

EFEK ANTI DIABETES ISOLAT *Annonaceous Acetogenin* DARI EKSTRAK DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.) PADA MENCIT JANTAN (*Mus musculus*)

Tahir Ahmad^{*)}

^{*)} Jurusan Farmasi Poltekkes Kemenkes Makassar

ABSTRAK

Annonaceous acetogenin telah lama dibuktikan memiliki efek anti kanker, namun efek anti diabetesnya belum diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis efek anti diabetik senyawa aktif *Annonaceous Acetogenin* yang berasal dari daun sirsak (*Annona muricata*) pada mencit jantan yang diinduksi diabetes dengan aloxan. Penelitian ini bersifat *eksperimental laboratory* dengan desain penelitian *Pretest and Posttest Randomized Controlled Group Design* dengan menggunakan binatang mencit jantan sebagai objek penelitian yang telah dibuat diabetes tipe 1 dengan pemberian aloxan. *Annonaceous acetogenin* diisolasi dari ekstrak daun sirsak dengan proses ekstraksi cair-cair dengan menggunakan beberapa jenis campuran pelarut. Isolat *annonaceous acetogenin* dibuat dalam 3 konsentrasi yaitu 0,5% b/v, 1% b/v dan 2 % b/v. Sebagai kontrol digunakan Na.CMC 1% dan pembanding digunakan Suspensi Metformin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa suspensi Isolat *annonaceous acetogenin* dalam 3 konsentrasi yaitu 0,5% b/v, 1% b/v dan 2 % b/v mampu secara signifikan menurunkan kadar glukosa darah mencit, dimana konsentrasi 1% b/v dan 2% b/v menunjukkan penurunan yang tidak berbeda dengan efek dari metformin, sedangkan pemberian isolat 0,5% b/v penurunannya signifikan lebih besar dari metformin.

Kata Kunci : Isolat *Annonaceous Acetogenin*, Daun Sirsak, Anti Diabetik, Mencit.

PENDAHULUAN

Menurut American Diabetes Association (ADA) tahun 2010, Diabetes Mellitus merupakan suatu kelompok penyakit metabolik dengan karakteristik hiperglikemia yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, kerja insulin, atau keduanya. Hiperglikemia didefinisikan sebagai kadar glukosa puasa yang lebih tinggi dari 110 mg/dL atau kadar glukosa serum puasa normal adalah 70 sampai 110 mg/dL. Penderita Diabetes melitus di seluruh dunia lebih dari 220 juta jiwa. Pada tahun 2005, diperkirakan 1,1 juta jiwa meninggal karena Diabetes melitus. Hampir 80% kematian karena Diabetes melitus terjadi di negara berkembang dan setengahnya terjadi pada usia kurang dari 70 tahun. Indonesia menduduki peringkat ke-4 penderita diabetes terbanyak di dunia dengan prevalensi 8,6% dari total penduduk Indonesia (WHO, 2009)

Pengobatan yang banyak dilakukan yaitu dengan pemberian insulin secara injeksi atau pemberian obat secara oral. Namun kedua cara ini akan banyak memakan biaya yang untuk sebagian besar

masyarakat kita tidak sanggup untuk dipenuhi, sehingga masyarakat mulai beralih kepada pengobatan tradisional.

Pemanfaatan tumbuhan obat sebagai obat tradisional telah lama digunakan oleh masyarakat dan sampai sekarang penggunaannya semakin meningkat. Hal ini dapat dibuktikan dengan adanya berbagai macam produk obat tradisional yang beredar dipasaran, mulai dari bentuk sederhana sampai bentuk modern. Peningkatan penggunaan obat tradisional dalam masyarakat juga dipicu dengan adanya krisis moneter yang melanda negara kita sehingga semua produk manufaktur termasuk obat-obatan harganya semakin tidak terjangkau, terutama oleh kelompok masyarakat ekonomi lemah. Disamping itu dukungan pemerintah juga semakin besar dengan menganjurkan masyarakat agar kembali ke alam dengan memanfaatkan tumbuh-tumbuhan yang berkhasiat obat sebagai pengobatan alternatif dalam menanggulangi kesehatannya. Salah satu tumbuhan yang biasa digunakan sebagai obat yaitu tanaman Sirsak (*Annonamuricata*), yang banyak tumbuh di seluruh daerah di negara ini. Tanaman

Sirsak mempunyai banyak khasiat antara lain dapat digunakan untuk pengobatan anti kanker yang sudah terbukti secara ilmiah. (Istikomah,F.2014)

Sifat antikanker tanaman sirsak diduga karena tanaman tersebut mengandung senyawa bioaktif yang bernama *annonaceous acetogenin*. *Annonaceous acetogenin* telah ditemukan lebih dari 400 jenis struktur dan terus berkembang sampai sekarang (Feng et al, 1993; Zeng et al, 1996). Pada sirsak khususnya telah ditemukan 50 jenis *annonaceous acetogenin* dari biji, kulit batang dan daun sirsak sedangkan pada daun sirsak sendiri telah ditemukan 18 jenis *annonaceous acetogenin* dan telah terbukti secara in vitro bersifat Sitotoksik (Anti kanker) (Zeng et al, 1996). Selain sebagai anti kanker, fungsi *annonaceous acetogenin* dalam pengobatan lainnya belum ada bukti ilmiah. Oleh karena itu melalui penelitian ini akan dilakukan ekstraksi senyawa *annonaceous acetogenin* dan mengujinya pada mencit diabetes. Ekstraksi terhadap daun sirsak perlu dilakukan untuk mendapatkan *annonaceous acetogenin* dalam jumlah banyak dan terkonsentrasi sehingga dapat digunakan sebagai salah satu bahan baku dalam obat-obat tradisional. Bahan herbal ini tidak menggunakan paten untuk dapat menjualnya, sehingga perkembangan ekstraksi herbal masih berkembang luas untuk dapat menjangkau masyarakat luas.

Rumusan masalahnya adalah bagaimana efek antidiabetik senyawa aktif *Annonaceous Acetogenin* yang berasal dari daun sirsak pada mencit jantan diabetes yang diinduksi dengan aloxan. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis efek anti diabetik senyawa aktif *Annonaceous Acetogenin* yang berasal dari daun sirsak (*Annona muricata*) pada mencit jantan. Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai sumber informasi manfaat *annonaceous acetogenin* sebagai obat diabetes melitus.

METODE DAN BAHAN

Jenis Penelitian

Penelitian ini bersifat *eksperimental laboratory* dengan desain penelitian *Pretest and Posttest Randomized Controlled Group Design* dengan menggunakan binatang coba sebagai objek penelitian

Populasi dan atau Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah mencit jantan berat antara 20 g – 30g. Penentuan besar sampel ditentukan sesuai ketentuan WHO, terdiri dari 25 mencit. Sampel dibagi secara simple random ke dalam lima kelompok, yaitu kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan dan satu kelompok pembanding, dengan jumlah sampel 5 ekor tiap kelompok.

Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi dan Fitokimia jurusan Farmasi Poltekkes Makassar dan waktu pelaksanaannya lebih kurang 5 bulan

Penyiapan Alat Dan Bahan yang digunakan

Alat-alat yang digunakan alat Maserasi, corong, glukometer, spoit oral, labu tentukur 100 ml, lumpang, pipet volume, pipet tetes, pengaduk elektrik (Philips), spoit, timbangan analitik, timbangan kasar dan timbangan hewan

Bahan-bahan yang digunakan, air suling, alkohol 95 %, Daun Sirsak, Aloxan, natrium CMC, tablet glibenklamid

Penyiapan sampel yang digunakan

Bahan yang digunakan berupa daun, yang dipetik dari daun yang masih hijau dan tidak berwarna kuning dari tanaman sirsak (*Annona muricata*) yang diambil pada jam \pm 9-10 pagi, Daun kemudian dicuci bersih lalu dipotong-potong dengan derajat halus 4 / 18 atau ukuran 0,06 – 0,25 cm

Pembuatan Bahan Penelitian

1. Pembuatan ekstrak Daun Sirsak

Serbuk daun sirsak sebanyak 300 g dimasukkan ke dalam wadah maserasi, lalu ditambahkan etanol 95 % sebanyak \pm 600 ml untuk melembabkannya lalu ditambah lagicairan penyari etanol hingga tinggi cairan penyari 5 cm dari permukaan simplisia.

Rendaman disimpan ditempat yang tidak terkena sinar matahari langsung dan dibiarkan selama 5 hari sambil sekali-kali diaduk, setelah 5 hari rendaman disaring kemudian ampasnya

dimaserasi kembali dengan pelarut alkohol 95 % yang baru dengan volume yang sama. Hal ini dilakukan sebanyak 3 kali dengan jumlah pelarut yang sama.

Ekstrak etanol yang diperoleh kemudian dikumpulkan lalu dipekatkan dengan rotavapor hingga diperoleh ekstrak cair. Ekstrak cair kemudian diuapkan di rotavapor hingga kental lalu dilanjut diatas penangas air sampai kering.

2. Pembuatan larutan peng-isolasi

Larutan peng-isolasi dibuat dalam 2 jenis pelarut dengan masing-masing volume sebesar 200 ml

- Pelarut I : adalah campuran dengan volume yang sama (1:1) antara air (H_2O) dan diklormetana (CH_2Cl_2)
- Pelarut II : adalah campuran dengan volume yang sama (1:1) antara Heksan (C_6H_{14}) dan Metanol (CH_3OH)

3. Isolasi kandungan *Annonaceous Acetogenin*

Encerkan ekstrak daun sirsak dengan cairan **Pelarut I**, lalu masukkan kedalam corong pisah, kocok hingga homogen, lalu diamkan. Fase diklormetana dipisahkan dari fase air, dan fase diklormetana kemudian diuapkan, isolat pertama yang telah diuapkan kemudian ditambahkan dengan pelarut II lalu di masukkan dalam corong pisah dan dikocok hingga homogen, dan dibiarkan memisah. Setelah memisah diambil fase metanol dan pisahkan dari fase Heksan. Fase Metanol kemudian diuapkan dan siap diujikan pada mencit.

4. Pembuatan Larutan Na.CMC 1 % b/v

Suspensi Natrium CMC dibuat dengan cara memanaskan air suling sebanyak 50 ml hingga suhu $70^{\circ}C$ lalu dimasukkan Natrium CMC sebanyak 1 g dan diaduk dengan menggunakan pengaduk elektrik hingga terbentuk larutan yang homogen. Volumnya dicukupkan dengan air panas hingga 100 ml

5. Pembuatan Suspensi Metformin 0,5 % b/v

Serbuk tablet Metformin ditimbang setara dengan 500 mg metformin kemudian ditambahkan larutan Natrium CMC 1 % b/v sedikit

demis sedikit sambil diaduk hingga homogen. Dicukupkan volumenya dengan Na.CMC 1% hingga 100 ml

6. Pembuatan Suspensi *Annonaceous Acetogenin*

Isolat *Annonaceous Acetogenin* daun sirsak dibuat suspensi dengan konsentrasi 0,5 % b/v. Cara pembuatan suspensi 0,5 % b/v yaitu Isolat *Annonaceous Acetogenin* ditimbang sebanyak 0,5 g digerus dalam lumpang sambil ditambahkan sedikit demis sedikit suspensi Natrium CMC 1% b/v. Setelah terbentuk suspensi yang homogen volumenya dicukupkan dengan Suspensi Natrium CMC 1 % hingga 100 ml.

Dengan cara yang sama dibuat suspensi isolat dengan konsentrasi 1 % dan 2 % dengan menimbang isolat masing-masing sebanyak 1 g dan 2 g.

Perlakuan Terhadap Hewan Uji

Sebelum perlakuan ditimbang berat badan tiap mencit lalu catat kemudian mencit diambil darahnya melalui pembuluh darah yang ada di vena ekor dengan cara di potong ekor mencit tersebut ± 1 cm dari ujung ekor dengan menggunakan gunting yang telah di usap dengan alkohol 70%.

Darah yang keluar di teteskan pada strip glukometer yang terpasang pada alat. Kadar glukosa darah yang terbaca pada monitor glukometer dicatat sebagai kadar glukosa puasa

Setelah penentuan kadar glukosa puasa pada mencit, kemudian semua mencit diberikan injeksi aloxan yang dilarutkan dalam infus NaCl 0,9% dengan dosis 100 mg/Kg BB mencit secara intraperitoneal

Setelah 1 minggu diukur kadar gula darah **mencit dicatat sebagai kadar gula diabetik**. Mencit kemudian dikelompokkan secara rawu ke dalam 5 kelompok, tiap kelompok terdiri dari 5 ekor, lalu diberi perlakuan dimana kelompok I sebagai kontrol, diberikan larutan Na.CMC 1%, kelompok II diberi suspensi Metformin, kelompok III, IV dan V diberi suspensi Isolat *Annonaceous Acetogenin* daun sirsak dengan konsentrasi kelompok III sebesar 0,5 %, kelompok IV sebesar 1 % dan kelompok V sebesar 2 %. Semua perlakuan secara oral dengan volume pemberian adalah 0,2

ml / 20 g BB mencit. Pemberian dilakukan sebanyak 2 x sehari selama 2 hari. kemudian diambil darahnya dan di hitung kadar gula darahnya.

Teknik Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan berupa data primer dari kadar gula darah mencit pada setiap tahap perlakuan

Teknik analisis Data

Data yang diperoleh diolah dengan program SPSS 17.00 for Windows, dianalisis secara deskriptif setelah sebelumnya dilakukan uji normalitas menggunakan Shapiro-Wilk. Jika sebaran

data tidak normal ($p < 0,05$), dilanjutkan dengan uji non parametrik Wilcoxon untuk kelompok berpasangan. Dan uji non parametrik Kruskal-Wallis, kemudian dilanjutkan dengan uji MannWhitney untuk kelompok tidak berpasangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Penelitian

Dari hasil penelitian penurunan kadar glukosa darah setelah dua hari pemberian ekstrak dapat terlihat pada tabel dibawah :

Tabel 1. Pengamatan Perlakuan pada mencit

Kelompok	Replikasi	Berat badan	Kadar Gula				
			Awal	induksi	2 hari	Penurunan	% penurunan
Kontrol	1	30,4	103	278	168	110	40%
	2	28,3	118	187	104	83	44%
	3	28,4	84	238	181	57	24%
	4	27,09	107	206	167	39	19%
	5	27,12	108	237	124	113	48%
Isolat 0,5%	1	26,64	102	243	71	172	71%
	2	23,2	114	273	69	204	75%
	3	24,07	89	255	82	173	68%
	4	24,3	106	313	89	224	72%
	5	26,05	96	502	87	415	83%
Isolat 1 %	1	22	87	252	52	200	79%
	2	26	110	250	82	168	67%
	3	21,9	99	239	71	168	70%
	4	21,8	82	544	108	436	80%
	5	27,02	85	358	102	256	72%
Isolat 2 %	1	26,5	85	237	78	159	67%
	2	24,6	99	255	101	154	60%
	3	22,8	102	224	96	128	57%
	4	26,7	106	234	106	128	55%
	5	29,6	89	245	99	146	60%
Metformin	1	32	96	294	91	203	69%
	2	31	78	266	89	177	67%
	3	30	101	214	79	135	63%
	4	33	75	203	96	107	53%
	5	27,8	97	216	101	115	53%

Dari hasil statistika dengan menggunakan Mann-Whitney U didapat nilai probabilitas sebagai berikut

Tabel 2. Hasil perhitungan statistika

Kelompok	Kontrol	0,5%	1%	2%	Metformin
Kontrol		0,009	0,009	0,009	0,028
0,5%	0,009		0,753	0,009	0,076
1%	0,009	0,753		0,009	0,116
2%	0,009	0,009	0,009		0,917
Metformin	0,028	0,076	0,116	0,917	

Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis efek anti diabetik senyawa aktif *Annonaceous Acetogenin* yang berasal dari daun sirsak (*Annona muricata*). *Annonaceous Acetogenin* diperoleh dengan cara ekstraksi cair-cair menggunakan metode yang telah dibuktikan oleh Kamarza Mulia dkk, dimana pada metode ini menggunakan 2 jenis pelarut campuran yaitu Pelarut I adalah campuran dengan volume yang sama (1:1) antara air (H₂O) dan diklormetana (CH₂Cl₂), serta pelarut II adalah campuran dengan volume yang sama (1:1) antara Heksan (C₆H₁₄) dan Metanol (CH₃OH). Isolat yang diperoleh kemudian disuspensinya dengan Na.CMC 1%

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah hewan coba mencit jantan telah dibuat diabetes tipe I dengan menggunakan injeksi aloksan yang diberikan secara i.p. Efek diabetes aloksan (2,4,5,6-tetraoxypyrimidine; 5,6-dioxyuracil) terutama disebabkan ambilan cepat oleh sel beta dan pembentukan radikal bebas, dimana sel beta memiliki mekanisme pertahanan yang buruk untuk radikal bebas tersebut (Nerup et al., 1994). Aloksan direduksi menjadi asam dialuric dan kemudian teroksidasi kembali menjadi aloksan, menciptakan siklus redoks untuk regenerasi radikal superoksida yang mengalami dismutasi untuk membentuk hidrogen peroksida dan selanjutnya membentuk radikal hidroksil yang sangat reaktif dan menyebabkan fragmentasi DNA sel beta (Szkudelski, 2001).

Aloksan juga diambil oleh hati, tetapi hati memiliki perlindungan yang lebih baik untuk oksigen reaktif (Malaisse et al, 1982; Mathews dan Leiter, 1999) dan oleh karena itu hati tidak rentan terhadap kerusakan. Mekanisme lain kerusakan sel beta oleh aloksan termasuk oksidasi gugus SH yang esensial, terutama dari

glukokinase (Walde et al.,2002) dan gangguan dalam homeostasis kalsium intraseluler (Kim et al., 1994). Setelah pemberian aloksan selama 1 minggu Hewan coba yang memiliki kadar gula darah diatas 180 mg/dl digunakan dalam penelitian. Penentuan kadar glukosa darah mencit dilakukan dengan menggunakan alat glukometer.

Dari hasil penelitian menunjukkan semua hewan coba mengalami Diabetes melitus setelah 1 minggu pemberian aloksan. Keadaan diabetes melitus pada mencit ditandai dengan kadar glukosa darah puasa diatas 180 mg/dl. Setelah hewan coba dipastikan mengalami diabetes, mencit kemudian diberikan perlakuan dimana kelompok kontrol diberikan Larutan Na.CMC, kelompok perlakuan terdiri dari 3 kelompok yaitu kelompok yang diberikan suspensi isolat *Annonaceous Acetogenin* dengan konsentrasi 0,5%, 1 % dan 2 %, semua pemberian dilakukan peroral dengan volume pemberian 1 ml / 30 g BB, sedangkan kelompok pembanding diberikan suspensi metformin. Semua perlakuan diberikan sebanyak 2 x sehari tiap pagi dan petang

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa semua perlakuan pemberian isolat dengan konsentrasi 0,5%, 1% dan 2 % menghasilkan penurunan kadar glukosa darah yang signifikan lebih besar dari kontrol (Na.CMC) dan pemberian isolat dengan konsentrasi 1% dan 2 % penurunan kadar glukosa darahnya sebanding dengan metformin, namun pemberian isolat dengan konsentrasi 0,5% penurunan kadar glukosa darahnya lebih besar dari kontrol negatif dan metformin. Ini menunjukkan pemberian isolat *Annonaceous Acetogenin* dengan konsentrasi 0,5%, 1 % dan 2 % memiliki efek antidiabetik, dimana pemberian Isolat *Annonaceous Acetogenin* dengan konsentrasi 0,5% penurunan kadar glukosa

darahnya signifikan lebih besar dari metformin.

PENUTUP

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan maka dapat ditarik kesimpulan bahwa :

1. Senyawa Isolat *Annonaceous Acetogenin* dengan konsentrasi 0,5 %, 1 % dan 2 % dapat menurunkan kadar glukosa darah mencit diabetes tipe I yang diinduksi dengan *aloxan*
2. Penurunan kadar glukosa darah mencit dengan pemberian Isolat *Annonaceous Acetogenin* konsentrasi 1% dan 2 % setara dengan penurunan glukosa darah oleh metformin sedangkan konsentrasi 0,5 % penurunan kadar glukosa darahnya lebih besar dari metformin

Saran

Untuk dapat menyempurnakan penelitian ini maka dapat disarankan :

1. Sebaiknya dilakukan isolasi yang lebih mendalam hingga diperoleh bentuk murni dari Isolat *Annonaceous Acetogenin*
2. Sebaiknya menggunakan hewan coba yang lebih tinggi semisal kelinci

DAFTAR PUSTAKA

American Diabetes Association, 2010, *Standards of Medical Care in Diabetes 2016*. American Diabetes Association

Feng-E Wu, Geng-Xian Zhao, Lu Zeng, Yan Zhang, Jon T. Schwedler, Jerry L. McLaughlin, Soelaksono Sastrodihardjo (1995) Additional Bioactive Acetogenins, Annonutacin

and (2,4-trans and cis)-10R-Annonacin-A-ones, from the Leaves of *Annona muricata*. *J. Nat. Prod.*, 1995, 58 (9), pp 1430–1437.

Istikomah, F. 2014. Pemanfaatan daun sirsak sebagai obat kanker dengan metode ekstraksi maserasi. Institut Agama Islam Negeri Walisongo : Semarang.

Kamarza Mulia, Silvester Widyo Winarcahyo, Elsa Krisanti, Dewi Kurniasuci 2013 solasi Senyawa *Annonaceous Acetogenin* dari Daun Sirsak (*Annona Muricata*) dengan Menggunakan Kolom Kromatografi Terbuka

Steenis, C.G.G.J.V. 1997. Flora Untuk Sekolah di Indonesia. Diterjemahkan oleh Surjawianto, M. dkk. Pradnya Paramita : Jakarta

Sukandar. , Elin Yuliana, 2008. ISO Farmakoterapi PT.Isfi Penerbitan, Jakarta.hal 26

Tjitrosoepomo, G. 2010. Taksonomi Tumbuhan. Gadjah mada University press : Yogyakarta

World Health Organization, 2009, Tingkat Penderita Diabetes Millitus <http://journal.unair.ac.id/filerPDF/jbed89640f867full.pdf>,

Zeng, L., Ye, Q., Oberlies, N. H., Shi, G., Gu, Z. M., He, K., & McLaughlin, J. L. (1996). Recent advances in *annonaceous acetogenins*. *Natural Product Reports*

Zuhud, E. 2011. Bukti kedahsyatan sirsak menumpas kanker. Agromedia pustaka : Jakarta selatan