

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN KOMBINASI SIRSAK (*Annona muricata*)
DAN KELOR (*Moringa oleifera*) PADA TIKUS DIABETES MELLITUS
YANG DIINDUKSI ALOXAN**

Agil Novianto*, Hartono, Nugraheni Dewi Saraswati, Winda Septiana

Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional

Jl. Yos Sudarso No.338, Danukusuman, Serangan, Kota Surakarta, Jawa Tengah 57155

*email : agi.novianto@gmail.com

Abstrak

Tingginya kadar glukosa pada *Diabetes Mellitus* memicu terjadinya stress oksidatif yang ditandai dengan ketidak seimbangan antara jumlah radikal bebas dan antioksidan. Penelitian sebelumnya ekstrak sirsak dan kelor efektif dalam bentuk tunggalnya mampu menurunkan kadar gula darah yang disertai dengan kemampuan untuk menurunkan dampak stress oksidatif. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh kombinasi ekstrak sirsak dan kelor terhadap kadar glukosa pada tikus yang diinduksi aloxan. Hewan uji sebanyak 36 ekor yang dibagi menjadi 6 kelompok yaitu: kelompok normal (akuades), kontrol negatif (CMC Na 0,5 %), kontrol positif (glibenclamide dosis 1,26 mg/kgBB), ekstrak sirsak 100 mg/kg BB, ekstrak kelor dosis 200 mg/kg BB dan kombinasi I (75:25), II (50:50) dan III (25:75) dalam persen. Semua Kelompok hewan uji, kecuali kelompok normal diinduksi aloxan dosis 160mg/kgBB pada hari ke-0, dilanjutkan dengan perlakuan hewan uji dari hari ke-1 sampai hari ke-14. Pada hari terakhir hewan uji dikorbankan untuk diambil organ liver dan dilakukan pengecakan kadar stress oksidatif yang meliputi lipid peroksidase dan glutathione. Penggunaan ekstrak daun kelor dan sirsak baik itu tunggal dan kombinasi mampu menurunkan stress oksidatif yang ditandai dengan turunya kadar LPO dan naiknya kadar GSH secara signifikan ($p < 0,05$). Aktivitas optimal pada kombinasi sirsak kelor 50:50. Kombinasi ini memberikan hasil yang lebih bagus dibandingkan bentuk tunggalnya

Kata kunci : sirsak, kelor, diabetes mellitus, antioksidan, stres oksidatif

PENDAHULUAN

Diabetes Melitus (DM) merupakan penyakit yang ditandai dengan kenaikan kadar gula darah di atas normal dengan gejala polidipsi, polifagi dan poliurea (Almatsier, 2008). Pada tahun 2003 terdapat 194 juta jiwa di dunia menderita DM dan akan meningkat menjadi 333 juta jiwa pada tahun 2025 menurut laporan Global Diabetes Statistic. Prevalensi DM penduduk Indonesia berusia 15 tahun sekitar 1,2 – 2,3% (Aziza, 2010). Berdasarkan laporan *World Health Organization* (WHO), DM termasuk salah satu pembunuh terbesar di Asia Tenggara dan Pasifik Barat (PERKENI, 2006). Estimasi prevalensi DM pada dewasa

(usia 20-79 tahun) sebanyak 6,4% atau 285 juta orang. Pada tahun 2013, proporsi penduduk Indonesia yang berusia ≥ 15 tahun dengan DM adalah 6,9 persen (Kemenkes, 2013).

Kenaikan kadar gula dalam darah akan memicu terjadinya kondisi stress oksidatif yang ditandai dengan ketidakseimbangan antara jumlah radikal bebas dan antioksidan. Penelitian yang dilakukan oleh Stephen *et al.*, (2006); Gupta *et al.*, (2012; Florence *et al.*, (2014) menunjukkan bahwa peningkatan kadar gula darah akan diikuti dengan kenaikan kadar *lipid peroxide* (LPO), penurunan kadar antioksidan endogen seperti *Glutathione* (GSH), *Superoxide Dismutase*

(SOD), dan juga Catalase.

Sirsak (*Annona muricata* Linn) telah banyak dikembangkan untuk berbagai macam penyakit seperti kanker maupun DM. Penggunaan fraksi air sirsak 100mg/kg BB dapat menurunkan kadar gula darah pada hewan uji yang diinduksi streptozotocin Stephen *et al.*, (2006) dan Florence *et al.*, (2014). Penggunaan sirsak mampu menurunkan kadar stress oksidatif yang ditandai dengan penurunan kadar lipid peroksidase (Moghadamtousi *et al.*, 2015). Kelor (*Moringa oleifera* lam.) telah banyak diteliti efeknya dalam menurunkan kadar gula dalam darah. Penelitian yang dilakukan oleh El-Desouki *et al.*, (2015) menunjukkan bahwa ekstrak daun kelor mampu menurunkan kadar gula darah dengan meningkatkan kadar insulin dan memperbaiki kerusakan Gupta *et al.*, (2012) merupakan pemberian ekstrak kelor dosis mampu menaikkan aktivitas antioxidant pada hewan uji dalam kondisi diabetets mellitus. Ekstrak air daun kelor dosis 200 mg/kg BB terbukti efektif untuk menurunkan kadar gula darah pada tikus diabetes mellitus resistensi insulin maupun defisiensi insulin (Divi *et al.* 2012).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh kombinasi kedua ekstrak terhadap kadar stress oksidatif pada tikus DM yang diinduksi aloksan. Penelitian ini sekaligus dilakukan untuk mengetahui apakah bentuk kombinasi memiliki efek yang lebih efektif bila dibandingkan dalam bentuk tunggalnya.

MATERIAL DAN METODE

1. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan untuk penelitian meliputi neraca analitik, spuit oral, spuit pengaduk, jarum suntik, *hand glove*, sarung tangan, masker, kapas, corong kaca, labu takar, kandang hewan, pipa kapiler, endrop, mikrokuvet dan spektrometer UV Vis dan Microvitalab. Bahan yang digunakan dalam penelitian daun kelor, daun sirsak, CMC-Na (teknis), aloksan

(Sigma), aquadest, glibenklamid, reagen TCA, TBA, Asam sitrat, SDS (Sigma). Hewan uji tikus jantan galur Wistar berat 150-200g, dengan umur 2-3 bulan

2. Metode

Sebanyak 1 kg daun kelor dan sirsak dilakukan ekstraksi dengan menggunakan metode maserasi. Simplisia dimasukkan dalam bejana, kemudian ditambah dengan 7,5 liter air ditutup dan biarkan selama 3 hari, diserkai, dan ampas diperas. Sari dipekatkan hingga diperoleh ekstrak kental.

Hewan uji sebanyak 36 ekor yang dibagi menjadi 6 kelompok yaitu: kelompok normal (aquadest), kontrol negatif (CMC Na 0,5%), kontrol positif (glibenclamide dosis 1,26 mg/kgBB), ekstrak sirsak 100 mg/kg BB (Florence *et al.*, 2014), ekstrak kelor dosis 200 mg/kg BB (Divi *et al.* 2012) dan kombinasi I (75:25), II (50:50) dan III (25:75) dalam persen. Semua Kelompok hewan uji, kecuali kelompok normal diinduksi aloksan dosis 160mg/kgBB pada hari ke-0, dilanjutkan dengan perlakuan hewan uji dari hari ke-1 sampai hari ke-14. Pada hari terakhir hewan uji dikorbankan untuk diambil organ liver dan dilakukan pengecakan kadar antioksidan.

Untuk analisis parameter stres oksidatif digunakan organ liver. Organ liver dicuci dengan *ice cold normal saline*. Organ liver selanjutnya dikeringkan dan ditimbang, sebesar 10% dari jaringan ini selanjutnya dihomogenkan dan dilakukan preparasi dengan larutan 0,15 M Tris HCl (Ph 7,4). Liver yang telah dihomogenkan ini digunakan untuk analisis Lipid Peroxidation (LPO) dan glutathione (GSH)

a. Pengukuran kadar GSH (Gluthatione)

Sampel jaringan dihomogenisasi dalam TCA pada kondisis dingin

(1gram jaringan ditambahkan dengan 10 ml TCA 10%). Setelah dilakukan sentrifugasi dengan 3000 rpm selama 10 menit, 0,5 ml supernatan ditambah dengan 2 ml disodium hidrogen phosphate 0,3 M. Selanjutnya campuran ditambah 0,2 ml larutan dithiobisnitrobenzoate (0,4 mg/ml dalam sodium citrat 1%). Absorbansinya diukur pada 412 nm. Nilai absorbansi dibandingkan dengan kelompok kontrol normal yang tidak diberi perlakuan

b. Pengukuran kadar *Lipid peroxidation* (LPO)

Jumlah terbentuknya lipid peroksidasi dapat dilihat dengan melakukan monitoring terbentuknya tiobarbiturat. Campurkan sejumlah 1,0 ml sampel biologis (jaringan liver setara dengan 0.1-2 mg membran protein) dengan 2.0 ml TCA(Trichloroacetic acid)-TBA (Thiobarbituric acid)-HCl (Hydrochloric acid) dan campur secara bersamaan. Campuran larutan selanjutnya dipanaskan selama 15 menit di atas air mendidih. Setelah dingin, endapan yang muncul dihilangkan dengan sentrifugasi pada 1000rpm selama 10 menit. Diakukan pengukuran absorbansi pada 535 nm yang dibandingkan dengan blanko yang mengandung semua komponen di atas kecuali sampel biologis (liver).

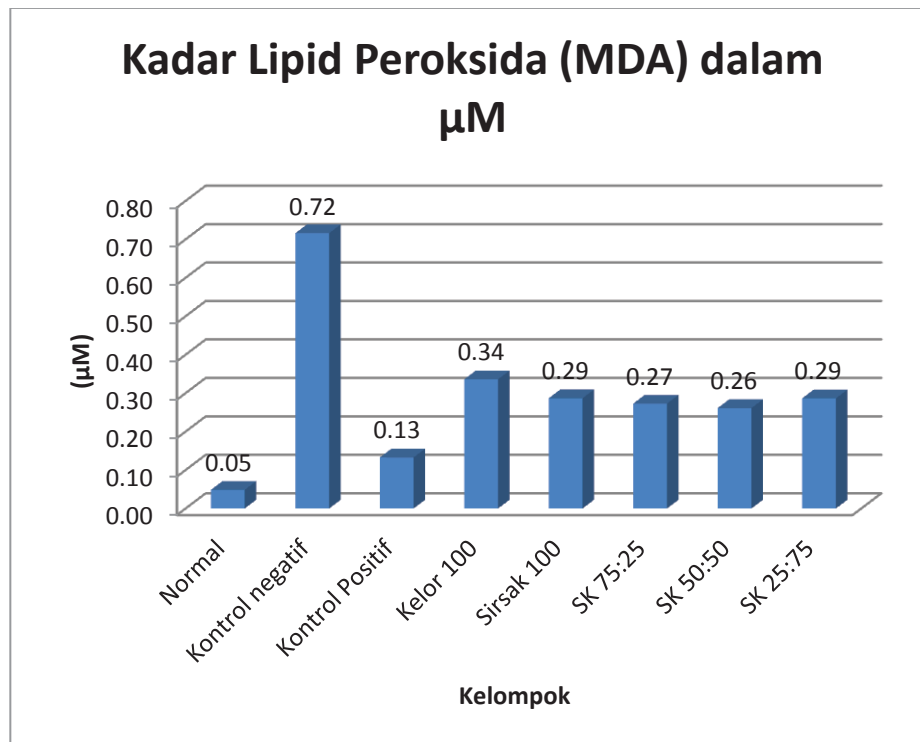
HASIL DAN PEMBAHASAN

Kenaikan kadar gula dalam darah akan memicu terjadinya kondisi stress oksidatif yang ditandai dengan ketidakseimbangan antara jumlah radikal bebas dan antioksidan. Penelitian yang dilakukan oleh Stephen *et al.*, (2006); Gupta *et al.*, (2012; Florence *et al.*, (2014) melaporkan kandungan peningkatan kadar gula darah akan diikuti dengan kenaikan

kadar *lipid peroxide* (LPO), penurunan kadar antioksidan endogen seperti *Gluthatione* (GSH), *Superoxide Dismutase* (SOD), dan juga Catalase. Stress Oksidatif memiliki kontribusi pada perburukan dan perkembangan kejadian komplikasi DM. Untuk meredam kerusakan oksidatif tersebut diperlukan antioksidan (Matough *et al.*, 2012;).

Untuk melihat pengaruh pemberian daun sirsak dan kelor dalam bentuk tunggal maupun kombinasi kaitanya dengan aktivitas antioksidan pada tikus dengan kondisi DM maka diperlukan pengukuran dua parameter yaitu Lipid peroksidase dan Glutathione yang merupakan dua parameter untuk mengetahui tingkat stress oksidatif yang terjadi di dalam tubuh hewan uji. Pengujian dua pamater tersebut dilakukan dengan menggunakan organ liver mengingat liver merupakan organ yang berperan penting dalam proses detoksifikasi senyawa, sehingga keberadaanya akan ditunjang dengan antioksidan enzimatik maupun non enzimatik.

Lipid peroxidation atau lipid hidroperoksida merupakan suatu molekul yang stabil pada suhu fisiologis atau suhu tubuh. Kadar lipid peroxidation diukur metode asam tiobarbiturat (TBA) yang mengukur adanya MDA. TBA akan bereaksi dengan gugus karbonil dari MDA, yaitu satu molekul MDA akan berikatan dengan dua molekul TBA sehingga membentuk senyawa kompleks berwarna merah (Halliwell and Gutteridge, 1999). Terbentuknya warna merah tersebut akan diukur serapannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 532 nm yang sebanding dengan tingkat oksidasi lipid. Pada reaksi ini ada sejumlah senyawa lain yang juga bereaksi dengan TBA, namun karena jumlahnya kecil maka bisa diabaikan. Senyawa-senyawa itu diantaranya adalah glukosa <0,4 mg (2,2 μ mol) dan sukrosa <8,56 mg (25,0 μ mol) (Ohkawa dkk., 1979).



Gambar 1. Kadar lipid peroksidase

Dapat dilihat dari gambar di atas bahwa berdasarkan uji kadar MDA pada hewan uji kontrol yang di induksi aloksan tanpa di berikan obat mempunyai kadar MDA yang paling tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa induksi aloksan pada tikus mampu menyebabkan kenaikan kadar stress oksidatif yang ditandai dengan tingginya kadar malondialdehide sebesar $0,72\mu\text{M}$. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh (Sindhu dkk., 2010) yang menyatakan penggunaan aloksan mampu menyebabkan kenaikan kadar lipid peroksidase yang ditandai dengan tingginya kadar MDA dalam liver. Berbeda dengan penggunaan glibenklamide sebagai kontrol positif mampu menyebabkan penurunan kadar stress oksidatif secara signifikan ($p<0,05$) dibandingkan control negative. Hal ini ditandai dengan kadar MDA pada kelompok ini lebih rendah dibandingkan kontrol negatif bahkan mendekati pada kelompok normal.

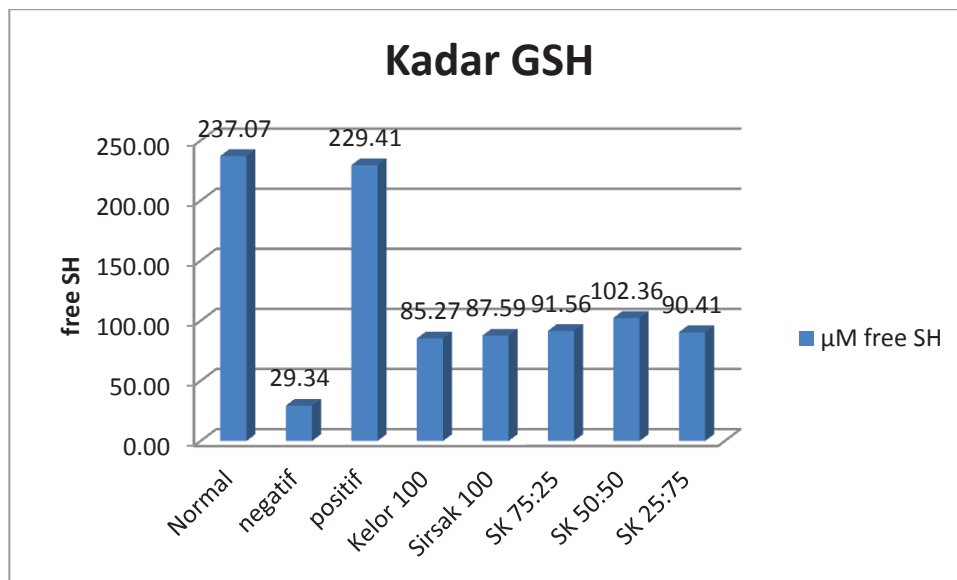
Penggunaan ekstrak daun kelor dan sirsak baik tunggal maupun kombinasi mampu menghambat dampak stress oksidatif oleh aloksan yang ditandai dengan kadar MDA yang terukur lebih kecil dibandingkan dengan kontrol negatif ($p<0,05$). Dari data tersebut kombinasi sirsak kelor 50:50 memberikan aktivitas paling baik dibandingkan dengan bentuk tunggalnya dan dua kombinasi lainnya. Hal ini ditunjukkan dengan kadar MDA yang terukur paling rendah ($0,26\mu\text{M}$).

Glutathione atau GSH merupakan antioksidan non enzimatis yang memiliki peranan sebagai kofaktor dalam detoksifikasi peroxide oleh glutathione peroxidase. Tingginya kadar GSH dalam tubuh mengindikasikan kondisi antioksidan yang tinggi serta sebaliknya kondisi stress oksidatif yang rendah.

Pengukuran kadar GSH dilakukan dengan menggunakan metode Ellman (1959), yang mendasarkan pada reaksi antara GSH dengan dengan

dithiobisnitrobenzoic acid (DNTB) dan terukur pada λ 412 nm. Dari hasil

penelitian yang telah dilakukan diperoleh hasil sebagai berikut.



Gambar 2. Kadar GSH antar kelompok uji

Dari data di atas dapat diketahui bahwa kelompok control negatif memiliki kadar GSH paling rendah diantara yang lain ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa induksi aloksan mampu menyebabkan penurunan kadar antioksidan endogen non enzimatis. Berbeda dengan hasil tersebut, glibenclamide sebagai kontraol positif mampu mencegah stress oksidatif yang ditandai dengan naiknya kadar GSH pada hewan uji yang diinduksi aloksan berbeda signifikan ($p < 0,05$) bila dibandingkan control negatif. Kadar GSH pada kelompok glibenclamide mendekati pada kelompok normal dengan kadar terukur sebesar 229,41 μM .

Penggunaan sampel uji daun kelor dan sirsak baik tunggal maupun kombinasi mampu menaikkan kadar GSH secara signifikan dibandingkan kontrol negatif ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan baik tunggal maupun kombinasi kedua ekstrak memiliki aktivitas antioksidan endogen non enzimatis. Di ketiga kombinasi diperoleh kombinasi sirsak kelor 50:50 memiliki aktivitas yang paling baik. Hal ini ditandai dengan kadar GSH paling

tinggi diantara kombinasi dan bentuk tunggalnya yaitu 102,36 μM .

Dari kedua uji baik itu LPO dan GSH dapat diketahui bahwa penggunaan sampel uji terbukti memiliki aktivitas antioksidan dengan hasil turunya kadar LPO dan tingginya kadar GSH. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya oleh Hartono *et al* (2017), yang mana penggunaan kombinasi sirsak dan kelor mampu menurunkan kadar glukosa pada tikus diabetes mellitus yang diinduksi aloksan. Turunya kadar glukosa pada tikus berdampak terhadap penurunan stress oksidatif sama seperti dengan hasil penelitian yang telah dilakukan. Gupta *et al*. (2012), melaporkan bahwa penggunaan kelor terbukti secara efektif mampu menurunkan kadar stress oksidatif yang ditandai dengan penurunan LPO, dan tingginya kadar antioksidan endogen seperti catalase dan glutathion peroksidase. Dalam penelitian lain penggunaan sirsak terbukti secara efektif mampu menurunkan kadar stress oksidatif yang ditandai dengan penurunan kadar lipid peroksidase (Moghadamtousi *et al*, 2015). Dari hasil

penelitian ini dapat diambil kesimpulan kombinasi kedua ekstrak terbukti mampu menurunkan kadar stress oksidatif yang ditandai dengan peurunan LPO dan naiknya kadar antioksidan endogen GSH. Dari hasil ini dapat diusulkan mekanisme kombinasi kedua ekstrak sebagai obat terapi diabetes mellitus dengan mekanisme kerja melalui efek antioksidan yang ditimbulkannya.

KESIMPULAN

Penggunaan ekstrak daun kelor dan sirsak baik itu tunggal dan kombinasi mampu menurunkan stress oksidatif yang ditandai dengan turunya kadar LPO dan naiknya kadar GSH secara signifikan ($p < 0,05$). Aktivitas optimal pada kombinasi sirsak kelor 50:50. Kombinasi ini memberikan hasil yang lebih bagus dibandingkan bentuk dosis tunggalnya

UCAPAN TERIMA KASH

Ucapan terima kasih diberikan kepada Kementrian Ristek DIKTI melalui program hibah untuk Penelitian Dosen Pemula tahun pendanaan 2017.

REFERENSI

- Ahalya, K. Ravi Shankar, G. V. N. Kiranmayi, 2014, Exploration of Anti-Hyperglycemic and Hypolipidemic Activities of Ethanolic Extract of *Annona muricata* Bark in Alloxan Induced Diabetic Rats, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 25(2), Pages: 21-27
- Ahmed, R.G., 2005, The Physiological and Biochemical Effects of Diabetes on The Balance Between Oxidative Stress and Antioxidant Defense System, *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*, 15(1): 31-42.
- Almatsier, S., 2008, *Penuntun Diet*, Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.

- Aziza, R.Z., 2010, Gambaran Histomorfologi hati, usus halus, dan limpa pada tikus hiperglikemia yang diberi Ekstrak Sambiloto, *Skripsi*, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- BPOM RI., 2014, *Peraturan Kepala Badan POM No 12 tahun 2014 tentang Persyaratan Mutu Obat Tradisional*, Jakarta.
- Divi, Bellamkonda, Dasireddy, Evaluation Of Antidiabetic And Antihyperlipidemic Potential Of Aqueous Extract Of Moringa Oleifera In Fructose Fed Insulin Resistant And Stz Induced Diabetic Wistar Rats: A Comparative Study, *Asian J Pharm Clin Res*, Vol 5, Issue 1, 2012, 67-72
- El-Desouki, N.M., Basyony, M.A., Hegazi, M.M., and El-Aama, M.S., *Moringa oleifera* Leaf Extract Ameliorates Glucose, Insulin and Pancreatic Beta Cells Disorder in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *RJPBCS* 6(3) Page No. 642.
- Florence NT, Benoit MZ, Jonas K, Alexandra T, Désiré DD, Pierre K, and Théophile D, . 2014, Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats, *J Ethnopharmacol.* 3;151(2):784-90.
- Gupta, E., Mathur, M., Kamala and Gupta., 2012, **Evaluation of antidiabetic and antioxidant activity of Moringa oleifera in experimental diabetes**, *J Bioequiv Availab*, 4.3
- Gupta, S., Agarwal, A., Sharma, R.K., 2005, The Role of Placenta Oxidative Stress and Lipid Peroxidation in Preeclampsia, **60(12):807-816**, *Obstetrical and Gynecological Survey*.
- Guyton, A.C., dan Hall, J.E., 2007, *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran, Edisi 11*. Penerjemah: Irawati Setawan. Jakarta: EGC.

- Handoko dan Suharto, 2005, *Insulin, Glukagon dan Antidiabetik Oral. Dalam: Farmakologi dan Terapi edisi 4*, Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Kemenkes, 2013, *Riset Kesehatan Dasar*, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI, Jakarta.
- Kesharwani, Prasad, P., Roy, A., and Suhu, R.K, 2014, An Overview on Phytochemistry and Pharmacological Explorations of *Moringa oleifera*, *UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences* Vol. 2(1), 34-41.
- Marjani, A., 2010, Lipid Peroxidation Alterations in Type 2 Diabetic Patients, **13(15)**: 723-30, *Pakistan Journal of Biological Sciences*,
- Matough, Budin., S.B., Hamid, Z.A., Alwahaibi, N., and Mohamed, J., 2012, The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Complications, *Sultan Qaboos Univ Med J.* 12(1): 5–18
- Moghadamtousi, Z.M., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Ali., and Kadir, H.A, 2015, *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities, *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 15625-15658;
- Moussa, S.A. 2008. Oxidative Stress in Diabetes Mellitus. *Romanian J. Biophys*, 18(3): 225-36
- Oberley. 2010. *Cell signaling enzyme*. Available from: <http://www.sigmaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/cell-signaling-enzymes/superoxide-dismutase.html>. Diakses pada 9 Mei 2016.
- Perkeni, 2006, *Konsensus Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe-II di Indonesia*, Jakarta: PB.PERKENI.
- Setiawan, B. dan Suhartono, E., 2005, Stres Oksidatif dan Peran Antioksidan pada Diabetes Melitus, **55(2)**, 86-90, *Majalah Kedokteran Indonesia*.
- Soegondo S., 2010, *Buku Panduan Penatalaksanaan Diabetes Mellitus di Layanan Kesehatan Primer di Indonesia*, Departemen Ilmu Kedokteran Komunitas, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Soesilowati S., 2003 *Diabetic neuropathy: pathogenesis and treatment*. **35(1)**, 27-34, *Acta Medica Indonesiana*.
- Sogara et al, 2014, *Pengaruh Ekstrak Etanol Buah Ketumbar (Cor sativum L.) Terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah Tikus Putih yang Diinduksi Alloxan*, FMIPA UNSTRAT, Manado
- Stephen, Adewole, and Martins, E.A., 2006, Morphological Changes and Hypoglycemic Effects of *Annona Muricata* Linn. (Annonaceae) Leaf Aqueous Extract on Pancreatic B-Cells of Streptozotocin-Treated Diabetic Rats, *African Journal of Biomedical Research*, Vol. 9 (2006); 173 - 187
- Suherman, K.S. 2007. Adrenokortikotropin, Adrenokortikosteroid, Analog Sintetik dan Antagonisnya, Dalam *Farmakologi dan Terapi Edisi kelima*, Jakarta: Departemen Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Tiwari, A.K., J.M. Rao, 2002, *Diabetes mellitus and multiple therapeutic approaches of phytochemicals: Present status and future prospect*. vol 83, 1, 30-38, *Current Science*