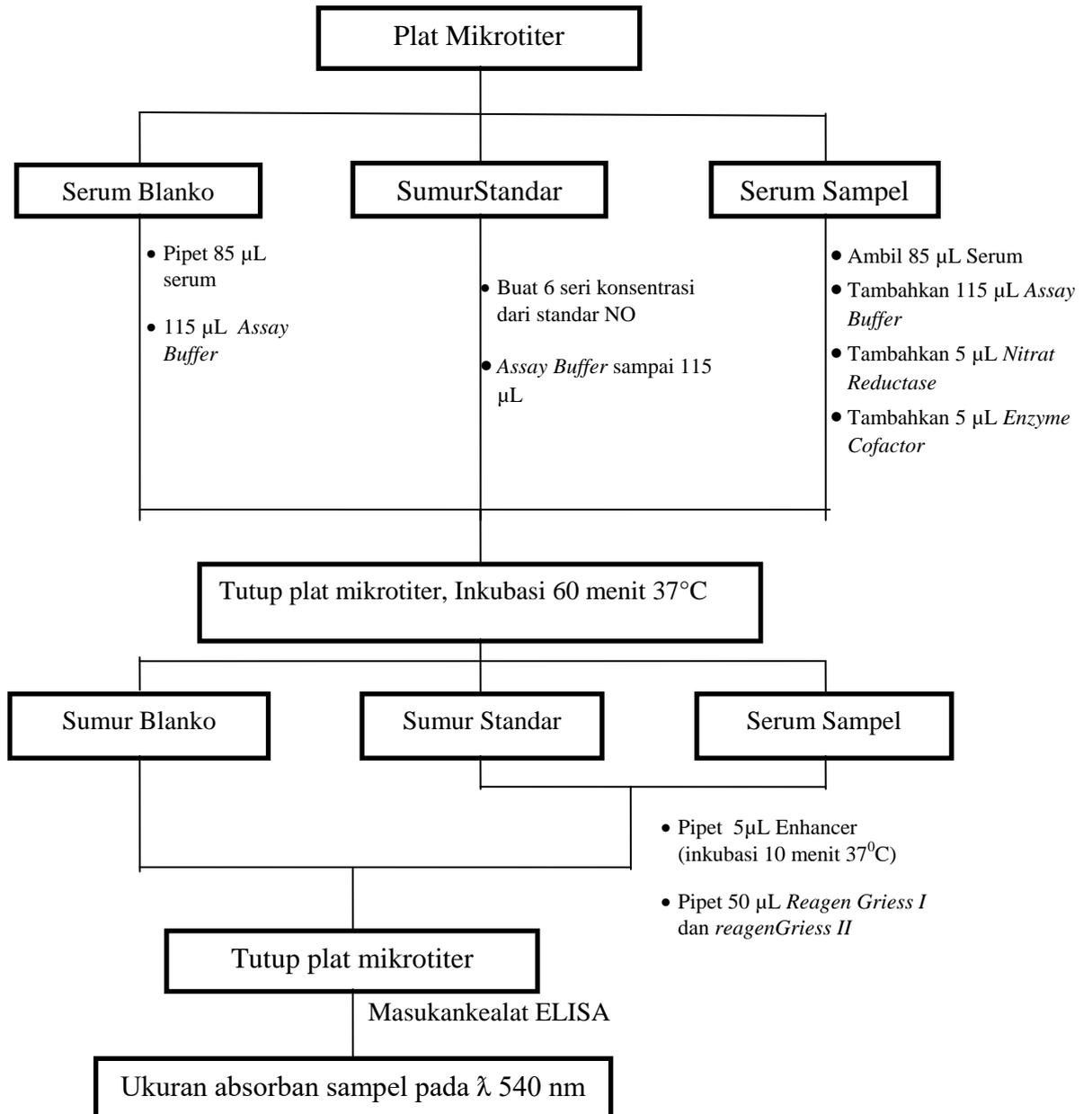
Gambar 6. Skema Kerja Ekstraksi Dan Evaluasi Ekstrak Etanol daun sirsak (*Annona muricata L.*).

Lampiran 2. (Lanjutan)



Gambar 7. Skema Kerja Perlakuan Terhadap Hewan Percobaan

Lampiran 2. (Lanjutan)



Gambar 8. Skema Kerja Pengukuran NO ( Oksida Nitrogen)

**Lampiran 3. Hasil Karakterisasi Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.)**

Tabel IV. Penentuan Randemen Ekstrak Daun Sirsak Kering

<b>Berat daun sirsak setelah dikeringanginkan</b>	<b>Berat ekstrak kental</b>	<b>Randemen</b>
618 gram	31,38 gram	5,08%

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Randemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat daun sirsak setelah dikeringanginkan}} \times 100\% \\
 &= \frac{31,38 \text{ gram}}{618 \text{ gram}} \times 100\% \\
 &= 5,08\%
 \end{aligned}$$

Tabel V. Hasil Pemeriksaan Organoleptis Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.)

<b>No</b>	<b>Pemeriksaan</b>	<b>Pengamatan</b>
1.	Bentuk	Ekstrak kental
2.	Warna	Hijau kehitaman
3.	Bau	Khas aromatik
4.	Rasa	Pahit

Tabel VI. Hasil Pemeriksaan Susut Pengeringan Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.)

<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>Randemen (%)</b>
43,620 gram	44,6288 gram	44,4667 gram	15,98%

Keterangan :     A = Berat krus porselen kosong  
                           B = Berat krus porselen + Sampel sebelum dipanaskan  
                           C = Berat krus porselen + Sampel setelah dipanaskan

### Lampiran 3. (Lanjutan)

Perhitungan susut pengeringan ekstrak :

$$\begin{aligned}\% \text{ Susut pengeringan} &= \frac{(B-A)-(C-A)}{(B-A)} \times 100\% \\ &= \frac{(44,6288 \text{ g}-43,620)-(44,4667 \text{ g}-43,620 \text{ g})}{(44,6288 \text{ g}-43,620 \text{ g})} \times 100\% \\ &= \frac{1,0079 \text{ g}-0,8467 \text{ g}}{1,0079 \text{ g}} \times 100\% \\ &= \frac{0,1612 \text{ g}}{1,0079 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 15,98\%\end{aligned}$$

Tabel VII. Hasil Pemeriksaan Kadar Abu Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.)

A	B	C	Randemen (%)
36,9041 gram	37,9351 gram	36,9324 gram	2,75%

Keterangan :  
A = Berat krus porselen kosong  
B = Berat krus porselen + Sampel sebelum dipanaskan  
C = Berat krus porselen + Sampel setelah dipanaskan

Perhitungan kadar abu ekstrak :

$$\begin{aligned}\% \text{ Kadar abu} &= \frac{(C-A)}{(B-A)} \times 100\% \\ &= \frac{36,9324 \text{ g}-36,9041 \text{ g}}{37,9351 \text{ g}-36,9041 \text{ g}} \times 100\% \\ &= \frac{0,0283 \text{ g}}{1,031 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 2,75\%\end{aligned}$$

### Lampiran 3. (Lanjutan)

Tabel VIII. Hasil Pemeriksaan Uji Fitokimia Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.)

No	Kandungan kimia	Pereaksi	Pengamatan	keterangan
1.	Flavonoid	Mg+HCl	Terbentuk larutan warna merah	+
2.	Fenolik	FeCl <sub>3</sub>	Terbentuk larutan warna biru	+
3.	Saponin	Air	Terbentuk busa ±15 menit	+
4. n	Terpenoid	Asam asetat anhidrat + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Terbentuk larutan warna merah	+
5.	Steroid	Asam asetat anhidrat + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Terbentuk larutan warna biru ungu	-
6.	Alkaloid	Mayer	Adanya kabut/gumpalan putih pada reaksi	+

#### Lampiran 4. Hasil Pengukuran Kadar NO Serum

Tabel IX : Kadar NO Serum

Mencit	Kadar NO (nmol/ $\mu$ L)				
	KN	KP	D1	D2	D3
1	2,159	1,150	1,997	2,225	1,800
2	2,394	1,218	1,748	2,350	1,734
3	1,661	1,082	1,763	1,792	2,372
<b>Rata-Rata</b>	2,056 <sup>b</sup>	1,150 <sup>a</sup>	1,836 <sup>b,c</sup>	2,122 <sup>c</sup>	1,625 <sup>b</sup>
<b><math>\pm</math>SD</b>	0,205	0,068	0,139	0,292	0,248

Keterangan :

KN : Kontrol Negatif

KP : Kontrol Positif

D1 : Ekstrak Etanol Daun Sirsak Dosis 50 mg/kg BB

D2 : Ekstrak Etanol Daun sirsak Dosis 100 mg/kg BB

D3 : Ekstrak Etanol Daun Sirsak Dosis 200 mg/kg BB

SD : StandarDeviasi

a : Subset no. 1

b : Subset no. 2

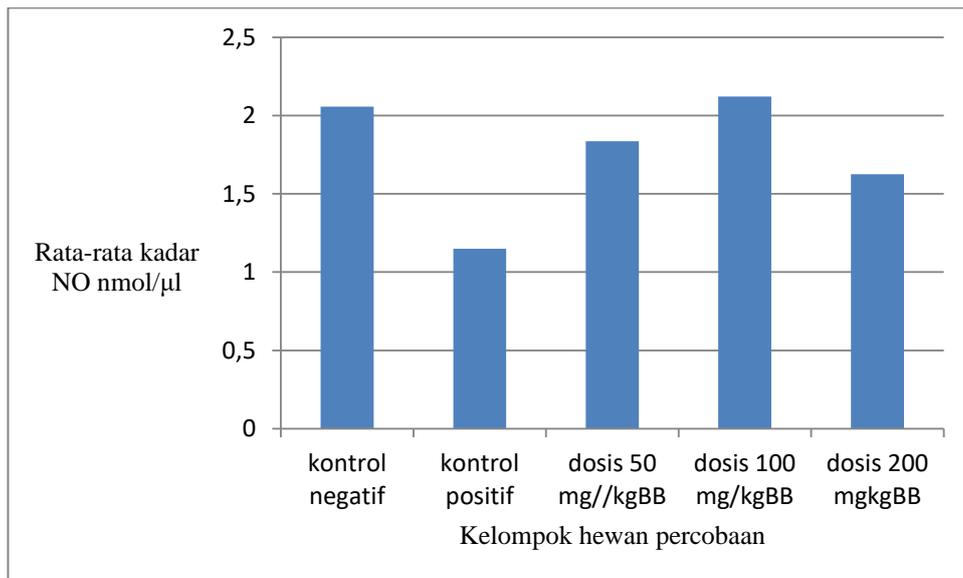
c : Subset no. 3

#### Lampiran 4. (Lanjutan)

Tabel X. Persentase Peningkatan Kadar NO Terhadap Kontrol Positif

Rata-rata Peningkatan Persentase Kadar NO Terhadap Kontrol Positif		
Dosis 50 mg/kgBB	Dosis 100 mg/kgBB	Dosis 200 mg/kgBB
59%	84%	41%

$$\text{Rumus : \% D} = \frac{(\text{kelompok dosis} - \text{kontrol positif})}{\text{kontrol positif}} \times 100\%$$



Gambar 9. Hubungan Antara kelompok hewan percobaan dengan Rata-rata Kadar NO serum.

**Lampiran 4. (Lanjutan)**

Tabel XI. Hasil Analisa Statistik Kadar NO Mencit yang Mencit yang Diinduksi Larutan NaCl 3% (ANOVA satu arah, SPSS16)

ANOVA					
Kadar NO					
	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.846	4	.461	7.749	.004
Within Groups	.595	10	.060		
Total	2.441	14			

Hasil perhitungan ANOVA menunjukkan bahwa nilai F hitung = 7,749 dengan signifikan 0,004 (>0,05), hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak mempengaruhi kadar NO secara bermakna.

Tabel XII. Hasil Perhitungan Kadar NO Mencit yang Diinduksi Larutan NaCl 3% dengan Uji Lanjut Duncan (SPSS 16)

Kadar NO				
Duncan				
Kelompok Hewan Percobaan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
kontrol positif	3	1.15000		
dosis 200 mg/kgBB	3		1.62500	
dosis 50 mg/kgBB	3		1.83600	1.83600
kontrol negatif	3		2.05633	2.05633
dosis 100 mg/kgBB	3			2.12233
Sig.		1.000	.065	.200

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

## Lampiran 5. Pengukuran Rasio Berat Organ Hati

Tabel XIII. Hasil Pengukuran Rasio Organ Hati

Mencit	Rasio Berat Organ Hati				
	KN	KP	D1	D2	D3
1	0,0369	0,0449	0,0431	0,0595	0,0448
2	0,0619	0,0510	0,0425	0,0451	0,0432
3	0,0534	0,0335	0,0584	0,0477	0,0376
Rata-rata	0,0507	0,0431	0,048	0,0507	0,0418
±SD	0,012711	0,00888	0,009011	0,00767	0,008455

Keterangan :

KN : Kontrol Negatif

KP : Kontrol Positif

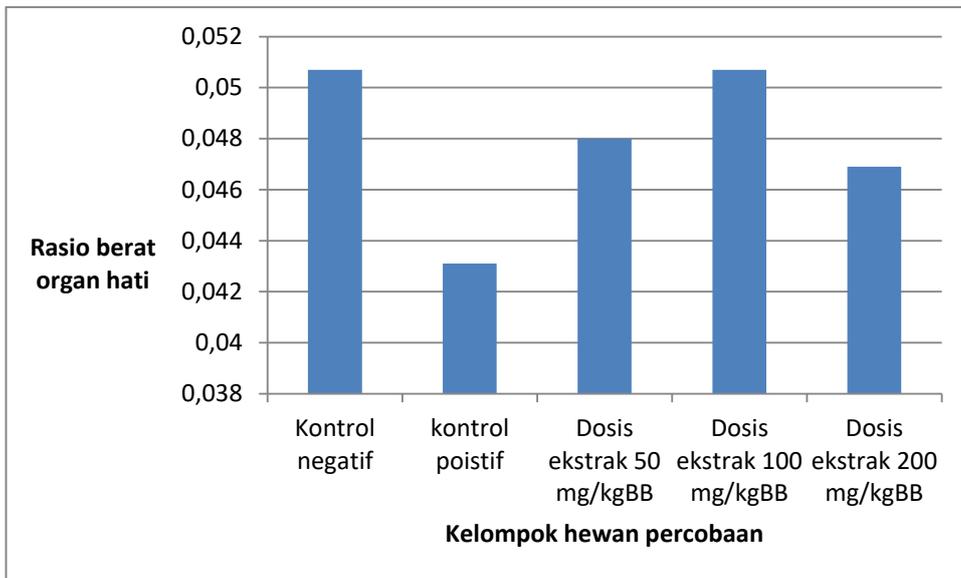
D1 : Dosis Ekstrak Daun Sirsak 50 mg/kgBB

D2 : Dosis Ekstrak Daun Sirsak 100 mg/kgBB

D3 : Dosis Ekstrak Daun Sirsak 200 mg/kgBB

SD : Standar Deviasi

**Lampiran 5. (Lanjutan)**



Gambar 10. Hubungan antara kelompok hewan percobaan dengan rata-rata rasio berat organ hati.

Tabel XIV. Hasil Analisis Statistik Rasio Berat Organ Hati (ANOVA satu arah, SPSS 16)

**ANOVA**

Rasio Berat Organ Hati

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	4	.000	.668	.628
Within Groups	.001	10	.000		
Total	.001	14			

Hasil perhitungan ANOVA menunjukkan bahwa nilai F hitung = 0,668 dengan signifikan 0,628 (>0,05), hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak tidak mempengaruhi rasio berat organ hati secara bermakna.

## Lampiran 6. Pengukuran Rasio Berat Organ Ginjal

Tabel XV. Hasil Pengukuran Rasio Berat Organ Ginjal

Mencit	Rasio Berat Organ Hati				
	KN	KP	D1	D2	D3
1	0,0138	0,0057	0,0091	0,0154	0,0121
2	0,0120	0,0112	0,0145	0,0094	0,0098
3	0,0124	0,0042	0,0113	0,0114	0,0111
Rata-rata	0,0127	0,0070	0,0132	0,0120	0,0110
±SD	0,000945	0,003685	0,0053113	0,0030551	0,0011533

Keterangan :

KN : Kontrol Negatif

KP : Kontrol Positif

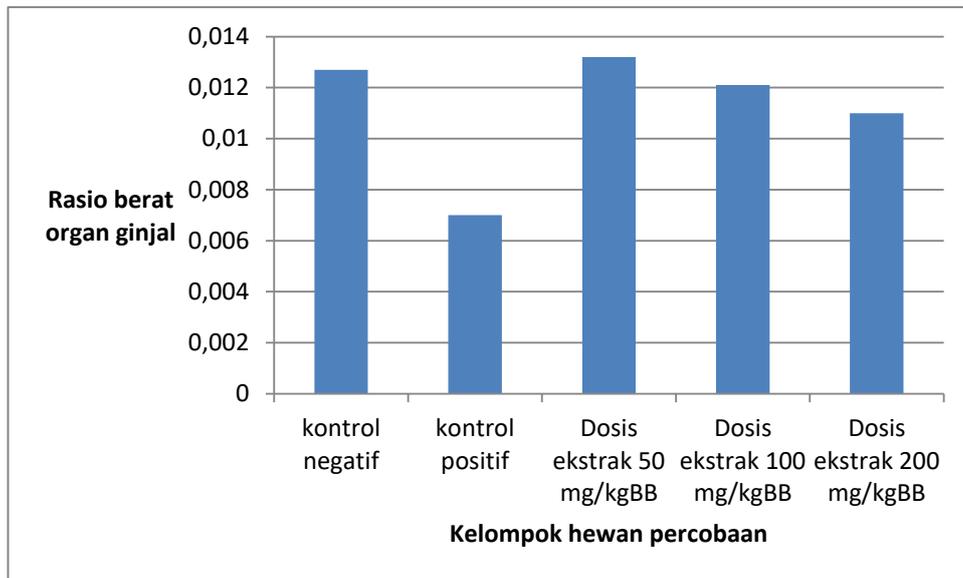
D1 : Dosis Ekstrak Daun Sirsak 50 mg/kgBB

D2 : Dosis Ekstrak Daun Sirsak 100 mg/kgBB

D3 : Dosis Ekstrak Daun Sirsak 200 mg/kgBB

SD : Standar Deviasi

## Lampiran 6. (Lanjutan)



Gambar 11. Hubungan antara kelompok perlakuan dengan rasio berat organ ginjal

Tabel XVI. Hasil Analisa Statistik Rasio Berat Organ Ginjal (ANOVA satu arah, SPSS 16)

### ANOVA

Rasio Berat Organ Ginjal

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	4	.000	1.722	.221
Within Groups	.000	10	.000		
Total	.000	14			

Hasil perhitungan ANOVA menunjukkan bahwa nilai F hitung = 1,1722 dengan signifikan 0,221 ( $>0,05$ ), hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak tidak mempengaruhi rasio berat organ hati secara bermakna.

## Lampiran 7. Pengukuran Rasio Berat Organ Jantung

Tabel XVII. Hasil Pengukuran Rasio Berat Organ Jantung

Mencit	Rasio Berat Organ Hati				
	KN	KP	D1	D2	D3
1	0,0035	0,0048	0,0036	0,0047	0,0044
2	0,0031	0,0043	0,0061	0,0052	0,0056
3	0,0042	0,0052	0,0046	0,0047	0,0042
Rata-rata	0,0036	0,0047	0,0048	0,0048	0,0047
±SD	0,000556	0,000404	0,001258	0,0002887	0,000752

Keterangan :

KN : Kontrol Negatif

KP : Kontrol Positif

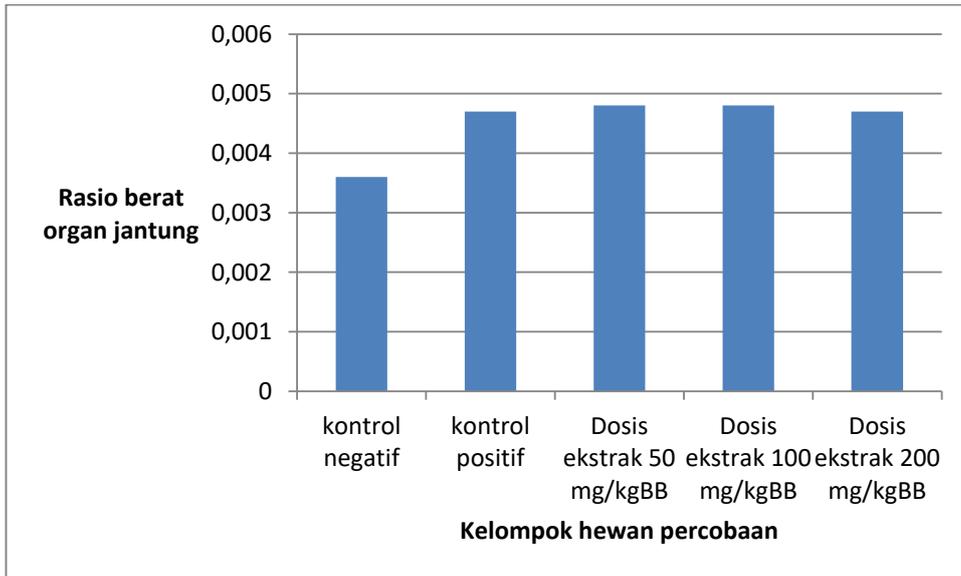
D1 : Dosis Ekstrak Daun Sirsak 50 mg/kgBB

D2 : Dosis Ekstrak Daun Sirsak 100 mg/kgBB

D3 : Dosis Ekstrak Daun Sirsak 200 mg/kgBB

SD : Standar Deviasi

**Lampiran 7. (Lanjutan)**



Gambar 12. Hubungan antara kelompok perlakuan dengan rasio berat organ jantung

Tabel XIII. Hasil Analisis Statistik Rasio Berat Organ Jantung (ANOVA satu arah, SPSS 16)

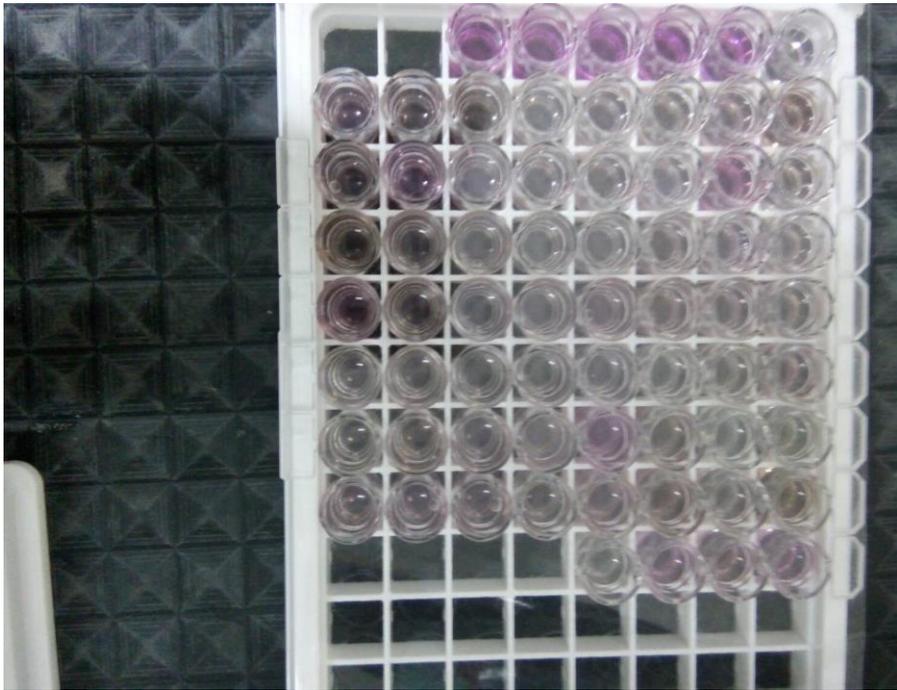
**ANOVA**

Rasio Berat Organ Jantung

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	4	.000	1.543	.263
Within Groups	.000	10	.000		
Total	.000	14			

Hasil perhitungan ANOVA menunjukkan bahwa nilai F hitung = 1,543 dengan signifikan 0,263 ( $>0,05$ ), hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak tidak mempengaruhi rasio berat organ hati secara bermakna.

Lampiran 8. Gambar – gambar Penelitian



Gambar 13. Plat Mikrotiter yang Berisi Serum Dengan Reagen GRIESS



Gambar 14. Alat ELISA Spektrofotometer *Bio-Rad*



Gambar 15. Reagen Nitric Oxide Colorimetric Assay Kit *BioVision*



Gambar 16. Daun Sirsak (*Annona Muricata* L.)

**Lampiran 8. (Lanjutan)**



**Gambar 17. Tanaman Sirsak (*Annona Muricata* L.)**



**Gambar 18. Organ Hati Mencit Putih Jantan**

**Lampiran 8. (Lanjutan)**



**Gambar 19. Organ Ginjal Mencit Putih Jantan**



**Gambar 20. Organ Jantung Mencit Putih Jantan**

