

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tumbuhan Sirsak (*Annona Muricata* L.)

2.1.1 Tumbuhan Daun Sirsak (*Annona Muricata* L.)

Tanaman sirsak umumnya memiliki tinggi sekitar 3-10 meter dan bercabang rendah. Bentuk daun sirsak memanjang seperti lanset atau bulat telur sungsang, ujung meruncing pendek, permukaan atas daun berwarna hijau tua, dan permukaan bawah berwarna hijau muda. Kulit buah sirsak berduri lunak, saat masih muda berwarna hijau dan berjarak rapat. Jika buah sirsak sudah tua berubah agak kehitaman, durinya lunak, dan merenggang. Daging buah sirsak berwarna putih dan berbiji banyak. Bunganya berwarna kuning dan berbentuk kerucut tidak beraturan (Zuhud E.A, 2011). Tanaman Sirsak bisa dilihat pada Gambar 2.1



Gambar 2.1 Tanaman Sirsak
(Sumber:Agrotek, 2019)

Sirsak merupakan tanaman tropis yang tumbuh diberbagai negara di dunia. Di Thailand dikenal dengan nama *thurian khaek*, *guayabano* (Filipina), *graviola* (Brazil), *huanaba* (Spanyol), *corossol* (Perancis), *toge-banreisi* (Taiwan), *durian benggala* (India), *sauersack sausap* (Papua Nugini), dan

stachelannone (Jerman). Buah sirsak dalam bahasa Inggris dikenal dengan istilah soursop karena rasanya yang manis keasaman (Mardiana L., 2015).

Sirsak diberbagai wilayah Indonesia dikenal sebagai nangka sebrang, nangka landa (Jawa), nangko walanda, sirsak (Sunda), nangka buris (Madura), srikaya jawa (Bali), deureuyan belanda (Aceh), durio ulondro (Nias), serekaja (Bugis), jambu landa (Lampung), dan durian betawi (Minangkabau) (Mardiana L., 2015).

Sirsak dapat tumbuh pada kisaran iklim yang cukup luas, pada dataran rendah (0 m dari permukaan laut/ dpl) hingga 1.200 m dpl. Selain itu, tanaman ini dapat tumbuh pada berbagai tipe tanah, baik yang kaya unsur hara dan berpengairan baik, maupun lahan marginal seperti tanah masam, tanah kering, dan tanah berpasir. Habitat sirsak dapat tumbuh pada semua jenis tanah dengan pH antara 5-7 (Mardiana L., 2015).

2.1.2 Klasifikasi Daun Sirsak (*Annona muricata* L.)

Sirsak dalam sistematika tumbuhan (taksonomi) diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom : *Plantae*
 Divisio : *Spermatophyta*
 Subdivisi : *Angiospermae*
 Kelas : *Dicotyledonae*
 Famili : *Annonaceae*
 Genus : *Annona*

Spesies : *Annona muricata* L. (sinonim: *Annona classiflora* Mart, *Annona sericea* Lam. dan *Annona macrocarpa* Werckle (Maya D., and Kurnia H, 2015).



Gambar 2.2 Daun Sirsak
(Sumber:(Agrotek, 2019)

2.1.3 Ciri Mikroskopis Daun Sirsak

Daun sirsak berbentuk bulat, panjang, menyirip dengan ujung daun meruncing, permukaan daun mengkilap, serta berwarna hijau muda sampai hijau tua (Sunarjono, and H. Hendro, 2005).

2.1.4 Manfaat Daun Sirsak

Daun sirsak mempunyai manfaat untuk menyerang sel kanker dengan aman dan efektif secara alami, tanpa rasa mual, berat badan turun, rambut rontok, seperti yang terjadi pada terapi kemo. Banyak pasien kanker mempercayai manfaat dari daun sirsak sebagai salah satu alternatif untuk mengobati kanker (Utari K, et al., 2013). Daun sirsak bersifat seperti kemoterapi dan mempunyai kemampuan untuk membunuh sel-sel yang tumbuh abnormal, serta membiarkan sel-sel yang tumbuh normal. Bagian daun dari pohon sirsak banyak dimanfaatkan untuk kesehatan

menyebabkan pergeseran positif pada keseimbangan redoks intraselular (Muizuddin, M and E. Zubaidah., 2015). *Acetogenins* merupakan inhibitor kuat dari kompleks I mitokondria atau NADH dehidrogenase. Produksi ATP yang dapat menyebabkan kematian sel kanker dapat diturunkan oleh *Acetogenins*. Zat ini kemudian dapat memicu terjadinya apoptosis dan mengaktifkan p53 yang dapat menghentikan siklus sel untuk mencegah terjadinya proliferasi yang tidak terkendali (Retnani V., 2011). Senyawa yang berperan dalam aktivitas sebagai antioksidan adalah flavonoid dan tanin. Antioksidan dapat menurunkan aktivitas peroksidasi lipid, sehingga mengurangi risiko kerentanan sel dan organ tubuh terhadap pembentukan tumor (Roduan, M.R.M et al., 2019).

Daun sirsak secara *in vivo* juga memiliki aktivitas sebagai antidiabetes. Aktivitas tersebut salah satunya dikarenakan adanya antioksidan yang dapat mengurangi stres oksidatif sehingga dapat mengurangi rusaknya sel β -pankreas yang diinduksi streptozotoksin. Streptozotoksin yang terdekomposisi dapat melepaskan ROS dan akan menyebabkan kematian sel (Florencea, N. T et al., 2017). Antioksidan daun sirsak juga memiliki efek sitoprotektif pada sel-sel trakea dan pulmo mencit yang diinduksi asap antinyamuk bakar. Asap antinyamuk bakar dapat menyebabkan kerusakan sel yang diduga karena adanya peningkatan radikal bebas. Senyawa flavonoid yang terkandung dalam daun sirsak berfungsi sebagai antioksidan. Flavonoid mempunyai fungsi menghambat terbentuknya radikal bebas, menghambat peroksidasi lemak dan mengubah

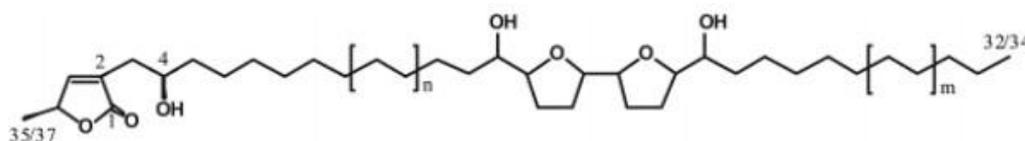
struktur membran sel. Aktifitas flavonoid ini disebabkan oleh adanya gugus hidroksi fenolik dan kemampuannya sebagai pengkelat logam (Yunianto, H.P., et al., 2014).

Aktifitas lain yang terkait dengan adanya antioksidan pada daun sirsak adalah sebagai penurun kadar asam urat. Hiperurisemia atau peningkatan kadar asam urat merupakan penyakit degeneratif yang dapat diredam bila tubuh memiliki penangkap radikal bebas. Isolat aktif yang bersifat antioksidan diduga mengandung empat senyawa dominan, yaitu: 2,3-dihidro-benzofuran; tetradekana; 1,4,4a,5,6,7,8,8a-oktahidroisokuinolin-3-etoksi; dan 4-hidroksi-3,5,6-trimetil-4- (3-oxo-1- butenil)-2-sikloheksena-1-on (Artini et al, 2012).

2.1.5 Kandungan Kimia Daun Sirsak

Kandungan fitokimia yang ditemukan pada daun sirsak (*Annona muricata* L.) diantaranya adalah senyawa fenolik (asam klorogenat, antraquinon, asam sinamat, flavonoid, asam hidrokisinamat, asam galat, hidroquinon, dan tanin) (Coria-Tellez, A.V., et al., 2006), alkaloid (*reticuline*, *anomuricine*, *coclarine* dan *anomurine*) (Leboeuf, M., et al., 1982) dan minyak esensial (β -*caryophyllene*, δ -*cadinene*, *epi- α -cadinol* dan α -*cadinol*) (Kossouh, C., et al., 2007). Kandungan kimia lain pada daun sirsak adalah *acetogenin*, yang terdiri dari *annonamuricins A* dan *B*, *gigantetrocin A*, *annonacin10-one*, *muricatetrocins A* dan *B*, *annonacin*, *goniothalamici*, *muricatocins A* dan *B*, *annonacin A*, (2,4-*trans*)-*isoannonacin*, (2,4-*cis*)- *isoannonacin* *annonamuricin C*, *muricatocin C*,

gigantetronenin, annonutacin, (2,4-trans)-10R-annonacin-A-one, (2,4-cis)-10Rannonacin-A-one (Wu, F. E., et al., 1995), *cis-annonacin, cis-annonacin-10-one, cisgoniothalamycin, arianacin, javoricin* (Zeng L., et al., 1996), *annonuricine, muricapentocin, muricoreacin dan murihexocin C* (Kim, G.S., et al., 1998) , dan *annocatacin A dan B* (Chang, F. R., et al., 2003). Pada penelitian yang dilakukan oleh Gavamukulya, Y., et al., (2014) Kandungan senyawa dalam daun sirsak antara lain steroid/terpenoid, flavonoid, saponin, alkaloid, dan tanin. Senyawa flavonoid berfungsi sebagai antioksidan untuk penyakit kanker, anti mikroba, anti virus, pengatur fotosintetis, dan pengatur tumbuh (Yeni, et al., 2013).



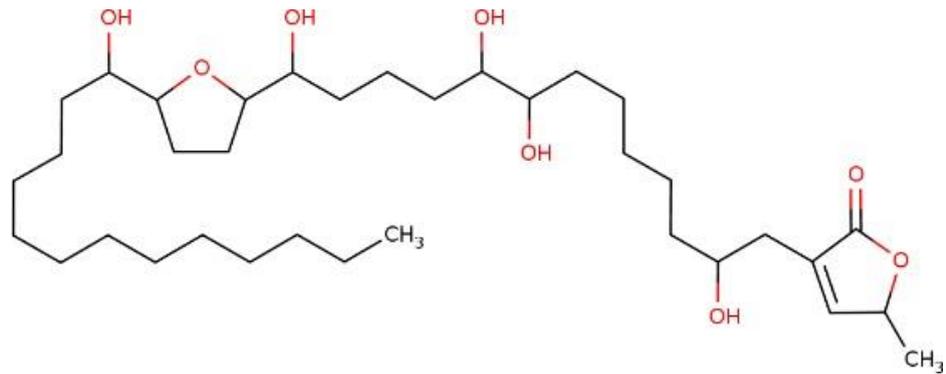
Gambar 2.3 Annonaceous Acetogenins.

(Sumber: (PubChem, 2020)).

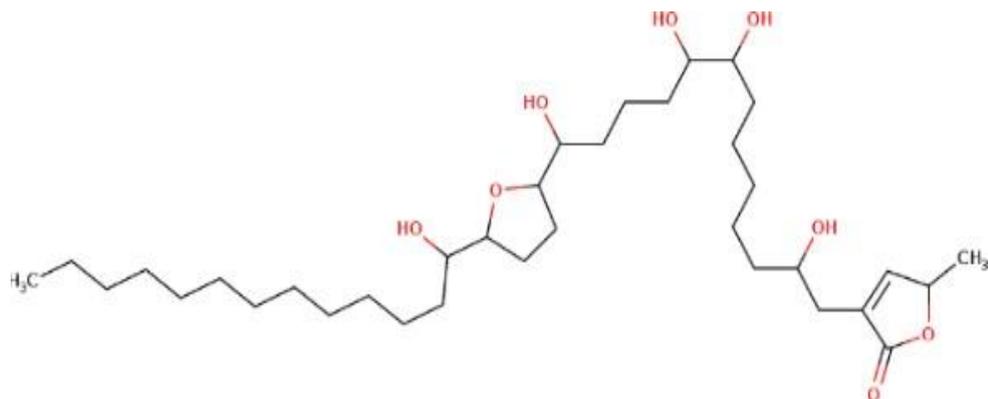
Acetogenin telah dilaporkan menyebabkan *ataksia telangiectasia mutated* (ATM) terkait jalur pensinyalan *checkpoint* kinase 2 (CHK2) menurunkan regulasi yang mengarah ke peningkatan efek sensitisasi kemo dan radio terapi kanker (Meghana et al., 2019). Yiallouris et al., (2018) menyimpulkan menggunakan metode prediksi *in silico* bahwa *acetogenin Annonacin* mempromosikan sitotoksisitas selektif, dalam sel kanker, dimediasi oleh natrium / kalium (NKA) - serta sarkoplasma retikulum (SERCA) jalur bergantung pompa ATPase. Dalam penelitian Wu, *et al*

(1995) *acetogenins annomuricin A, annomuricin B, annomuricin C, annomuricin E, annomutacin, murihexocin A, muriheksosin B, dan muriheksosin C* dievaluasi potensi antikanker dalam silico dibandingkan dengan gefitinib, dan penghambat EGFR digunakan dalam terapi kanker.

Wu, et al (1995) melaporkan aktivitas anti-kanker dari *monotetrahidrofuran* mengandung *Annonacin muricata acetogenins, annomuricin A* dan *annomuricin B*. Sementara *annomuricin A* telah dilaporkan ada di daun dan pericarp tanaman *Annonacin muricata* ditemukan *annomuricin B* hanya di daunnya. Kedua senyawa itu ditemukan terdiri dari lima gugus hidroksil, dengan dua gugus hidroksil menjadi wakil. Ekstrak *Annonacin muricata, fraksi, isolat* dan turunannya dilakukan uji sitotoksitas tujuh hari terhadap garis sel tumor padat manusia, untuk karsinoma paru (A549), karsinoma payudara (MCF-7), dan adenokarsinoma usus besar (HT-29), untuk menentukan perilaku sitotoksik poten mereka. Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa *annomuricins A* dan *B*, serta turunan asetonidnya terbukti ampuh aktivitas antikanker yang setara dengan adriamisin kontrol positif.



Gambar 2.4 Struktur Annonamuricin A
(Sumber: *PubChem*)



Gambar 2.5 Struktur Annonamuricin B
(Sumber: *PubChem*)

2.2 Ekstraksi

2.2.1 Definisi Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan. Sebagian besar ekstrak dibuat dengan mengekstraksi

bahan baku obat (Depkes RI., 2000). Menurut Darwis (2000), ada beberapa metode ekstraksi senyawa organik bahan alam yang umum digunakan.

Ekstraksi adalah proses pemisahan satu atau lebih komponen dari suatu campuran homogen menggunakan pelarut cair (solven) sebagai separating agent. Ekstraksi cair-cair (liquid extraction, solvent extraction): solute dipisahkan dari cairan pembawa (diluen) menggunakan solven cair. Campuran diluen dan solven ini adalah heterogen (immiscible, tidak saling campur), jika dipisahkan terdapat 2 fase yaitu:

- a. Fase diluen (rafinat) = fase residu, berisi diluen dan sisa solut.
- b. Fase solven (ekstrak) = fase yang berisi solut dan solven.

Pemilihan solven menjadi sangat penting, dipilih solven yang memiliki sifat antara lain:

- a. Solut mempunyai kelarutan yang besar dalam solven, tetapi solven sedikit atau tidak melarutkan diluen;
- b. Tidak mudah menguap pada saat ekstraksi;
- c. Mudah dipisahkan dari solut, sehingga dapat dipergunakan kembali;
- d. Tersedia dan tidak mahal (Aditya, 2015).

Ekstraksi padat-cair, yang sering disebut leaching adalah proses pemisahan zat yang dapat melarut (solut) dari suatu campurannya dengan padatan yang tidak dapat larut (innert) dengan menggunakan pelarut cair. Operasi ini sering dijumpai di dalam industri metalurgi dan farmasi, misalnya pada pemisahan biji emas, tembaga dari biji-bijian logam, produk-produk

farmasi dari akar atau daun tumbuhan tertentu. Pada operasi solid-liquid secara umum dibagi menjadi 2 langkah operasi yaitu:

- a. Kontak antara padatan dan pelarut untuk mendapatkan perpindahan solut ke dalam pelarut.
- b. Pemisahan larutan yang terbentuk dari padatan sisa.

Beberapa faktor yang mempengaruhi proses ekstraksi solid-liquid (leaching) antara lain jumlah pelarut, temperatur operasi, ukuran partikel dan waktu kontak. Pemilihan solven menjadi sangat penting, dipilih solven yang memiliki sifat antara lain:

- a. Solut mempunyai kelarutan yang besar dalam solven, tetapi solven sedikit atau tidak Tidak mudah menguap pada saat ekstraksi.
- b. Mudah dipisahkan dari solut, sehingga dapat dipergunakan kembali.
- c. Tersedia dan tidak mahal.
- d. Melarutkan diluen (Sarpriani, 2018)

2.2.2 Metode Ekstraksi

Jenis-jenis ekstraksi bahan alam yang sering digunakan:

a. Ekstraksi Cara Dingin

Metode ini artinya tidak ada proses pemanasan selama proses ekstraksi berlangsung, tujuannya untuk menghindari rusaknya senyawa yang dimaksud rusak karena pemanasan. Jenis ekstraksi dingin adalah maserasi dan perkolasi.

1) Metode Maserasi

Maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana, dengan cara perendaman sampel serbuk simplisia menggunakan pelarut organik pada suhu ruangan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena melalui perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan (Darwis, 2000).

2) Metode Perkolasi

Istilah perkolasi berasal dari bahasa latin per yang artinya melalui dan colare yang artinya merembes. Jadi, perkolasi adalah penyarian dengan mengalirkan cairan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi. Alat yang digunakan untuk mengekstraksi disebut perkolator, dengan ekstrak yang telah dikumpulkan disebut perkolat (Ansel, 1989 dalam Ibtisam 2008). Efektivitas dari proses ini hanya akan lebih besar untuk senyawa organik yang sangat mudah larut dalam pelarut yang digunakan. Keuntungan dari metode ini adalah tidak diperlukannya proses pemisahan ekstrak sampel, sedangkan kerugiannya adalah selama

proses tersebut, pelarut menjadi dingin sehingga tidak melarutkan senyawa dari sampel secara efisien (Darwis, 2000).

Cara perkolasi lebih baik dibandingkan dengan cara maserasi karena:

- a. Aliran cairan penyari menyebabkan adanya pergantian larutan yang terjadi dengan larutan yang konsentrasinya lebih rendah, sehingga meningkatkan derajat perbedaan konsentrasi.
- b. Ruang antara butir-butir serbuk simplisia membentuk saluran tempat mengalir cairan penyari. Karena kecilnya saluran kapiler tersebut, maka kecepatan pelarut cukup untuk mengurangi lapisan batas, sehingga dapat meningkatkan perbedaan konsentrasi (Sarpriani, 2018).

b. Ekstraksi Cara Panas

Metode ini pastinya melibatkan panas dalam prosesnya. Dengan adanya panas secara otomatis akan mempercepat proses penyarian dibandingkan cara dingin. Metodenya adalah refluks, ekstraksi dengan alat soxhlet dan infusa.

1) Metode Refluks

Reflux merupakan metode ekstraksi cara panas (membutuhkan pemanasan pada prosesnya), secara umum pengertian refluks sendiri adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Ekstraksi dengan cara ini pada dasarnya adalah ekstraksi berkesinambungan. Metode ini umumnya

digunakan untuk mensintesis senyawa-senyawa yang mudah menguap atau volatile. Pada kondisi ini jika dilakukan pemanasan biasa maka pelarut akan menguap sebelum reaksi berjalan sampai selesai. Prinsip dari metode refluks adalah pelarut volatil yang digunakan akan menguap pada suhu tinggi, namun akan didinginkan dengan kondensor sehingga pelarut yang tadinya dalam bentuk uap akan mengembun pada kondensor dan turun lagi ke dalam wadah reaksi sehingga pelarut akan tetap ada selama reaksi berlangsung (Ditjen POM, 2000)

2) Metode Soklet

Sokletasi merupakan proses ekstraksi yang menggunakan penyarian berulang dan pemanasan. Penggunaan metode sokletasi adalah dengan cara memanaskan pelarut hingga membentuk uap dan membasahi sampel. Pelarut yang sudah membasahi sampel kemudian akan turun menuju labu pemanasan dan kembali menjadi uap untuk membasahi sampel, sehingga penggunaan pelarut dapat dihemat karena terjadi sirkulasi pelarut yang selalu membasahi sampel. Proses ini sangat baik untuk senyawa yang tidak terpengaruh oleh panas (Ditjen POM, 2000).

3) Destilasi Uap

Proses destilasi uap banyak digunakan untuk senyawa organik yang tahan pada suhu cukup tinggi, yaitu yang lebih tinggi dari titik

didih pelarut yang digunakan. Pada umumnya lebih banyak digunakan untuk minyak atsiri (Darwis, 2000).

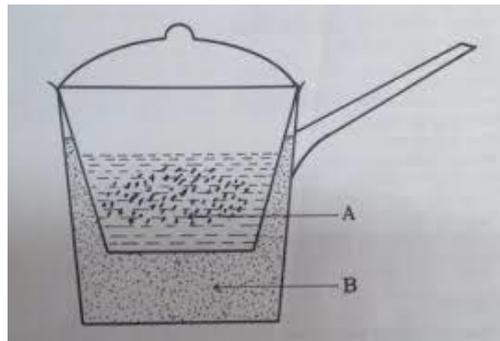
4) Metode Infusa

Merupakan metode penyarian dengan cara menyari simplisia dalam air pada suhu 90°C selama 15 menit. Infundasi merupakan penyarian yang umum dilakukan untuk menyari zat kandungan aktif yang larut dalam air dari bahan-bahan nabati. Penyarian dengan metode ini menghasilkan sari/ekstrak yang tidak stabil dan mudah tercemar oleh kuman dan kapang. Oleh sebab itu, sari yang diperoleh dengan cara ini tidak boleh disimpan lebih dari 24 jam (Ansel, 2005).

Infus/ rebusan obat yang mana ekstraksinya dilakukan secara infundasi. Penyarian adalah peristiwa memindahkan zat aktif yang semula di dalam sel ditarik oleh cairan penyanyi sehingga zat aktif larut dalam cairan penyari. Secara umum penyarian akan bertambah baik apabila permukaan simplisia yang bersentuhan semakin luas (Ansel, 2005).

Keuntungan dari penggunaan metode infundasi adalah unit alat yang dipakai sangat sederhana sehingga biaya operasional yang diperlukan relatif rendah. Sedangkan kerugian dari metode ini adalah zat-zat yang tertarik kemungkinan sebagian akan mengendap kembali apabila kelarutannya sudah mendingin (lewat jenuh), hilangnya zat-zat atsiri, dan tidak cocok untuk mengekstraksi senyawa/ simplisia yang tidak tahan panas, disamping itu simplisia

yang mengandung zat-zat albumin tentunya zat ini akan menggumpal dan menyukarkan penarikan zat-zat berkhasiat tersebut (Ansel, 2005)



2.6 Gambar Infundasi

A = Panci bahan dan aquadest
 B = Tangas air
 Dengan kedudukan demikian panci yang berisi bahan tidak langsung berhubungan dengan api (Sumber: Arief, 2019)

2.2.3 Mekanisme Ekstraksi

Zat aktif yang terkandung dalam tanaman maupun hewan lebih larut dalam pelarut organik. Proses terekstraksinya zat aktif dalam tanaman adalah pelarut organik akan menembus ke dalam dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan terlarut sehingga terjadi perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif didalam sel dan pelarut organik diluar sel. Maka larutan terpekat akan berdifusi ke luar sel, dan proses ini akan berulang terus sampai terjadi (Syam, 2016).

2.3 Hewan Uji Mencit

2.3.1 Morfologi dan Fisiologi Mencit

Mencit (*Mus musculus* L.) merupakan hewan pengerat yang memiliki rambut berwarna ke abu-abuan atau putih, mata berwarna merah atau hitam, kulit berpigmen dan perut sedikit pucat. Mencit dewasa pada umur 35 hari

dan memiliki kehamilan 19-21 hari. Mencit dapat melahirkan 6-15 ekor. Mencit jantan dan betina siap melakukan kopulasi pada umur 8 minggu. Siklus estrus atau masa birahi 4-5 hari dengan lama estrus 12-14 jam. Fase estrus dimulai antara pukul 16.00-22.00 WIB. Proses persetubuhan mencit jantan dan betina untuk tujuan fertilisasi atau disebut dengan kopulasi terjadi pada saat estrus, dengan fertilisasi 2 jam setelah kopulasi. Ciri-ciri terjadinya kopulasi adalah ditemukannya sumbat vagina, yaitu cairan mani jantan yang menggumpal. Mencit merupakan hewan percobaan yang efisien karena mudah dipelihara, tidak memerlukan tempat yang luas, waktu kehamilan yang singkat, dan banyak memiliki anak perkelahiran. Mencit dan tikus putih memiliki banyak data toksikologi, sehingga mempermudah membandingkan toksisitas zat-zat kimia (Etika, 2016).

2.3.2 Taksonomi dan Morfologi

Pada hewan mencit (taksonomi) diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom : *Animalia*

Filum : *Chordata*

Subfilum : *Vertebrata*

Kelas : *Mamalia*

Bangsa : *Rodentia*

Suku : *Muridae*

Genus : *Mus*

Spesies : *Mus musculus L.*

(Sumber: (Tetebano, R., 2011)).



Gambar 2.6 mencit (*Mus Muculus L.*)
(Sumber : (Tetebano, R., 2011))

2.3.3 Perkembangan Fetus Mencit

Menurut (Roberts, 1971) dan (Lu, F.C., 1995) masa kehamilan mencit terdiri dari 3 tahap, yaitu:

a Tahap *Blastula*

Tahap ini dimulai setelah ovulasi dan dilanjutkan dengan perkembangan membran zigot primitif di uterus. Pada tahap ini, fetus tidak rentan terhadap senyawa teratogen, tetapi senyawa teratogen akan menyebabkan kematian fetus akibat matinya sebagian sel fetus.

b Tahap *Organogenesis*

Tahap *organogenesis* merupakan tahap pembentukan organ-organ dan sistem tubuh serta perubahan bentuk tubuh yang terjadi pada hari ke 6 sampai hari ke 16 kehamilan. Pada periode ini sel secara intensif mengalami diferensiasi, spesialisasi, dan organisasi sehingga fetus sangat rentan terhadap senyawa teratogen

c. Tahap Pertumbuhan Fetus

Tahap ini merupakan tahap terjadinya perkembangan dan pematangan fungsi jaringan, organ dan sistem yang tumbuh. Sehingga selama tahap ini, senyawa teratogen tidak akan menyebabkan cacat morfologi, tetapi dapat mengakibatkan kelainan fungsi seperti gangguan Sistem Syaraf Pusat (SSP) yang mungkin tidak dapat dideteksi segera setelah kelahiran.

Tabel 2.5 Perkembangan fetus pada Rodentia

Waktu (Hari)	Tingkatan yang terjadi
1	Stadium pembelahan sel di dalam oviduk
2	Terbentuk morula 16 sel
3	Fetus masuk ke dalam uterus dan membentuk blastula
4 – 6	Blastomer terimplantasi dan terjadi gastrulasi
6 – 11	Organogenesis
12 – 16	Pembentukan somit belakang, mata, dan osifikasi awal dari skeleton
16 – 20	Perkembangan fetus
20 – 21	Kelahiran

(Sumber: (Hafez, E.S.E., 1970))

2.4 Uji Toksisitas

2.4.1 Definisi Uji Toksisitas

Uji toksisitas adalah suatu uji untuk mendeteksi efek toksik suatu zat pada sistem biologi dan untuk memperoleh data dosis respon yang khas dari sediaan uji. Hasil uji toksisitas tidak dapat digunakan secara mutlak untuk membuktikan keamanan suatu bahan sediaan pada manusia, namun dapat memberikan petunjuk adanya toksisitas relatif dan membantu identifikasi efek toksik bila terjadi pemaparan pada manusia (Anonim, 2014)

Toksisitas menunjukkan keadaan efek samping dengan adanya interaksi antara racun dan sel. Interaksi ini dapat bervariasi, tergantung pada sifat kimia dari racun dan membran sel, karena dapat terjadi pada permukaan sel, dalam

sel tubuh, atau jaringan di bawahnya. Efek racun dapat terjadi sebelum pengikatan racun ke organ vital seperti hati. Maka dari itu, evaluasi sifat beracun zat ini sangat penting dilakukan pada saat mempertimbangkan perlindungan kesehatan masyarakat, karena paparan bahan kimia dapat berbahaya dan menyebabkan efek buruk pada manusia (Jothy, *et al.*, 2011)

2.4.2 Macam-macam Uji Toksisitas

a. Uji Toksisitas (Subkronis)

Uji ketoksikan subkronis atau bisa disebut juga dengan uji ketoksikan subakut. Uji ini merupakan uji ketoksikan suatu senyawa yang diberikan dengan dosis berulang pada hewan uji tertentu, selama kurang lebih 3 bulan. Uji toksisitas subkronis ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui dan mengungkapkan spektrum efek toksik senyawa yang diuji dan untuk memperlihatkan apakah spektrum efek toksik senyawa uji tersebut berkaitan dengan dosis yang telah ditentukan (Donatus, I. A., 2001).

Dosis yang telah ditetapkan dan diberikan pada hewan uji terdiri dari beberapa peringkat dosis. Setiap kelompok perlakuan harus menerima dosis toksik yang dapat membunuh beberapa hewan uji atau memperlihatkan gejala-gejala toksik yang nyata. Sedangkan kelompok lainnya harus menerima takaran dosis yang sama sekali tidak menimbulkan efek atau gejala toksik. Dosis yang diberikan pada hewan uji sekali sehari selama kurun waktu uji ketoksikan subkronis

berlangsung, melalui jalur pemberian sesuai dengan yang biasanya digunakan oleh manusia (Donatus, I. A., 2001).

Pengamatan dan pemeriksaan yang dilakukan dalam uji ketoksikan subkronis meliputi:

- 1) Perubahan berat badan yang diperiksa paling tidak 7 hari sekali
- 2) Asupan makan untuk masing-masing hewan atau kelompok hewan diukur paling tidak 7 hari sekali.
- 3) Gejala klinis umum diamati setiap hari.
- 4) Pemeriksaan hematologi paling tidak diperiksa dua kali, pada awal dan pada akhir uji coba.
- 5) Pemeriksaan kimia darah, diperiksa pada awal dan akhir uji coba.
- 6) Analisis urin paling tidak sekali.
- 7) Pemeriksaan histopatologi pada akhir uji coba (Donatus, I. A., 2001).

Hasil uji ketoksikan subkronis akan memberi informasi yang bermanfaat tentang efek toksik utama senyawa uji dan organ-organ yang dipengaruhinya. Selain itu, juga memberikan informasi tentang perkembangan efek toksik yang lambat berkaitan dengan jumlah dosis yang tidak teramati pada uji ketoksikan akut, kekerabatan antar kadar senyawa dalam darah dan jaringan terhadap perkembangan luka toksik dan keterbalikan (reversibilitas) efek toksik. Selanjutnya hasil yang diperoleh dari uji ketoksikan subkronis dapat digunakan untuk merancang uji ketoksikan kronis (Donatus, I. A., 2001).

b. Uji Toksisitas (Kronik)

Uji toksisitas kronik yang dilakukan dengan memberikan zat kimia secara berulang-ulang selama 3-6 bulan atau seumur hidup hewan, misalnya 18 bulan untuk mencit, 24 bulan untuk tikus, dan 7-10 tahun untuk anjing dan monyet. Memperpanjang percobaan kronis lebih dari 6 bulan tidak akan bermanfaat, kecuali untuk percobaan karsinogenik (Gupta, et al., 2012).

c. Uji Toksisitas (Akut)

Uji toksisitas akut yang dilakukan dengan memberikan zat kimia yang sedang diuji sebanyak satu kali, dalam jangka waktu 24 jam. Uji toksisitas akut merupakan uji dimana dosis tunggal zat aktif yang diberikan pada hewan percobaan untuk menentukan LD₅₀ (dosis yang menyebabkan kematian 50% dari kelompok hewan percobaan). Hal ini merupakan langkah awal untuk penilaian dan uji evaluasi sifat toksik dari suatu zat kimia dan juga merupakan pemeriksaan awal yang dilakukan (Gupta, et al., 2012).

Faktor yang perlu diperhatikan dalam penentuan nilai LD₅₀ yaitu, pengacakan hewan percobaan, selisih bobot antar hewan, pengosongan lambung (puasa), dan ketersediaan air. Selain itu juga penentuan dosis awal percobaan untuk meminimalkan hewan yang mati, sehingga mengurangi jumlah hewan yang digunakan dalam percobaan. Metode

ini juga meningkatkan presisi dari nilai LD₅₀. Hasil ekstrak dikatakan sitotoksik jika nilai LD₅₀ <100µg/mL (Gupta, et al., 2012).

Jika tidak terdapat hewan uji yang memberikan efek toksik, maka dilakukan pengamatan gejala klinik meliputi gerakan (tremor, konvulsi, paralisis, bringas (aktif), pasif), perubahan tingkah laku (perubahan sikap atau aneh seperti lompat dan berputar berlebihan atau menggeliat, penjilatan, pencakaran, vokalisasi luar biasa, gelisah, lakrimasi, salivasi), pernapasan (bradipnea dan takipnea), vasodilatasi (merah pada ekor dan telapak kaki), perubahan warna kulit dan bulu, kerontokan bulu, saluran cerna (diare dan sembelit) dilakukan selama 14 hari setelah perlakuan pemberian infusa. Penimbangan berat badan dilakukan pada hari ke-0 (sebelum perlakuan) dan hari ke-14 (setelah perlakuan) (Hutapea, 2003).

2.4.3 Faktor Utama Yang Mempengaruhi Toksisitas

Jalur masuk ke dalam tubuh suatu polutan yang toksik, umumnya dapat melalui saluran pencernaan makanan, saluran pernafasan, kulit, dan jalur lainnya. Jalur lain diantaranya adalah intra muskuler, intra dermal, dan sub kutan. Jalan masuk yang berbeda ini akan mempengaruhi toksisitas bahan polutan. Bahan paparan yang berasal dari industri biasanya masuk ke dalam tubuh melalui kulit dan terhirup, sedangkan kejadian “keracunan” biasanya melalui proses tertelan (Priyanto, 2010). Jangka waktu dan frekuensi paparan dari berbagai macam toksisitas yaitu:

- a Akut : perlakuan diberikan selama kurang dari 24 jam

- b. Sub akut : perlakuan berulang terhadap suatu ekstrak untuk jangka waktu 1 bulan atau kurang
- c. Subkronik : perlakuan berulang terhadap suatu ekstrak untuk jangka waktu 3 bulan
- d. Kronik : perlakuan berulang terhadap bahan kimia untuk jangka waktu lebih dari 3 bulan (Priyanto, 2010).

2.4.4 Mekanisme Efek Toksik

Efek toksik yang ditimbulkan oleh suatu zat sangat bervariasi, tergantung dari zat, target organ, mekanisme aksi, dan besarnya dosis. Semua efek toksik yang terjadi dimulai adanya interaksi biokimiawi antara zat toksik atau metabolit aktifnya dengan bagian tertentu (enzim, asam nukleat, membran sel) dari makhluk hidup atau reseptornya. Perubahan yang terjadi pada reseptor merupakan stimulus yang dapat berupa positif atau negatif (Priyanto, 2010).

Zat kimia yang masuk kedalam tubuh dapat menimbulkan efek toksik melalui 2 cara, yakni:

- a. Berinteraksi secara langsung (toksik intraseluler) yaitu toksisitas yang diawali dengan interaksi langsung antara zat kimia atau metabolit dengan reseptornya.
- b. Berinteraksi secara tidak langsung (toksik ekstraseluler) yaitu toksisitas mempengaruhi lingkungan sel sasaran tetapi dapat berpengaruh pada sel sasaran.

2.4.5 *Lethal Doses 50*

Lethal Doses 50 adalah suatu besaran yang diturunkan secara statistik, guna menyatakan dosis tunggal sesuatu senyawa yang diperkirakan dapat mematikan atau menimbulkan efek toksik yang berarti pada 50% hewan coba setelah perlakuan. LD₅₀ merupakan tolak ukur kuantitatif yang sering digunakan untuk menyatakan kisaran dosis letal (Loomis TA, 1987).

Ada beberapa pendapat yang menyatakan tidak setuju, bahwa LD₅₀ masih dapat digunakan untuk uji toksisitas akut. Namun ada juga beberapa kalangan yang masih setuju, dengan pertimbangan:

- a. Jika dilakukan dengan baik, uji toksisitas akut tidak hanya mengukur LD₅₀, tetapi juga memberikan informasi tentang waktu kematian, penyebab kematian, gejala – gejala sebelum kematian, organ yang terkena efek, dan kemampuan pemulihan dari efek nonlethal (Loomis TA, 1987).
- b. Hasil dari penelitian dapat digunakan untuk pertimbangan pemilihan design penelitian subakut (Loomis TA, 1987).
- c. Tes LD₅₀ tidak membutuhkan banyak waktu (Loomis TA, 1987).
- d. Hasil tes ini dapat langsung digunakan sebagai perkiraan risiko suatu senyawa terhadap konsumen atau pasien (Loomis TA, 1987).

Nilai hasil LD₅₀ yang harus dilaporkan selain jumlah hewan yang mati, juga harus disebutkan durasi pada pengamatan. Bila pengamatan dilakukan dalam waktu 24 jam setelah perlakuan, maka hasilnya tertulis “LD₅₀ 24 jam”. Namun seiring perkembangan, hal ini sudah tidak diperhatikan lagi, karena

pada umumnya tes LD₅₀ dilakukan dalam waktu 24 jam pertama sehingga penulisan hasil tes “LD₅₀” saja sudah cukup untuk mewakili tes LD₅₀ yang diamati dalam 24 jam. Bila dibutuhkan, tes ini dapat dilakukan lebih dari 14 hari (Loomis TA, 1987).

Ada beberapa hal yang dapat mempengaruhi nilai LD₅₀ antara lain spesies, strain, jenis kelamin, umur, berat badan, gender, kesehatan nutrisi, dan isi perut hewan coba. Teknis pemberian juga mempengaruhi hasil, antara lain waktu pemberian, suhu lingkungan, kelembaban, sirkulasi udara. Tidak luput kesalahan manusia juga dapat mempengaruhi hasil ini. Sehingga sebelum melakukan penelitian, ada baiknya kita memperhatikan faktor – faktor yang mempengaruhi hasil ini (Hodgson and Ernest, 2000). Terdapat metode yang digunakan untuk menghitung nilai LD₅₀, salah satunya metode Thomson and Weil.

a. Metode Thomson and Weil

Metode ini merupakan metode yang banyak dipergunakan karena tidak memerlukan hewan percobaan yang terlalu banyak dan mempunyai tingkat kepercayaan atau “confidence level” yang cukup tinggi. Perhitungan nilai LD₅₀ menggunakan metode Thomson dan Weil. Tabel perhitungan Thomson dan Weil digunakan untuk menentukan nilai LD₅₀ (Priyanto, 2010). Nilai LD₅₀ dihitung dengan persamaan sebagai berikut:

Tabel 2.4 Golongan Potensi Ketoksikan pada nilai LD₅₀ Berdasarkan Cara Thomson dan Weil

No	Kelas	LD₅₀ (mg/KgBB)
1	Luar biasa toksik	1 atau kurang
2	Sangat toksik	1 – 50
3	Cukup toksik	50 – 500
4	Sedikit toksik	500 – 5000
5	Praktis tidak toksik	5000 – 15000
6	Relatif kurang berbahaya	Lebih dari 15000

(Sumber : (Loomis TA, 1987))

Secara umum, semakin kecil nilai LD₅₀, semakin toksik senyawa tersebut. Begitu pula sebaliknya, semakin besar nilai LD₅₀, semakin rendah toksisitasnya. Hasil yang diperoleh (dalam mg/kgBB) dapat digolongkan menurut potensi ketoksikan akut senyawa uji menjadi beberapa kelas, seperti yang terlihat pada tabel berikut (Loomis TA, 1987).

Dalam mencari harga LD₅₀ diperlukan ketepatan atau jika dilihat dari taraf kepercayaan tertentu, harga tersebut hanya sedikit sekali bergeser dari harga sebenarnya, atau berada pada rentang atau interval yang sempit. Untuk mencapai tujuan, digunakan tabel yang dibuat oleh Thompson dan Weil. Menurut (Priyanto, 2009) Pada penggunaan tabel, percobaan harus memenuhi beberapa syarat berikut:

- a. Jumlah hewan uji tiap kelompok peringkat dosis sama
- b. Interval merupakan kelipatan (d) tetap.
- c. Jumlah kelompok paling tidak 4 peringkat dosis.

Rumus :

$$\text{Log } m = \text{log } D + d (f + 1)$$

Keterangan :

m = nilai LD50

D = Dosis terkecil yang digunakan

d = log dari kelipatan dosis

f = suatu nilai dalam tabel *Weil*, karena angka kematian tertentu (r)

2.5 Landasan Teori

Obat adalah suatu bahan yang berasal dari tumbuhan, hewan, mineral maupun zat kimia tertentu yang dapat digunakan untuk mencegah, mengurangi rasa sakit, memperlambat proses penyakit dan atau menyembuhkan penyakit. Obat tradisional kebanyakan berupa campuran yang berasal dari tumbuh-tumbuhan sehingga dikenal dengan obat herbal atau obat bahan alam Indonesia. Obat Herbal atau Obat Bahan Alam Indonesia adalah obat tradisional yang diproduksi oleh Indonesia dan berasal dari alam atau produk tumbuhan obat Indonesia (I Made, 2016)

Menurut penelitian Syahida, M., *et al.*, (2012) salah satu bahan alam yang berkhasiat sebagai obat herbal atau obat tradisional yaitu tanaman sirsak (*Annona muricata* L.) yang juga mengandung antioksidan tinggi. Menurut Adjie, S., (2011) terdapat bagian-bagian dari tanaman sirsak (*Annona muricata* L.) yang dapat dimanfaatkan sebagai obat, mulai dari daun, batang, akar, buah dan biji. Menurut penelitian Mardiana L., (2015) kandungan senyawa yang terdapat pada daun sirsak antara lain *annonaceous acetogenin*, steroid/terpenoid, saponin, flavonoid, kumarin, alkaloid, dan tanin. Senyawa flavonoid berfungsi sebagai antioksidan untuk penyakit kanker, anti mikroba, dan anti virus.

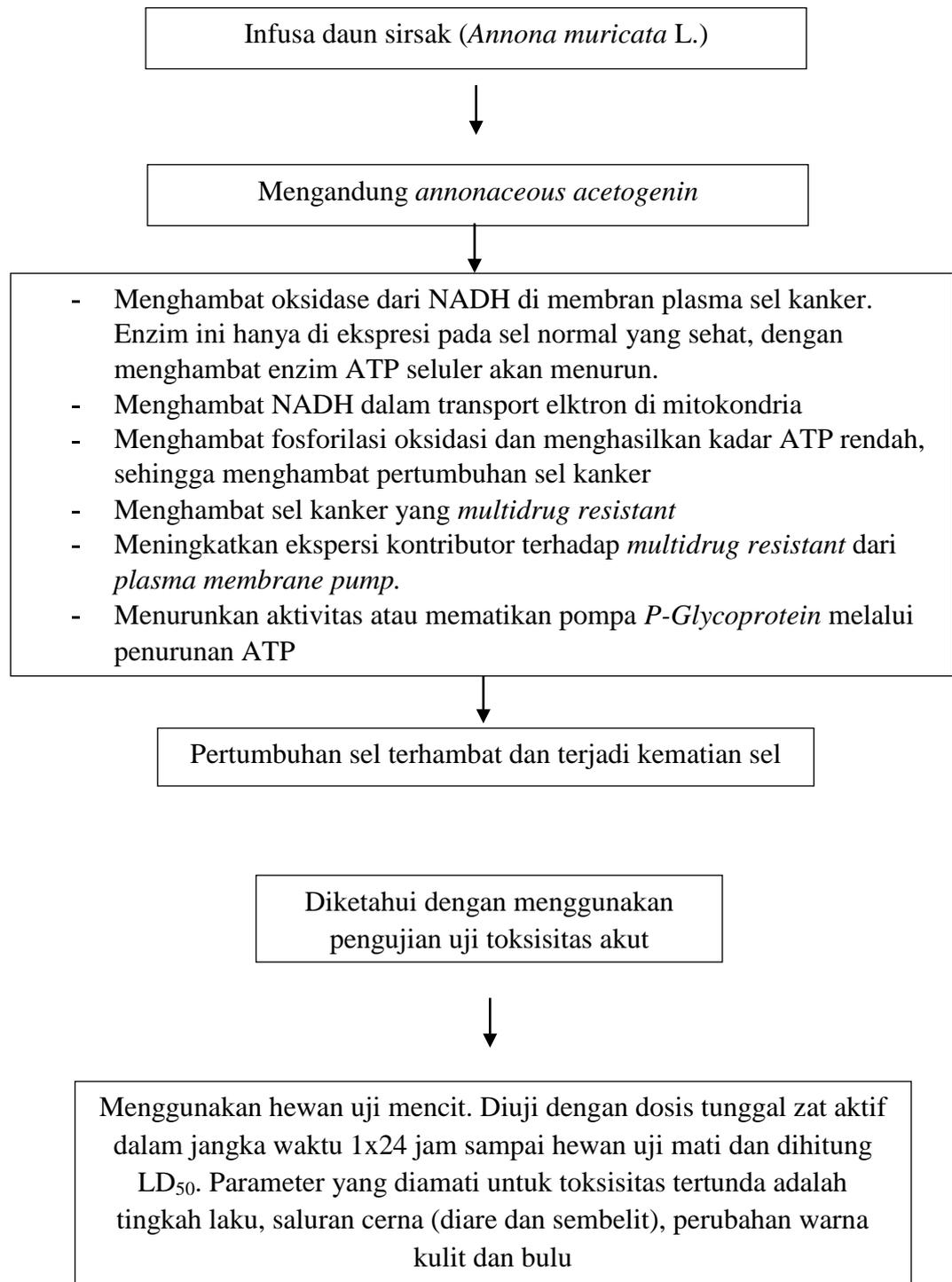
Annonaceous acetogenin ini merupakan senyawa yang memiliki potensi sitotoksik. *Annonaceous acetogenin* merupakan senyawa turunan dari asam lemak rantai panjang. Aktivitas biologi dari *acetogenin* menunjukkan sifat toksisitas terhadap sel kanker dan menghambat aktivitas mitokondria kompleks 1 (Suryawinata and Sukohar, 2016). Senyawa-senyawa aktif tersebut ditemukan di dalam daun sirsak yang ternyata bisa bersifat toksik. Oleh karena itu perlu dilakukan uji toksisitas untuk mengetahui efek toksik dan ambang batas penggunaan suatu tumbuhan sebagai obat. Toksisitas adalah tingkat rusaknya suatu zat jika dipaparkan terhadap organisme.

Menurut penelitian Utomo., *et al.*, (2016) telah dilakukan uji toksisitas akut infusa daun sirsak degan hewan uji mencit pada hati dan ginjal. Dosis infusa yang diberikan yaitu 2000 mg/kgBB, 1000 mg/kgBB, dan 500 mg/kgBB. Pada dosis ini tidak terjadi kematian pada hewan uji mencit tersebut. Setelah itu dilakukan pemeriksaan hispatologi ginjal tidak ditemukan adanya degenerasi dan nekrosis glomelorus, tubulus dan intersititium, baik pada kelompok kontrol maupun perlakuan. Begitu pula pada pemeriksaan hispatologi hati, yang juga tidak terdapat degenerasi dan nekrosis. Hasil dari penelitian ini menunjukkan infusa daun sirsak (*Annona muricata* L.) pada dosis 2000 mg/kgBB, 1000 mg/kgBB, dan 500 mg/kgBB merupakan bahan yang praktis tidak beracun pada pemberian dosis oral tunggal. Hasil ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Arthur, *et al.*, (2011) yang menyatakan bahwa penelitian ilmiah daun sirsak yang telah dilaporkan yaitu ekstrak air daun sirsak mempunyai poensi ketoksikan akut pada mencit dengan letal dosis lebih dari 5000 mg/kgBB.

Menurut penelitian Handayani, *et al.*, (2015) memberikan hasil bahwa pada dosis tinggi infusa daun sirsak yang menyebabkan nekrosis sel hati akibat mekanisme yang menghambat efek acetogenin mtikondria *complex 1* pada hepatosit. Pada hasil penelitian Arthur, *et al.*, (2011) dosis tinggi yang digunakan untuk mencapai efek toksik dari senyawa *acetogenin* infusa daun sirsak (*Annona muricata* L.) pada hewan uji mencit yaitu lebih dari 5000 mg/kgBB secara oral.



2.6 Kerangka Konsep



2.7 Hipotesis

- a. Infusa daun sirsak (*Annona muricata* L.) mampu memberikan efek toksik pada hewan uji mencit (*Mus musculus*).
- b. Nilai LD₅₀ infusa daun sirsak (*Annona muricata* L.) masuk dalam kategori toksik pada hewan uji mencit (*Mus musculus*).