

LAPORAN TEKNIS 2015

22/AIR 4/OT 02 02/01/2016

**DATA KARAKTERISTIK FISIKO-KIMIA
BIOMATERIAL BERBASIS BAHAN LOKAL**

Darmawan Darwis, Basril Abbas, Erizal, Nikham, Ermin Katrin H.,
Paramita Pandansari, Tantin R.D., Yessy Warastuti, Taty Erlinda,
Dien Puji Rahayu, R Setyo Adji, Nani Suryani, Dewi Sekar
Pangerteni, Sri Susilawati



**PUSAT APLIKASI ISOTOP DAN RADIASI
BADAN TENAGA NUKLIR NASIONAL
2016**

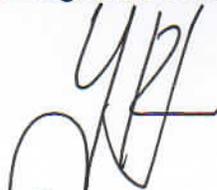
22/AIR 4/OT 02 02/01/2016

**DATA KARAKTERISTIK FISIKO-KIMIA
BIOMATERIAL BERBASIS BAHAN LOKAL**

Darmawan Darwis, Basril Abbas, Erizal, Nikham, Ermin Katrin
H., Paramita Pandansari, Tantin R.D., Yessy Warastuti, Taty Erlinda,
Dien Puji Rahayu, R Setyo Adji, Nani Suryani, Dewi Sekar
Pangerteni, Sri Susilawati

Mengetahui/Menyetujui

Kepala Bidang Proses Radiasi



Dr. Darmawan
NIP. 1910108 198803 1 002

Kepala Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi



Dr. Hendig Winarno, M.Sc
NIP. 19600524 198801 1 001

ABSTRAK

DATA KARAKTERISTIK FISIKO-KIMIA BIOMATERIAL BERBASIS BAHAN LOKAL. Telah dilakukan karakterisasi sifat fisiko-kimia bahan biomaterial seperti kitosan, HA, kolagen dan kompositnya sebagai perancah tulang (scaffold) dengan teknik radiasi gamma serta aplikasi dosis pasturisasi sinar gamma pada simplisia ekstrak daun sirsak. Komposit kitosan-kolagen-hidroksiapatit (HA) untuk aplikasi sebagai perancah (scaffold) diiradiasi dengan sinar gamma pada dosis 15 dan 25 kGy. Beberapa parameter fisiko-kimia seperti konfirmasi gugus fungsi dengan FTIR, struktur permukaan dan pori dengan SEM, sifat termal dengan DTG serta uji pra klinis simplisia ekstrak daun sirsak dengan mencit telah dilakukan. Karakteristika analisis scaffold dengan Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) menunjukkan terbentuknya ikatan hidrogen antara matriks polimer organik (kitosan dan kolagen) dan senyawa mineral (HA). Gambaran SEM dari scaffold komposit terlihat pori yang saling terhubung (interconnecting pore). Scaffold tanpa gelasi terlihat berserat, sedangkan yang digelasi menunjukkan permukaan rata. Konsentrasi natrium bikarbonat yang tinggi menghasilkan pori yang semakin besar yang ditandai oleh serapan air yang semakin tinggi. Gelasi dapat menurunkan kemampuan menyerap air dari komposit scaffold. Analisis Differential Thermal Gravimetri (DTG) dari komposit menunjukkan bahwa bahan tersebut stabil sampai 200 °C, dekomposisi senyawa organik terjadi pada suhu 284 °C. Scaffold yang diiradiasi dapat terdegradasi. Selain itu telah diperoleh data riset hasil pasteurisasi radiasi pada dosis 5 dan 10 kGy terhadap simplisia daun sirsak (*Annona muricata* L.). Simplisia diestraksi dengan etanol 96 % untuk diuji sebagai antikanker, serta uji praklinis untuk mengetahui aktivitas antiinflamasi, antidiabetes, imunomodulator, dan toksisitas akut. Hasilnya menunjukkan bahwa rendemen ekstrak daun sirsak tanpa iradiasi 33,59 %, yang diiradiasi 5 kGy 21,91 %, dan 10 kGy 31 %. Hasil uji mikrobiologi terhadap simplisia yang diiradiasi 10 kGy dapat menurunkan angka kuman sebesar 5 desimal dan angka kapang sebesar 4 desimal. Simplisia tidak terdeteksi cemaran bakteri *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Staphylococcus aureus*. Hasil lainnya menunjukkan bahwa perlakuan iradiasi simplisia daun sirsak pada dosis 10 kGy tidak menurunkan khasiatnya sebagai antikanker, antiinflamasi, antidiabetes, imunomodulator, dan tidak toksik melalui uji toksisitas akut pada mencit.

PENDAHULUAN

Di Indonesia, kebutuhan bahan biomaterial untuk keperluan klinis dibidang periodontal, ortopedi dan optalmologi terus meningkat dalam beberapa tahun terakhir. Hingga saat ini produk-produk tersebut merupakan produk import dengan harga yang mahal. Sejak tahun 1986, Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi-Badan Tenaga Nuklir nasional (PAIR-BATAN) telah melakukan kegiatan penelitian dan pengembangan untuk menghasilkan produk biomaterial dengan memanfaatkan teknik radiasi pengion. Hingga saat ini beberapa produk

seperti amnion steril radiasi sebagai pembalut luka telah digunakan di beberapa rumah sakit. Beberapa bahan baku lokal seperti tulang manusia, tulang sapi, membran perikardium, sisik ikan, dan selulosa alam merupakan bahan potensial yang dapat diproses dengan teknologi radiasi untuk menghasilkan produk biomaterial seperti graft tulang, tulang sintesis hidroksi apatit, membran kitosan dan selulose sebagai scaffold untuk aplikasi dibidang klinis. Penggunaan bahan ini diharapkan akan menghasilkan produk biomaterial dengan kualitas baik dan harga terjangkau sehingga dapat menggantikan substitusi impor. Prosedur pengisian defek tulang dari autograf dan alograf telah lama dikembangkan oleh beberapa peneliti terdahulu [1]. Walaupun autograf merupakan bahan pengganti tulang yang terbaik, namun memiliki kelemahan seperti adanya defek yang terjadi pada posisi pengambilan tulang dari resipien itu sendiri sehingga rasa sakit, pengeluaran darah saat operasi yang banyak, dan biaya rumah sakit makin meningkat. Begitu juga penggunaan alograf, kelemahannya terletak pada keterbatasan dalam mendapatkan donor dan juga pemindahan penyakit dari donor ke resipien telah menjadi bahan pertimbangan dalam penggunaannya. Penelitian dan pengembangan graf komposit yang ideal merupakan tantangan besar untuk menemukan kendaraan scaffold yang optimal. Scaffold yang dimaksud dapat memberikan tempat bagi factor pertumbuhan sel osteogenik dan osteoinduktif pada hostnya. Untuk itu diperlukan struktur tiga dimensi (3D) yang bertindak sebagai matriks osteokonduktif untuk pembentukan sel tulang. Komposit yang berbentuk scaffold tersebut harus biokompatibel untuk meminimalkan gangguan induksi tulang dari reaksi inflamasi, harus biodegradable untuk meminimalkan efek dari sisa pembawa pada biomekanik, namun harus bertahan cukup lama untuk mempertahankan elemen bioaktif pada tempat implantasi [2].

Hidroksiapatit (HA) merupakan salah satu bahan anorganik penyusun tulang terbesar pada jaringan manusia dan hewan, bersifat bioaktif, biokompatibel, dan biodegradabel. Sumber dari HA di alam sangatlah berlimpah, diantaranya seperti dari tulang sapi, tulang ikan, sisik ikan, dan cangkang telur [3-6]. Hidroksiapatit $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ telah diakui sebagai bahan cangkang tulang untuk aplikasi medis dan gigi karena komposisi kimianya yang mirip dengan tulang alami.

Umumnya, bahan substitusi tulang seperti autograf, alograf dan xenograf digunakan untuk memecahkan masalah yang berkaitan dengan trauma dan patah tulang. Masalahnya adalah, tak satu pun dari bahan-bahan tersebut memberikan hasil yang sempurna sebagai penggantian tulang karena ketidakstabilan mekanis dan biologis serta ketidakcocokan. Saat

ini banyak dikembangkan kalsium fosfat bio keramik seperti kalsium fosfat, tri-kalsium fosfat dan HA sebagai bahan substitusi tulang yang cocok untuk menggantikan graf tersebut di atas.

Komponen kedua dari kandungan tulang adalah kolagen. Di dalam tubuh, kolagen bukan saja terdapat di dalam tulang, akan tetapi matriks ekstraselular (ECM) ini juga banyak terdapat dalam jaringan seperti kulit, tendon, dan jaringan ikat lainnya. Dengan sifatnya yang biodegradable dan rendah antigenisitas, kolagen sangat berpotensi digunakan dalam rekayasa jaringan [7].

Kitosan merupakan polisakarida amino yang terdapat di alam dengan jumlah besar. Polimer alami ini mendapat perhatian yang besar karena merupakan polimer alami yang melimpah setelah selulosa. Kitosan diperoleh dari krustasea seperti udang, cumi-cumi, dan kepiting. Beberapa pemanfaatan dari kitosan di bidang industri antara lain adalah pengolahan air limbah, [8,9] dan pembalut luka [10].

Kitosan setelah dilarutkan dalam asam organik atau asam anorganik akan membentuk polielektrolit kental. Larutan ini sangat mudah untuk menghasilkan serat, film, dan juga pelapisan permukaan. Di samping itu, kitosan juga memiliki miscibilitas yang baik dengan polimer lain sehingga mudah membentuk kompleks dan kelat. Dengan adanya gugus fungsi yang aktif dalam molekul kitosan memungkinkan untuk memodifikasinya dengan bahan lain. Itulah sebabnya kitosan digunakan di berbagai bidang, termasuk obat. Keistimewaan kitosan secara biologis adalah bersifat biodegradable, biokompatibel, antibakteri, tidak toksik, anti tumor, mempercepat pembentukan osteoblas yang selanjutnya mempercepat pembentukan tulang baru [11,12].

Dalam beberapa tahun belakangan ini banyak peneliti memfokuskan penelitiannya untuk mempelajari komposit kitosan-hidroksiapatit dalam bidang biomaterial untuk menghasilkan scaffold. Scaffold yang dibuat dapat dalam bentuk membran, mikrosfer, atau material *multi layer*. Kitosan juga dapat dikombinasi dengan makromolekul lainnya, seperti serat sutra atau karboksimetil selulosa dengan metode *freeze-gelation* [13].

Selain itu tanaman asli Indonesia seperti sirsak mempunyai khasiat yang sangat baik sebagai antikejang, peluruh keringat, antikanker, antitumor, antivirus, antibakteri, antijamur, antiinflamasi (anti-peradangan). Namun proses konvensional yang ada menghasilkan produk obat tradisional dengan kualitas kurang baik dengan tingkat cemaran mikroorganisme yang cukup tinggi. Radiasi pengion seperti sinar gamma dan berkas elektron mempunyai keunggulan antara lain dapat menurunkan cemaran

mikroba/mensterilkan produk yang tidak tahan pemanasan, memodifikasi polimer, dan tidak meninggalkan residu kimia yang berbahaya bagi kesehatan.

Penelitian ini bertujuan untuk membuat dan mengkarakterisasi scaffold dari komposit kitosan-kolagen-HA sebagai biomaterial pengganti graf tulang dan mendapatkan data riset dosis pasturisasi radiasi yang tepat pada simplisia ekstrak daun sirsak sebagai antiinflamasi, antidiabetes, imunomodulator

BAHAN DAN METODE

A. Komposit kitosan-kolagen-HA sebagai biomaterial pengganti graf tulang

Persiapan Larutan Kitosan

Kitosan dikeringkan dalam oven sampai beratnya tetap. Kemudian, 2 g dari kitosan tersebut dilarutkan ke dalam 100 ml asam asetat 1% dengan cara mengaduknya pada suhu kamar selama 24 jam. Larutan kemudian di saring untuk menghilangkan debu atau sisa kotoran lainnya. Larutan ini merupakan larutan yang digunakan untuk membuat campuran dengan kolagen dan HA.

Persiapan Campuran Kitosan-Kolagen-HA

Ke dalam larutan kitosan ditambahkan kolagen sebanyak 3 g, kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 3 jam, kemudian pengadukan dilanjutkan dengan homogenizer selama 15 menit hingga campuran tersebut homogen. Ke dalam campuran kitosan-kolagen tersebut ditambahkan sebanyak 5 g HA dan diaduk dengan homogenizer selama 15 menit/ hingga homogen. Sebagian dari campuran tersebut di tambahkan natrium bikarbonat sebanyak 1 dan 2 persen, sedangkan bagian lainnya digunakan sebagai kontrol.

Pencetakan/casting

Campuran kitosan-kolagen-HA dicetak di dalam *well cell culture* (dia = 10 mm) sehingga produk yang dihasilkan berbentuk tabung. Well disimpan di dalam lemari pendingin -40 °C selama 24 jam, selanjutnya dikeringkan dengan cara liofilisasi. Sebagian dari sampel direndam dalam larutan NaOH 1M selama 3 jam, kemudian dinetralkan pHnya dengan merendam sampel tersebut di dalam air destilasi. Sampel kembali dikeringkan dengan cara liofilisasi. Sampel yang telah kering diiradiasi dengan gamma dosis 15 dan 25 kGy.

Karakterisasi

Sampel kitosan, kolagen, HA, dan komposisinya dianalisis menggunakan FTIR (Shimadzu IR prestige 21), Jepang. Kira-kira 0.5 mg sampel dan 100 mg kalium bromida (KBr)

dicampur homogen menggunakan lumpang dan alu. Sebagian sampel tersebut dimasukkan ke dalam tempat sampel. Spektrum diperoleh dengan 32 scan per sampel pada bilangan gelombang 4000-400 cm^{-1} .

TGA digunakan untuk mengevaluasi stabilitas termal dan menentukan suhu dekomposisi dari kitosan, kolagen, dan HA serta komposisinya. Pengukuran termogravimetri dilaksanakan menggunakan termogravimetri Shimadzu Type 60, Jepang. Kisaran suhu yang dipelajari adalah 30 – 900 $^{\circ}\text{C}$ pada tingkat pemanasan 20 $^{\circ}\text{C}$ / min bawah suasana udara normal. Massa sampel dalam pan terus menerus dicatat sebagai fungsi temperatur.

Untuk menganalisis morfologi dari scaffold komposit, sampel di lapisi dengan carbon dan kemudian dianalisis menggunakan Scanning Electron Microscope (SEM) (Zeiss, EVO MA 10), Switzerland.

Serapan air diukur dengan metode gravimetri. Berat sampel awal ditimbang dengan neraca analitik sebagai B_{aw} , Sampel kemudian direndam dalam air destilasi pada ruang $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 3 jam. Setiap 15 menit sampel di keluarkan dari air destilasi, perbukannya dikeringkan dengan kertas tissue dan segera ditimbang (B_{ak}). Setiap B_{ak} adalah nilai rata-rata yang diperoleh dari tiga pengukuran. Persentase peningkatan berat sampel (serapan air) air sampel dihitung dengan rumus:

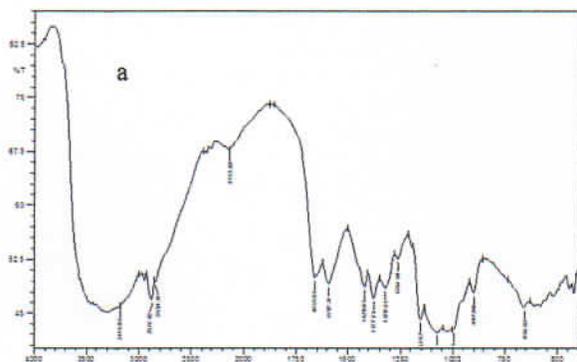
$$\% \text{ Serapan Air} = \frac{B_{ak} - B_{aw}}{B_{aw}} \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

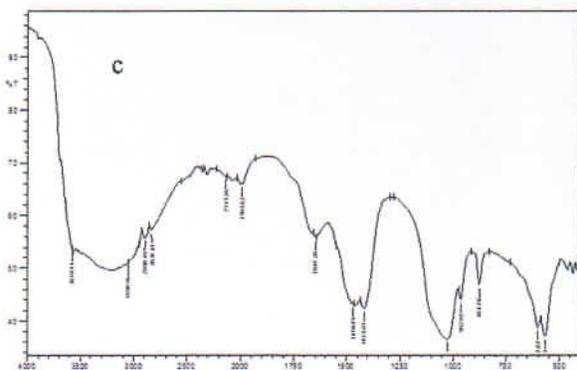
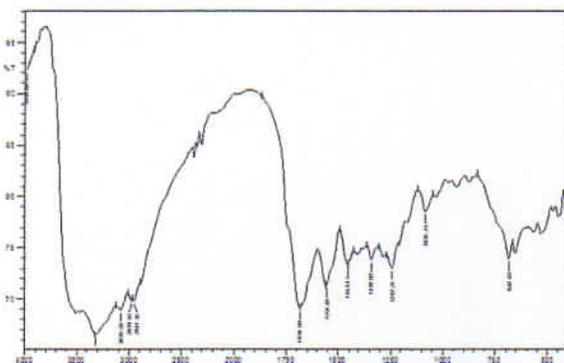
Gambar 1 adalah spektrum dari kitosan (a), kolagen (b), HA (c), dan komposit kitosan-kolagen-HA. Spektrum kitosan (Gambar. 1a) menunjukkan pita serapan yang kuat dan luas antara bilangan gelombang 1080 dan 1030 cm^{-1} dengan puncak 1252 cm^{-1} berkaitan dengan gugus amino primer ($-\text{NH}_2$) pada posisi C2 dari glukosamin dan senyawa organik lainnya dalam kitosan. Puncak pita serapan pada bilangan gelombang 1651 cm^{-1} (amida I) dengan bahu kecil pada 1.596 cm^{-1} (amida II) berkaitan dengan kelompok amino asetat. Hal ini menegaskan bawah sampel tidak sepenuhnya terdeasetilasi sempurna. Puncak pita serapan bilangan gelombang 1.380 cm^{-1} merupakan $-\text{C}-\text{O}$ peregangan dari kelompok alcohol primer ($-\text{CH}_2-\text{OH}$). Selanjutnya puncak pita serapan bilangan gelombang 894 cm^{-1} berhubungan dengan $\text{C}-\text{O}$ peregangan.[13]

Spektrum kolagen (Gambar 1b) menunjukkan adanya puncak-puncak spektrum gugus amida A, amida B, amida I, amida II, dan amida III. Amida A merupakan daerah dimana terdapat gugus NH ulur yang berpasangan membentuk ikatan hidrogen dan OH dari

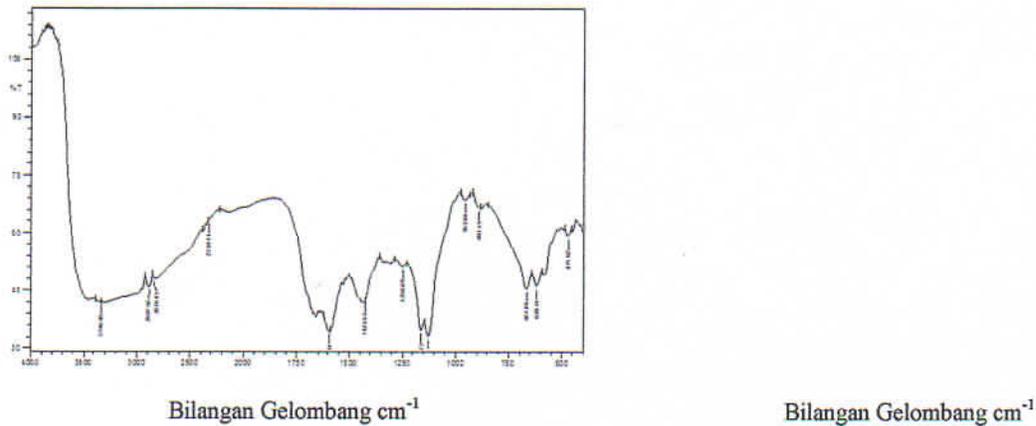
hidroksiprolin. Pada spectrum FTIR puncak pita angka gelombangnya diperoleh pada 3427 cm^{-1} . Amida B merupakan daerah dimana terdapat gugus CH_2 *symmetrical stretching*, yang dalam hal ini terindikasi pada puncak pita angka gelombang 2958 cm^{-1} . Amida I mewakili gugus $\text{C}=\text{O}$ ulur yang berpasangan dengan gugus COO^- membentuk ikatan hydrogen, dalam spectrum kolagen terlihat pada puncak pita angka gelombang 1668 cm^{-1} . Amida II terjadi karena vibrasi tekuk gugus NH dengan vibrasi ulur gugus $\text{C}-\text{N}$ yang terlihat pada puncak pita angka gelombang 1560 cm^{-1} . Amida III berikatan dengan vibrasi bidang gugus $\text{C}-\text{N}$ dan NH dari glisin yang terlihat pada puncak pita angka gelombang 1240 cm^{-1} . Dengan ditemukannya Amida A, B, I, II dan III pada spektrum FTIR dari sampel ini, terindikasi bahwa sampel ini merupakan kolagen type I.



b



d



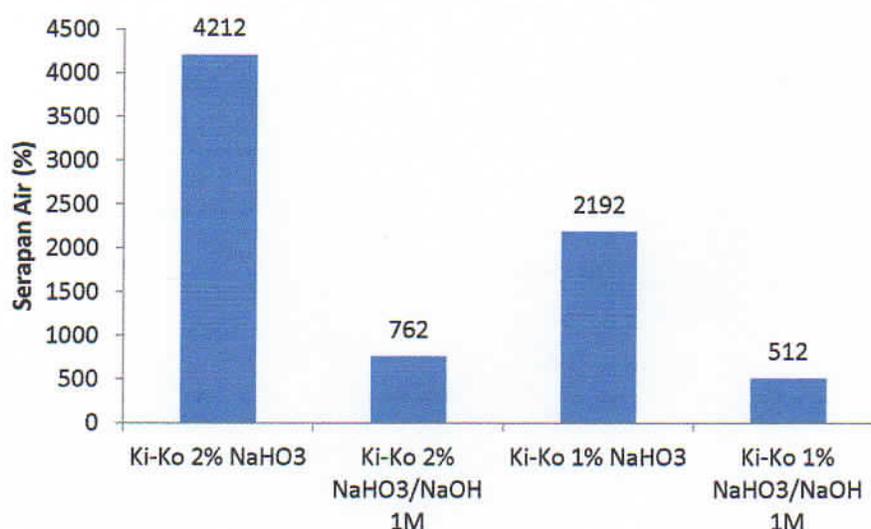
Gambar 1. Spektrum FTIR Kitosan (a), Kolagen (b), HA (c), dan Kompositnya (d)

Gambar 1c adalah spektrum FTIR dari HA yang diisolasi dari tulang sapi. Gugus fungsi dari fosfat teramati pada angka gelombang 1099, 952, 839, dan 563 cm^{-1} , sementara itu pita gelombang yang membentang antara 2900 – 3700 merupakan gugus fungsi OH pada HA. Pada HA ini terdapat pula gugus karbonat sekitar 1457, 1433 dan 840 cm^{-1} yang menunjukkan HA dari tulang merupakan HA yang berkarbonasi.

Gambar 1d adalah spektrum FTIR dari komposit kitosan-kolagen-HA. Semua karakteristik spektrum dari masing-masing bahan baku (kitosan, kolagen, dan HA) terdapat dalam komposit ini. Terlihat pita melebar yang muncul pada bilangan gelombang antara 3470 dan 2885 cm^{-1} yaitu merupakan overlapping gugus OH dari HA dengan NH₂ peregangan kitosan dan kolagen. Selanjutnya terdapat pula pita serapan CH alifatik pada bilangan gelombang 2885 dan 2990 cm^{-1} dari kitosan dan kolagen. Puncak asimetri peregangan karboksi (COO⁻) yang melebar pada puncak spectrum 1423 cm^{-1} yang menandakan adanya penggabungan antara kitosan dan kolagen. Selanjutnya, HA ditunjukkan dengan adanya fosfat yang terindikasi pada angka gelombang 1131, 1062, 988, 876, 576, dan 528 cm^{-1} . Dengan tidak ada pergeseran puncak dari ketiga komponen dari komposit kitosan-kolagen-HA dapat dianggap sebagai hanya campuran kitosan, kolagen dan HA. Dengan kata lain tidak ada reaksi kimia yang terjadi antara ketiga komponen tersebut.

Kemampuan scaffold untuk menyimpan air merupakan aspek penting dari biomaterial scaffold. Serapan air komposit kitosan-kolagen dapat dilihat pada Gambar 2. Penambahan NaHCO₃ ke dalam komposit menunjukkan serapan air yang meningkat dibandingkan kontrol. Semakin tinggi konsentrasi NaHCO₃ yang ditambahkan, menunjukkan serapan air scaffold yang semakin tinggi pula. Pemberian NaHCO₃ sebanyak 2 dan 1 persen ke dalam

komposit kitosan-kolagen dapat menyerap air berturut-turut 4212% dan 2192%. Hal ini dapat dipahami bahwa penambahan NaHCO_3 ke dalam komposit yang bersuasana asam akan menghasilkan gas CO_2 . Semakin tinggi konsentrasi NaHCO_3 yang diberikan, kemungkinan akan semakin banyak pula gas CO_2 yang terbentuk. Karbondioksida yang terperangkap dalam komposit ketika diliofilisasi akan hilang dan tempat dari gelembung udara tersebut akan berubah menjadi lobang atau pori.

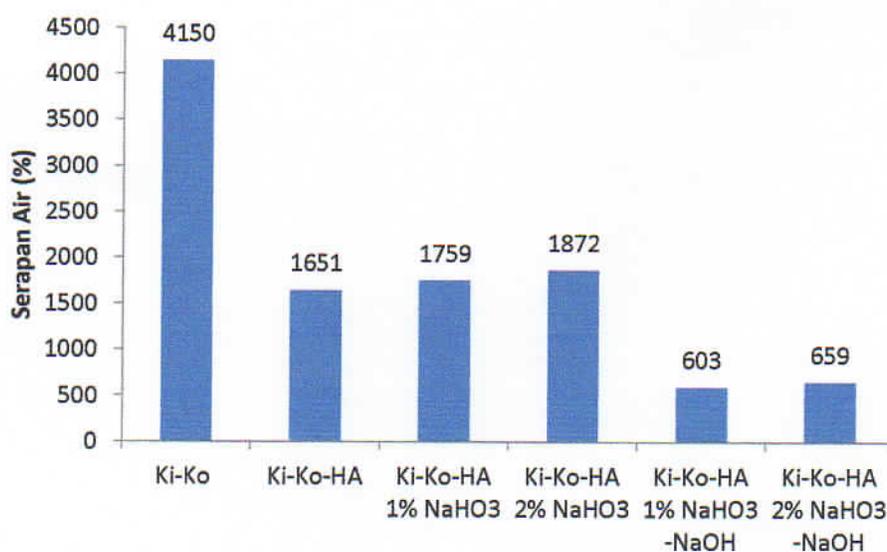


Gambar 2. Serapan Air komposit Kitosan-kolagen

Gelasi komposit di dalam larutan NaOH 1 M menunjukkan serapan air dari komposit lebih rendah dibandingkan dengan tanpa gelasi. Penurunan ini disebabkan karena kitosan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kitosan yang tidak larut air, tetapi larut dalam asam. Kitosan dalam larutan asam dapat memberikan proton amino, mengubah polimer ini menjadi bermuatan positif, dengan demikian mengatasi kekuatan asosiatif antara rantai. Apabila larutan tersebut ditambahkan basa kuat seperti NaOH , kitosan tetap bermuatan positif dalam larutan hingga pH 6,2. Pembasaan lebih lanjut ($\text{pH} > 6,2$), secara sistematis akan mengarah pada pembentukan endapan yaitu gel terhidrasi. Presipitasi atau pembentukan gel tersebut disebabkan netralisasi dari kelompok amina dari kitosan dan sebagai konsekuensi terjadi penghilangan atau perubahan gaya elektrostatis yang kemudian memungkinkan pembentukan ikatan hydrogen dan interaksi hidrofobik antar rantai. [14]

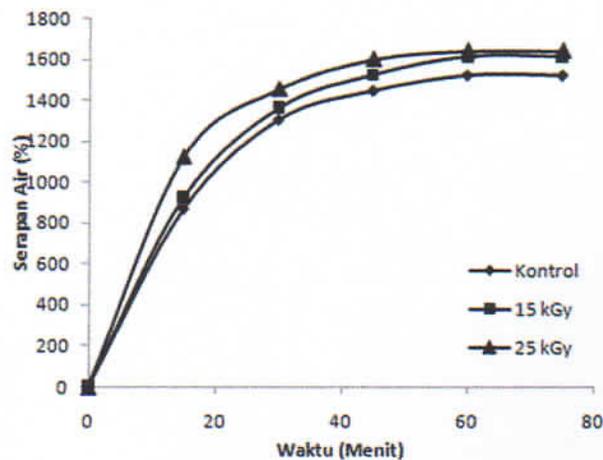
Gambar 3 adalah serapan air dari komposit kitosan-kolagen-HA yang diberi NaHCO_3 dan

NaOH. Komposit kitosan-kolagen dapat menyerap air sebesar 4150%, akan tetapi penambahan HA menjadi kitosan-kolagen-HA, terjadi penurunan serapan air yang signifikan yaitu 1651%. Kemampuan mengikat air dari kitosan-kolagen dari scaffold berkaitan dengan hidrofilisitas dan striktur tiga dimensinya. [15] Pada komposit kitosan-kolagen-HA, kemampuan penyerapan air berkurang disebabkan terjadinya pengisian partikel HA dalam kisi-kisi komposit kitosan-kolagen. Serapan air semakin menurun karena proses gelasi dari perendaman komposit dalam NaOH dengan mekanisme seperti yang telah disampaikan di atas.



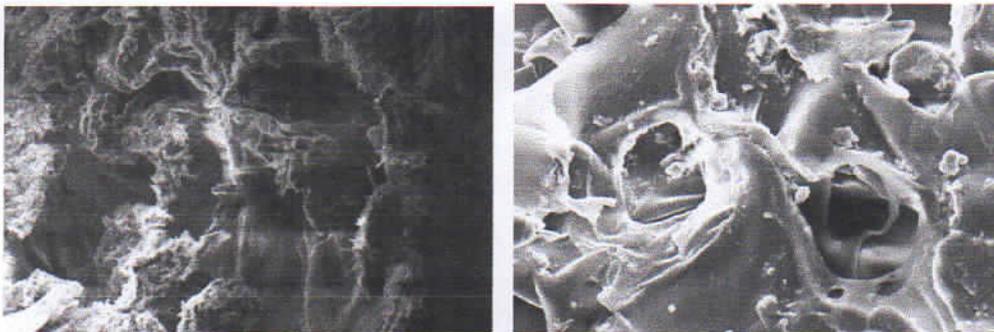
Gambar 3. Serapan Air Komposit kitosan-kolagen-HA

Gambar 4 adalah hubungan antara serapan air dengan waktu dari komposit kitosan-kolagen-HA iradiasi. Serapan air pada komposit yang diiradiasi menunjukkan peningkatan dibandingkan dengan kontrol. Serapan air setelah perendaman satu jam pada masing-masing sampel kontrol, 15 kGy dan 25 kGy berturut-turut 1 525 %, 1 617 %, dan 1 643 %. Kenaikan serapan air dari scaffold komposit ini mungkin disebabkan terjadinya degradasi akibat pemutusan rantai 1-4 ... dari kitosan yang mengakibatkan pecahnya atau retaknya scaffold.



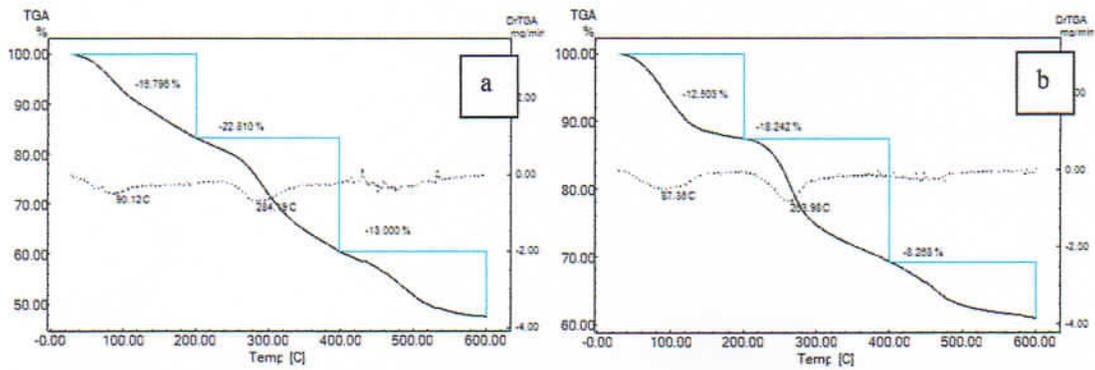
Gambar 4. Hubungan Serapan Air dengan Waktu pada Komposit Kitosan-Kolagen-HA Iradiasi

Ditinjau dari morfologi dari scaffold kitosan-kolagen-HA, dari gambaran SEM (Gambar 5) terlihat bahwa komposit yang digelasi permukaannya berubah menjadi rata dibandingkan dengan kontrol yang kelihatan berserat. Kemungkinan dengan banyaknya serat tersebut dapat menyerap air lebih banyak dibandingkan dengan komposit yang digelasi karena bersifat hidrofobik.



Gambar 5. Morfologi Scaffold Kitosan-Kolagen-HA (a. kontrol, b. setelah digelasi)

Gambar 6 adalah analisis termal dari komposit kitosan-kolagen-HA tanpa dan dengan gelasi. Pada gambar tersebut ada tiga daerah yang secara signifikan terlihat, yaitu yang berada dalam kisaran suhu hingga 200 o C kemungkinan besar kehilangan molekul air secara fisik dan kimia yang terdapat di dalam komposit scaffold. Dari hasil pemantauan, terdapat kehilangan air 16 dan 12 persen untuk masing-masing komposit tanpa dan dengan gelasi. Hilangnya massa penting ke dua dari sampel komposit dapat diamati pada rantang suhu 200 – 400 °C yang berkaitan dengan dekomposisi oksidatif dan termal dari biopolymer. [16]



Gambar 6. Analisa Termal Komposit Kitosan-Kolagen-HA tanpa Gelasi (a) dan dengan Gelasi (b)

Tingkat tertinggi dari dekomposisi yaitu puncak maksimum dari kurva DTG, ditemukan pada 284 o C baik pada komposit tanpa gelasi maupun dengan gelasi. Kehilangan bobot senyawa organik dari komposit tanpa dan dengan gelasi berturut-turut adalah 52,6% dan 39%. Dari data ini terlihat bahwa, dekomposisi polimer organik (kitosan-kolagen) dari komposit yang digelasi membutuhkan suhu yang lebih tinggi komposit tanpa gelasi. Hal ini mungkin disebabkan proses gelasi menyebabkan terjadinya ikat silang dari rantai kitosan-kolagen sehingga campuran bahan tersebut menjadi lebih kuat.

B. Daya anti inflamasi, diabetes simplisia ekstrak daun sirsak yang diiradiasi dengan radiasi gamma

Metode Pembuatan Simplisia Daun Sirsak

Sampel daun sirsak yang digunakan sebagai bahan uji adalah dipanen dari perkebunan rakyat di daerah Sukabumi. Pemanenan daun sirsak dilakukan dengan mengambil semua daun sirsak. Pembuatan simplisia daun sirsak dilakukan melalui beberapa tahapan, meliputi: penyortiran, dan pengeringan. Bila kadar air telah mencapai sekitar 15 %, yaitu ketika simplisia bisa dipatahkan, pengeringan telah dianggap cukup. Kemudian simplisia kering dikemas dalam plastik polietilen tebal 0,1 mm dan diiradiasi dengan menggunakan sinar gamma pada dosis 5 dan 10 kGy. Simplisia diekstraksi dengan cara dimaserasi dalam etanol 96 %, diperkolasi dan dievaporasi untuk mendapatkan ekstrak kental. Ekstrak tersebut dipakai sebagai sampel untuk diuji khasiatnya sebagai antikanker, antiinflamasi, antidiabetes, imunomodulator dan toksisitas akut terhadap mencit.

2. Metode penentuan penapisan fitokimia simplisia daun sirsak.

a. Alkaloid. Ditimbang 500 mg serbuk simplisia daun sirsak, tambahkan 1 ml asam klorida dan 9 ml air, dipanaskan diatas tangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Pindahkan 3 tetes filtrat pada kaca arloji, ditambahkan 2 tetes Bouchhadat LP. Jika pada kedua percobaan tidak terjadi endapan. maka serbuk tidak mengandung alkaloid. Jika dengan Meyer LP terbentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning yang larut dalam metanol P dan dengan Bouchhadat LP terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam, maka ada kemungkinan terdapat alkaloid, dari hasil identifikasi ternyata kandungan alkaloid dalam serbuk daun sirsak positif.

b. Flavonoid. Ditimbang sebanyak 1 gram serbuk daun sirsak ditambahkan dengan 100 ml air panas dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat diambil sebanyak 5 ml, ditambahkan serbuk magnesium lalu ditambahkan pula 1 ml asam klorida pekat dan ditambahkan amil alkohol lalu dikocok kuat-kuat, dibiarkan memisah. Reaksi positif mengandung flavonoid jika terdapat warna kuning dalam amil alkohol, dari hasil identifikasi ternyata kandungan flavonoid positif.

c. Saponin. Ditimbang sebanyak 1 gram serbuk daun sirsak ditambahkan 100 ml air panas lalu didihkan selama 15 menit, kemudian disaring. Selanjutnya 10 ml filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu dikocok secara vertikal selama 10 detik kemudian dibiarkan selama 10 menit. Jika terbentuk busa yang stabil menunjukkan reaksi positif bahwa mengandung saponin, dari hasil identifikasi ternyata serbuk temu mangga menunjukkan hasil positif mengandung saponin.

d. Tanin. Satu gram serbuk daun sirsak ditambah 100 ml air panas, didihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat ditambahkan dengan besi (III) klorida 4,5 %. Jika terbentuk reaksi berwarna biru kehitaman atau hijau lembayung menunjukkan tanin positif. Dari hasil identifikasi ternyata serbuk temu mangga menunjukkan adanya kandungan tannin.

e. Pemeriksaan steroid/triterpenoid. Sebanyak 5 gram serbuk daun sirsak dimaserasi dalam 20 mL eter selama 2 jam kemudian disaring. Sebanyak 5 mL filtrat diuapkan dalam cawan penguap sampai kering. Ke dalam residu ditambahkan dua tetes asam asetat glasial dan setetes asam sulfat pekat. Terbentuknya warna merah-ungu menunjukkan triterpenoid, dan jika terbentuk warna hijau-biru menunjukkan steroid

f. Pemeriksaan fenol. Dua gram sampel tersebut, ditambahkan dengan 25 ml etanol, kemudian dipanaskan selama 25 menit diatas waterbat. Filtrat panas-panas disaring lalu diuapkan di *waterbath* sampai kering. Sisanya ditritrasi dengan menambahkan kloroform.

Bagian yang tidak larut dalam kloroform ditambahkan air. Terdapat 2 lapisan, yaitu lapisan air dan lapisan kloroform, lalu dipisahkan.

f. Pemeriksaan Glikosida. Tiga gram sampel tersebut di sari dengan 30 ml campuran 7 bagian volume etanol 95 % dan 3 bagian volume air dalam alat pendingin alur balik selama 10 menit, dinginkan dan saring. Pada 20 ml filtrate tambahkan 25 timbal(II) asetat 0,4 M, kocok, diamkan selama 5 menit, saring filtrate 3 kali, tiap kali dengan 20 ml campuran 3 bagian volume kloroform dan 2 bagian volume isopropanol. Pada ekstrak yang sudah terkumpul di tambahkan natrium sulfat anhidrat, saring dan uapkan pada suhu tidak lebih dari 50° C sisa yang di peroleh dilarutkan dengan 2 ml metanol. Uapkan 0,1 ml larutan sampel percobaan diatas penangas air, larutkan sisa dalam 5 ml anhidrat asetat. Tambahkan 10 tetes asam sulfat, terjadi warna biru atau hijau, menunjukkan adanya glikosida (reaksi Liebermann-Bourchard).

3. Metode pengujian cemaran mikroba pada simplisia tanpa dan yang telah diiradiasi.

Penetapan Angka Lempeng Total dan Penetapan Angka Kapang dan Khamir dilakukan sesuai dengan prosedur dalam SNI. Ditimbang serbuk daun sirsak sebanyak 1 gram, kemudian ditambahkan 99 ml larutan pengencer akua pepton 0,1% hingga diperoleh pengenceran 1:100, dihomogenkan dan dilanjutkan dengan pengenceran yang diperlukan. Dari sampel dengan tingkat pengenceran yang sesuai dipipet sebanyak 1 ml secara aseptik ke dalam cawan Petri steril lalu dituang 15-20 ml media NA (*Nutrient Agar*) sebagai media bakteri dan media PDA digunakan sebagai media kapang dan khamir.

4. Metode pengujian antidiabetes ekstrak etanol simplisia daun sirsak pada tikus

Tikus dikarantina selama satu minggu dengan tetap diberi minum. Setelah itu semua tikus diukur kadar glukosa darah awalnya, lalu diinduksi aloksan 100 mg/kgBB secara *in vivo* kecuali untuk kelompok kontrol normal. Pada hari ketiga, setelah dipuaskan selama 10 jam, tikus diukur kadar glukosa darah, sebelum perlakuan. Kemudian tikus dikelompokkan menjadi 6 kelompok (untuk masing-masing dosis radiasi) dan kemudian diberi perlakuan selama empat hari berturut-turut sebagai berikut; Kelompok kontrol normal : Pulvis Gummi Arabicum (PGA) 2 % tanpa induksi aloksan, Kelompok kontrol negatif : PGA 2 %, Kelompok kontrol positif : Klorpropamid 100 mg/kgBB + PGA 2 %, Kelompok uji I : Ekstrak 250 mg/kgBB + PGA 2 %, Kelompok uji II : Ekstrak 500 mg/kgBB + PGA 2 %, dan Kelompok uji III : Ekstrak 1.000 mg/kgBB + PGA 2 %

Pengambilan darah masing-masing kelompok dilakukan pada hari ke dua, ke empat dan ke lima setelah perlakuan. Sampel darah disentrifugasi dengan kecepatan 4.000 rpm selama 10 menit, kemudian diambil serumnya. Serum darah diukur secara fotometrik pada λ 546 nm dengan metode GOD-PAK.

5. Metode pengujian antiinflamasi ekstrak etanol simplisia daun sirsak pada tikus

Rancangan penelitian menggunakan rancangan acak lengkap pola searah. Tikus jantan galur Wistar dibagi menjadi 11 kelompok masing-masing 5 ekor.

Kelompok I : diberikan larutan CMC Na 0,5 % dosis 10,0 ml/kg BB peroral satu jam sebelum injeksi karagenin 1 % (kontrol negatif). Kelompok II-IV: diberikan ekstrak etanol daun sirsak (radiasi 0, 5, dan 10 kGy) dosis 50 mg/kg BB peroral satu jam sebelum injeksi karagenin 1 %. Kelompok V-VII : diberikan ekstrak etanol daun sirsak (radiasi 0, 5, dan 10 kGy) dosis 100 mg/kg BB peroral satu jam sebelum injeksi karagenin 1 %. Kelompok VIII-X : diberikan ekstrak etanol daun sirsak (radiasi 0, 5, dan 10 kGy) dosis 200 mg/kg BB peroral satu jam sebelum injeksi karagenin 1 %. Kelompok XI : diberikan natrium diklofenak dosis 13,5 mg/kg BB (setara dosis terapi pada manusia) peroral satu jam sebelum injeksi karagenin 1 %.

Karagenin 1 % diinjeksi 0,1 ml subplantar pada telapak kaki tikus. Volume kaki tikus diukur menggunakan pletismometer, yaitu sekali sebelum pemberian karagenin dan pada waktu 0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3.0; 3.5; 4.0; 4.5; 5.0; 5.5 dan 6,0 jam setelah pemberian karagenin. Berdasarkan data volume kaki tikus dihitung volume udem akibat pemberian karagenin menggunakan persamaan berikut :

$$Vu = Vo - Vt$$

Dimana Vu adalah volume udem pada waktu t setelah pemberian karagenin, Vo adalah volume kaki tikus awal sebelum penyuntikan karagenin, dan Vt adalah volume kaki tikus pada waktu t setelah penyuntikan karagenin. Setelah perhitungan volume udem dilakukan untuk setiap kelompok, lalu dibuat kurva hubungan antara volume udem terhadap waktu pengukuran. Dari kurva tersebut, dihitung harga AUC_{0-4} (luas dibawah kurva volume udem terhadap waktu) menggunakan metode trapesium, yaitu dengan rumus umum sebagai berikut.

$$AUC_{t_1-t_2} = \frac{V_1 + V_2}{2} \times (t_2 - t_1)$$

Daya antiinflamasi dihitung berdasarkan % penurunan volume udem, yang dicerminkan

oleh penurunan harga $AUC_{0-6.5}$ setelah diberikan senyawa uji (Ekstrak etanol daun sirsak atau Natrium diklofenak) terhadap $AUC_{0-6.5}$ kontrol negatif (pelarut), yaitu dengan persamaan sebagai berikut :

$$(\%) = \frac{AUC}{\text{Daya Antiinflamasi}}$$

6. Metode pengujian imunomodulator ekstrak daun sirsak pada mencit

6.1. Hewan uji dan kelompok uji

Empat puluh ekor mencit jantan Swiss (umur 6-8 minggu, bobot 20-30 g) diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan LPPT UGM dan digunakan pada penelitian ini. Hewan uji ditempatkan dalam kandang pada temperatur (20-25°C) dan kelembaban (60-80%) dalam ruangan terkontrol. Siklus gelap-terang adalah 12/12 jam dan diberi pakan dan minum *ad libitum*. Dua puluh ekor hewan uji dibagi menjadi 5 kelompok dengan 5 ekor tikus tiap kelompok dengan pembagian sebagai berikut: Kel kontrol CMC Na 0,5% (0 dan 10 kGy), kel ekstrak etanol daun sirsak (0 dan 10 kGy) dosis (50 mg/kg BB), kel ekstrak etanol daun sirsak (0 dan 10 kGy) dosis (100 mg/kg BB), kel ekstrak etanol daun sirsak (0 dan 10 kGy) dosis (200 mg/kg BB), Sediaan uji ekstrak etanolik daun sirsak diberikan secara oral diberikan sekali sehari selama 14 hari.

6.2. Proliferasi Limfosit

Pada hari ke-15, hewan uji dikorbankan dan dilakukan pembedahan untuk mengambil organ limpa. Limpa dipotong-potong dan dibuat suspensi sel tunggal dan disentrifuge (1200 rpm, 4°C, 10 menit). Pellet yang didapat disuspensikan dalam 2 ml *Tris Buffered Ammonium Chloride* (TBAH) untuk melisis eritrosit. Sel dicampur menggunakan pipet dan didiamkan pada temperatur ruangan selama 2 menit. Selanjutnya ditambahkan 1 ml FBS pada dasar tabung menggunakan pipet. Suspensi kemudian disentrifuge (1200 rpm, 4°C, 5 menit), dan supernatan dibuang. Pellet dicuci dengan RPMI 2 x dengan cara dipipet berulang-ulang dan disentrifuge (1200 rpm, 4°C, 5 menit). Supernatan dibuang dan sel diresuspensikan dengan medium komplit. Sel dihitung menggunakan heositometer dan ditentukan viabilitasnya dengan trypan blue. Splenosit dikultur pada mikrokultur 24 sumuran dengan kepadatan 10^6 sel/ml dalam medium komplit kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5%, 37°C selama 24, 48, dan 72 jam. Aktivitas proliferasi supernatan kultur splenosit diukur dengan MTT *test assay*. Kultur sel ditambah MTT test kemudian diinkubasi selama 4 jam dan selanjutnya ditambahkan stopper dan dibaca pada Elisa reader

pada λ 550 nm.

6.3. Fagositosis Makrofag

Pada hari ke-15, hewan uji dikorbankan dengan anestesi ketamine (60 mg/kg BB). Mencit diletakkan dalam posisi telentang, kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan dari selubung peritoneum dengan alkohol 70% (v/v) dan disuntikkan \pm 10 ml RPMI (Sigma®) dingin ke rongga peritoneum. Kemudian didiamkan selama \pm 3 menit sambil digoyang-goyang secara perlahan (agar makrofag yang menempel di rongga peritoneum dan di sekitar usus dapat terlepas dan tersuspensi dalam medium RPMI). Cairan peritoneal dikeluarkan dari rongga peritoneum dengan dilakukan penekanan organ dalam dengan 2 jari, kemudian cairan diaspirasi dengan tabung injeksi (Terumo®) (dipilih pada bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus). Aspirat dipusingkan pada 1.200 rpm, 40°C selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang dan kemudian ditambahkan 3 ml "medium RPMI komplet" (mengandung FBS (Gibco®)).

Kemampuan fagositosis non spesifik dilakukan *in vitro* menurut Leijh dkk. [3] dengan menggunakan latex beads diameter 3 μ m (Sigma Chem. Co.). Lateks diresuspensikan dalam PBS (Sigma®) sehingga didapat konsentrasi $2,5 \times 10^7$ /ml. Makrofag peritoneum yang dikultur sehari sebelumnya dicuci 2x dengan RPMI, tambahkan suspensi lateks 200 μ l/sumuran dan diinkubasikan selama dalam inkubator CO₂ 5%, 37⁰C selama 60 menit. Sel kemudian dicuci dengan PBS 3x untuk menghilangkan lateks yang tidak difagositosis. Setelah itu keringkan pada suhu ruangan dan difiksasi dengan metanol selama 30 detik. Selanjutnya metanol dibuang dan coverslips didiamkan sampai kering. Setelah kering, coverslips dipulas dengan Giemsa (Merck®) 20% (v/v) selama 30 menit. Dicuci dengan air suling, diangkat dari sumuran kultur dan dikeringkan pada suhu kamar. Seratus sel makrofag diamati dan dihitung jumlah makrofag yang memfagositosis partikel lateks dan jumlah lateks yang difagositosis oleh makrofag. Pengamatan makrofag dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya (Olympus®) dengan perbesaran 400x [4].

7. Metode uji antikanker daun sirsak

Simplisia daun sirsak dimaserasi berturut-turut dengan pelarut *n*-heksan, etil asetat dan etanol. Filtrat yang diperoleh dipekatkan untuk mendapatkan ekstrak kasar. Ekstrak *n*-heksan, etil asetat, dan etanol dari daun sirsak dipersiapkan untuk uji antikanker. Skrining awal ketiga ekstrak diuji secara *in vitro* dengan sel MCF, ekstrak yang paling aktif menghambat pertumbuhan sel MCF dilanjutkan untuk uji antiproliferasi terhadap sel

kanker lestari.

Uji aktivitas sitotoksik pada sel kanker manusia secara *in vitro* dilakukan terhadap ekstrak dari simplisia yang diiradiasi maupun yang tidak. Ekstrak yang diuji yaitu ekstrak yang memberikan nilai IC₅₀ terbaik pada pengujian terhadap sel MCF. Masing-masing sampel dibuat dengan 6 macam variasi konsentrasi, yaitu 0 (kontrol), 5, 10, 20, 40 dan 80 µg/ml, dengan ulangan 3 kali. Sebagai kontrol positif digunakan doksorubisin dengan konsentrasi 6 µg/ml. Masing-masing konsentrasi ditempatkan dalam Multiwell Plate Tissue's Culture 24 sumuran yang berisi 1 ml suspensi sel (mengandung 2 x 10⁵ sel) dalam medium, kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5 % pada suhu 37 °C selama 72 jam. Suspensi sel dalam setiap sumuran dipipet 90 µl dan dimasukkan ke dalam *serocluster plate* (96 sumuran) dan ditambah 10 µl biru tripan, lalu dihomogenkan kembali. Sebanyak 10 µl larutan dialirkan ke dalam *haemocytometer* dan dilakukan perhitungan jumlah sel yang hidup dan yang mati di bawah mikroskop. Aktivitas antiproliferasi merupakan kemampuan sampel uji dalam menghambat pertumbuhan sel dinyatakan dalam presentase (%) penghambatan berdasarkan rumus :

$$\% \text{ penghambatan} = \frac{[\text{rerata sel dlm kontrol}] - [\text{rerata sel dlm sampel uji}]}{[\text{rerata sel dalam kontrol}]}$$

Perhitungan nilai IC₅₀ (*inhibitory concentration fifty*), yaitu konsentrasi zat uji yang dapat menghambat pertumbuhan sel sebesar 50 %, dihitung dari kurva regresi linier antara log konsentrasi zat uji dengan nilai probit aktivitas penghambatan

8. Metode uji toksisitas daun sirsak pada mencit.

Mencit galur Swiss Webster sebagai sampel uji terlebih dahulu diaklimatisasi selama 1 minggu dan hanya mencit sehat yang digunakan dalam percobaan. Ekstrak uji yang digunakan dengan 5 tingkat dosis yaitu 625 mg/kg berat badan (bb) (D1); 1.250 mg/kg bb (D2); 2.500 mg/kg bb (D3); 5.000 mg/kg bb (D4) dan 10.000 mg/kg bb (D5) yang terlebih dahulu disuspensikan dalam Na-CMC 0,5 % kemudian diberikan secara oral dalam dosis tunggal 1 ml per 20 g mencit, satu dosis per kelompok. Tiap kelompok terdiri dari 10 tikus jantan dan 10 mencit betina yang dikelompokkan secara acak. Kelompok kontrol (K) hanya diberi larutan pembawa yaitu Na CMC 0,5 %. Pengamatan terhadap efek-efek yang muncul dilakukan segera setelah pemberian sediaan uji selama 2 mencit pada tiap jam dalam periode 4 jam pertama. Parameter yang diamati meliputi efek terhadap sistem syaraf pusat, sistem saraf otonom, refleks, ritme pernapasan, perubahan dalam

ekskresi, kondisi kulit dan mukosa, postur tubuh, kecepatan denyut jantung dan beberapa respon lainnya yang umum diamati pada uji toksisitas akut. Perubahan bobot badan dan kematian tikus dipantau terus setiap hari sampai 14 hari setelah pemberian sediaan uji. Apabila mencit yang mati selama pengamatan, segera dibedah untuk menentukan sebab kematian. Pada hari ke 14, semua mencit dibunuh kemudian organ-organnya ditimbang dan dihitung terhadap bobot badan mencit. Organ-organ yang diambil untuk pengamatan pada mencit jantan adalah hati, limpa, paru-paru, ginjal, jantung, vessikal seminalis dan testis sedangkan pada mencit betina organ yang diamati adalah hati, limpa, paru-paru, ginjal, jantung, ovarium dan uterus. Selain itu pengamatan yang dilakukan adalah profil perubahan bobot badan mencit. Kebermaknaan data yang diperoleh diolah secara statistik menggunakan uji-t.

BAB III : HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Hasil penentuan rendemen simplisia daun sirsak

Hasil penentuan rendemen ekstrak dari simplisia daun sirsak tanpa dan yang diiradiasi pada dosis 5 dan 10 kGy, menunjukkan bahwa ada perbedaan yang nyata pada dosis 5 kGy dibanding tanpa iradiasi (Tabel 1).

Tabel 1. Rendemen ekstrak daun sirsak tanpa dan diiradiasi pada dosis 5 dan 10 kGy

No.	Dosis iradiasi (kGy)	Berat serbuk (gr)	Berat ekstrak (gr)	Rendemen (%)
1	0	2.000	671,8	33,59
2	5	1.000	219,1	21,91
3	10	1.500	465	31

2. Hasil penentuan persyaratan dan penepisan fitokimia simplisia daun sirsak

Penentuan persyaratan dan fitokimia simplisia daun sirsak tanpa dan iradiasi. Hasil percobaan kandungan fitokimia dan pemeriksaan persyaratan simplisia daun sirsak iradiasi disajikan pada Tabel 2 dan 3. Pada Tabel 2, menunjukkan bahwa simplisia yang dipasteurisasi pada dosis 5 dan 10 kGy, cenderung menurunkan kadar persyaratannya. Pada Tabel 3 ini terlihat bahwa simplisia temu mangga baik yang tanpa diiradiasi maupun yang diiradiasi mengandung senyawa kimia seperti alkaloid, saponin, fenolik, flavonoid, triterfenoid dan steroid. Dari data tersebut nampak bahwa perlakuan pasteurisasi iradiasi pada dosis 10 kGy tidak menunjukkan penurunan kandungan fitokimianya.

Tabel 2. Hasil uji persyaratan simplisia daun sirsak iradiasi

No.	Uraian pengujian (%)	Simplisia daun sirsak iradiasi (kGy)		
		0	5	10
1.	Kadar air	6,80	6,55	6,80
2.	Kadar abu	10,03	9,57	12,74
3.	Kadar abu tak larut	1,69	1,44	3,82
4.	asam	20,65	19,82	15,52
5.	Kadar sari dalam air	12,04	11,30	10,68
	Kadar sari dalam alkohol			

Tabel 3. Hasil uji penepisan fitokimia simplisia daun sirsak iradiasi

No.	Uraian pengujian	Simplisia daun sirsak iradiasi (kGy)		
		0	5	10
1.	Saponin	+	+	+
2.	Tanin	-	-	-
3.	Alkaloid	+	+	+
4.	Fenolik	+	+	+
5.	Flavonoid	-	-	-
6.	Triterpenoid	+	+	+
7.	Steroid	+	+	+
8.	Glikosida	+	+	+

Senyawa tanin nampak kandungannya sedikit dan steroid dalam simplisia tidak terdeteksi, dimungkinkan senyawa tersebut terperangkap dalam sel, mungkin dengan cara diekstraksi senyawa tersebut dapat ditarik dari dalam sel. Perlakuan iradiasi hingga dosis 10 kGy pada simplisia secara kualitatif tidak mempengaruhi perubahan kandungan kimia simplisia daun sirsak. Demikian juga hasil pemeriksaan simplisia tanpa dan yang diiradiasi tidak menunjukkan perbedaan berarti artinya perlakuan iradiasi tidak mempengaruhinya. Dengan demikian simplisia daun sirsak dapat dipakai sebagai salah satu bahan baku dalam produksi kosmetik, jamu dan obat tradisional.

3. Hasil pengujian cemaran mikroba pada simplisia tanpa dan yang telah diiradiasi.

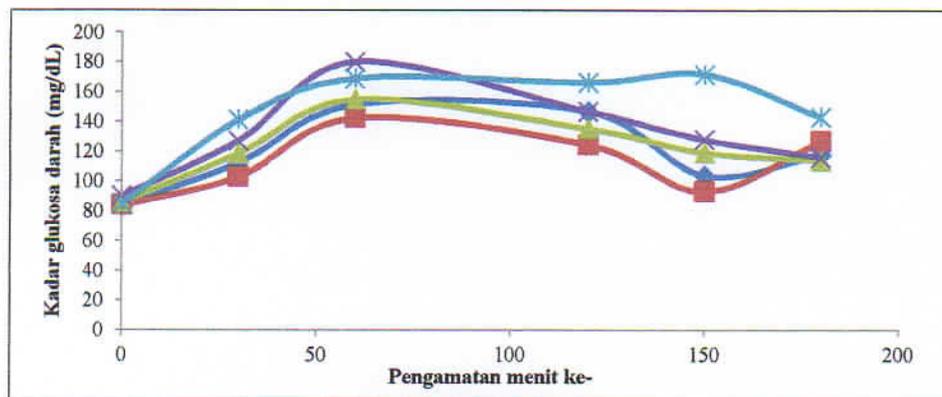
Tabel 4. Hasil uji mikrobiologi simplisia daun sirsak tanpa dan diiradiasi pada dosis 5 dan 10 kGy

No.	Uraian Uji	Media uji	Dosis iradiasi		
			0 kGy	5 kGy	10 kGy
1	TPC (angka kuman)	TSA	1.29×10^8	1.78×10^4	2.25×10^3
2	TYMC (angka kapang)	SDA	6.44×10^4	7.44×10^2	<1
3	Coliform	McConkey	2.67×10^6	<1	<1
4	<i>Escherichia coli</i>	EMB	<1	<1	<1
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cetrimide	<1	<1	<1
8	<i>Staphylococcus aureus</i>	MSA	<1	<1	<1

Hasil uji mikrobiologi terhadap simplisia yang diiradiasi 10 kGy dapat menurunkan angka kuman sebesar 5 desimal dan angka kapang sebesar 4 desimal. Simplisia daun sirsak tidak terdeteksi cemaran bakteri *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Staphylococcus aureus* (Tabel 4).

4. Hasil pengujian efek hipoglikemia ekstrak daun sirsak pada tikus wistar jantan dengan metode tes toleransi glukosa (GTT)

Hasil pengukuran kadar glukosa darah ekstrak daun sirsak pada tikus Wistar jantan menggunakan tes toleransi glukosa dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil pengujian pendahuluan menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak dosis 25 mg/kg bb merupakan dosis yang mempunyai efek hipoglikemik jika dibandingkan kelompok dosis uji yang lain. Oleh karena itu, maka pada pengujian efek ekstrak etanol daun sirsak yang diiradiasi, dosis 25 mg/kg bb akan dijadikan acuan sebagai dosis uji.



Gambar 1. Pengaruh pemberian ekstrak daun sirsak yang diiradiasi 0 kGy terhadap kadar glukosa darah tikus

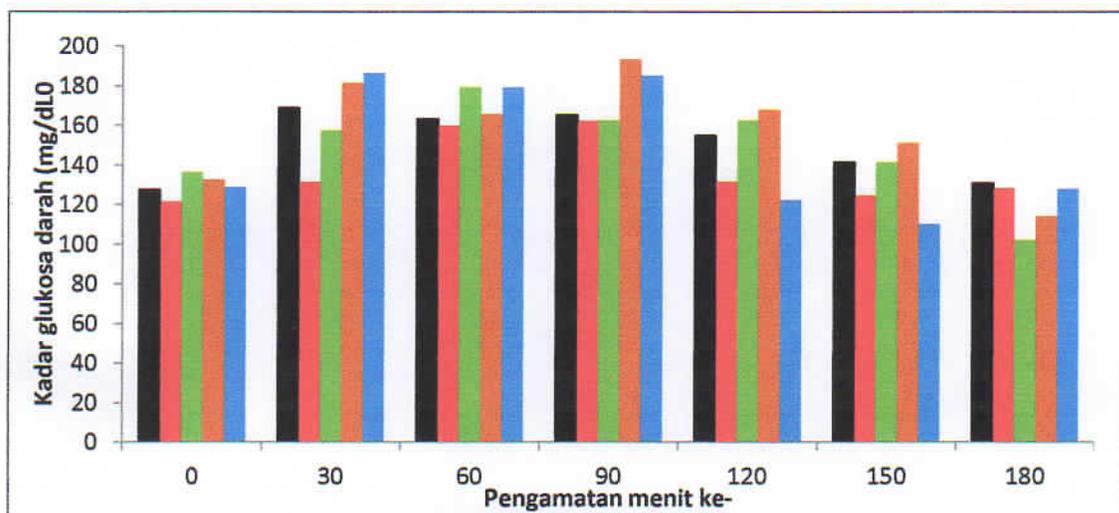
Keterangan:

- = kontrol
- = pembanding klorpropamid 22,5 mg/kg bb
- ▲— = ekstrak daun sirsak 0 kgray dosis 25 mg/kg bb
- ✱— = ekstrak daun sirsak 0 kgray dosis 50 mg/kg bb
- ✱— = ekstrak daun sirsak 0 kgray dosis 100 mg/kg bb

Hasil pengukuran kadar glukosa darah ekstrak daun sirsak yang diiradiasi 0, 5, dan 10 kGy pada tikus Wistar jantan menggunakan tes toleransi glukosa dapat dilihat pada Gambar 2. Hasil penentuan kadar glukosa darah, menunjukkan bahwa pada menit ke-30 semua hewan uji menunjukkan kenaikan kadar glukosa darah dibanding menit ke - 0. Pada pengujian menunjukkan bahwa penurunan kadar glukosa darah ekstrak etanol daun sirsak yang diiradiasi 0 dan 10 kGy mempunyai efek hipoglikemi lebih baik jika dibandingkan ekstrak etanol daun sirsak yang diiradiasi 5 kGy. Hal ini ditunjukkan pada Gambar 3, dimana

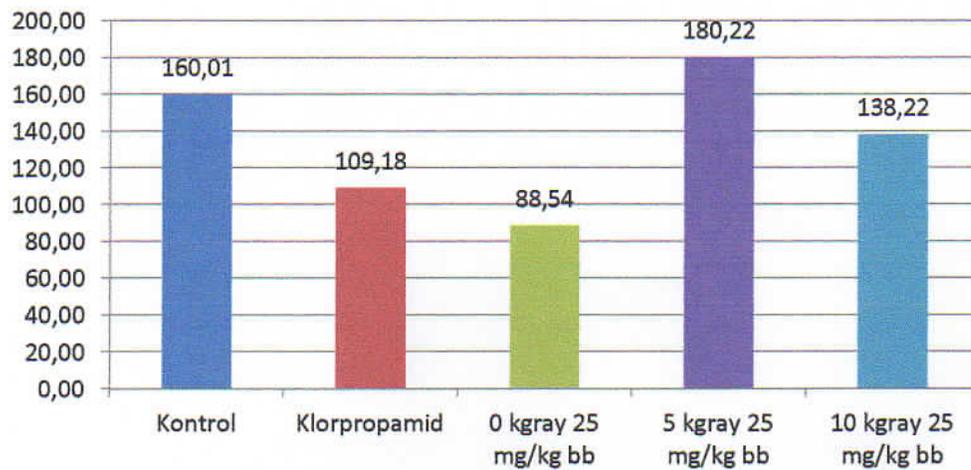
jumlah selisih kadar glukosa darah kelompok ekstrak etanol daun sirsak yang diradiasi 0 kGy sebesar 88,54 %, sedangkan ekstrak etanol daun sirsak yang diradiasi 5 kGy sebesar 180,22 %, dan ekstrak etanol daun sirsak dengan radiasi 10 kGy sebesar 138,22 %, dan pada kelompok pembanding sebesar 109,18 %.

Hasil uji menunjukkan bahwa efek hipoglikemik terjadi pada kelompok pembanding klorpropamid, kelompok ekstrak daun sirsak tanpa radiasi dan dengan radiasi 10 kGy. Kadar glukosa relatif dari setiap kelompok perlakuan dianalisis secara statistik menggunakan metode ANOVA dan Uji-t. Hasil analisis statistik secara ANOVA menunjukkan bahwa pada mulai menit ke-30 sampai menit ke-180 terdapat tidak perbedaan bermakna antar semua kelompok uji, tetapi berbeda secara nyata.



Gambar 2. Pengaruh pemberian ekstrak daun sirsak tanpa dan diiradiasi 5, dan 10 kGy terhadap kadar glukosa darah tikus

- Keterangan:
- = kontrol
 - = pembanding klorpropamid 22,5 mg/kg bb
 - = ekstrak daun sirsak 0 kgray dosis 22,5 mg/kg bb
 - = ekstrak daun sirsak 5 kgray dosis 22,5 mg/kg bb
 - = ekstrak daun sirsak 10 kgray dosis 22,5 mg/kg bb

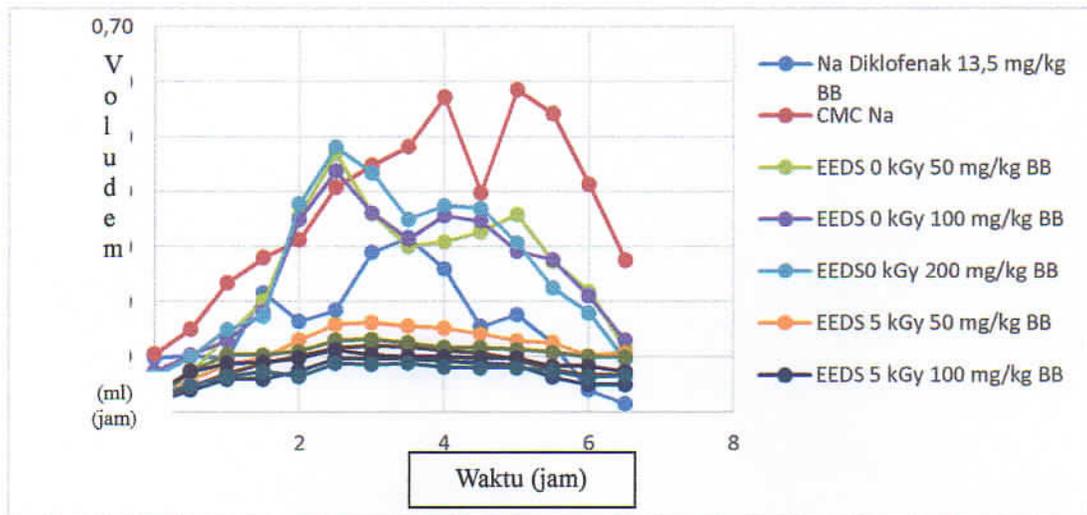


Gambar 3. Jumlah selisih kadar glukosa darah relatif tikus

5. Hasil pengujian antiinflamasi ekstrak daun sirsak pada tikus

Gambar 4 memperlihatkan profil kurva volume udem terhadap waktu antar kelompok perlakuan. Bila dibandingkan kontrol negative (pemberian CMC Na), nampak ada penurunan volume udem setelah pemberian kontrol positif (Na Diklofenak), dan ekstrak etanol daun sirsak (EEDS) tanpa dan iradiasi 5 dan 10 kGy serta variasi dosis.

Analisis selanjutnya yang perlu dilakukan adalah menghitung harga AUC kurva volume udem terhadap waktu menggunakan metode trapezoid dan diteruskan menghitung daya antiinflamasi berbagai kelompok perlakuan terhadap kontrol negatif. Daya antiinflamasi dapat menggambarkan penurunan volume udem setelah diberi perlakuan yang dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Untuk melihat perbedaan harga AUC dan daya antiinflamasi antar kelompok perlakuan akan dilakukan analisis varian (ANOVA) dengan taraf kepercayaan 95%, dan analisis akan dilanjutkan menggunakan Tukey bila ditemukan ada perbedaan yang signifikan antar kelompok tersebut. Analisis ini masih dalam proses pekerjaan.



Gambar 4. Kurva purata volume udem terhadap waktu setelah pemberian berbagai perlakuan pada tikus terinduksi karagenin.

Tabel 5. Harga AUC volume udem terhadap waktu dan prosentase daya antiinflamasi setelah diberikan berbagai kelompok perlakuan pada tikus terinduksi karagenin

Kelompok	AUC (mL.jam) - Mean \pm SEM	% DAI - Mean \pm SEM
Kontrol negatif	2,51 \pm 0,17	
Na Diklofenak 13,5 mg/kg BB	1,09 \pm 0,21	56,38 \pm 8,49
Ekstrak daun sirsak 0 kGy 50 mg/kg BB	1,73 \pm 0,13	30,98 \pm 5,23
Ekstrak daun sirsak 0 kGy 100 mg/kg BB	1,73 \pm 0,20	30,95 \pm 7,80
Ekstrak daun sirsak 0 kGy 200 mg/kg BB	1,80 \pm 0,26	28,09 \pm 10,28
Ekstrak daun sirsak 5 kGy 50 mg/kg BB	0,78 \pm 0,10	68,88 \pm 3,85
Ekstrak daun sirsak 5 kGy 100 mg/kg BB	0,47 \pm 0,04	81,13 \pm 1,76
Ekstrak daun sirsak 5 kGy 200 mg/kg BB	0,58 \pm 0,08	76,68 \pm 3,02
Ekstrak daun sirsak 10 kGy 50 mg/kg BB	0,70 \pm 0,07	72,19 \pm 2,61
Ekstrak daun sirsak 10 kGy 100 mg/kg BB	0,59 \pm 0,08	76,30 \pm 3,00
Ekstrak daun sirsak 10 kGy 200 mg/kg BB	0,47 \pm 0,04	81,18 \pm 1,60

Menurut data harga AUC volume udem terhadap waktu (Tabel 5), nampak bahwa setelah diberikan Na diklofenak dan ekstrak daun sirsak ada penurunan harga AUC dibanding kelompok kontrol negatif ($p < 0,05$). Penurunan harga AUC yang signifikan dibanding

kontrol negatif menunjukkan bahwa pemberian perlakuan tersebut memiliki efek antiinflamasi. Harga prosentase daya antiinflamasi dapat dilihat pada Table 5.

6. Hasil pengujian imunomodulator ekstrak daun sirsak pada tikus

Pada penelitian ini ekstrak daun sirsak. tikus yang digunakan disari dengan menggunakan etanol yang merupakan pelarut yang dapat menarik senyawa polar maupun semipolar yang kemungkinan terkandung di dalam daun sirsak. Ekstrak tersebut selanjutnya diradiasi dengan kekuatan 10 kGy dan digunakan untuk penelitian uji imunomodulator dan digunakan kontrol tanpa radiasi (0 kGy). Sebagai pembandingnya digunakan kontrolnya yang tidak diradiasi (0 kGy). Penelitian ini menunjukkan bahwa bahwa pemberian ekstrak etanol daun sirsak (0 dan 10 kGy) secara peroral memiliki efek imunomodulator yang relatif signifikan pada mencit berdasarkan pengamatan proliferasi limfosit dan fagositosis makrofag. Pemberian radiasi tidak berpengaruh secara signifikan terhadap efek immunomodulator.

Tabel 6. Perubahan tingkat proliferasi limfosit kelompok mencit akibat perlakuan ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) (EAM) (0 dan 10 kGy) selama 14 hari.

Kel	Perlakuan	Limfosit (% kontrol) (Purata ± SEM)
Ekstrak etanol sirsak (0 kGy)		
I.	Kontrol CMC Na 0.5%	100.89 ± 4.06
II.	EAM 50 mg/kg	102.58 ± 1.49
III.	EAM 100 mg/kg	105.53 ± 2.53*
IV.	EAM 200 mg/kg	108.08 ± 4.23*
Ekstrak etanol sirsak (10 kGy)		
I.	Kontrol CMC Na 0.5%	100.06 ± 2.20
II.	EAM 50 mg/kg	100.30 ± 2.84
III.	EAM 100 mg/kg	104.31 ± 2.42*
IV.	EAM 200 mg/kg	110.99 ± 1.21*

* $p < 0.05$ menunjukkan perbedaan yang bermakna terhadap kelompok kontrol CMC Na 0.5%

Limfosit memiliki kemampuan untuk membedakan benda asing dari jaringannya sendiri, karena memiliki reseptor di permukaan sel, *Toll Receptor Cell* (TCR). Limfosit T (Sel T) berfungsi membantu sel B dalam memproduksi antibodi, mengenal dan menghancurkan sel yang terinfeksi, mengaktifkan makrofag dalam fagositosis dan mengontrol ambang dan kualitas sistem imun [5]. Pemberian ekstrak etanol sirsak dosis 100 dan 200 mg/kg BB (0 dan 10 kGy) terbukti meningkatkan tingkat proliferasi limfosit dibanding kontrol (Tabel 6). Adanya kandungan senyawa yang terkandung didalam ekstrak

seperti flavonoid, alkaloid maupun polifenol yang kemungkinan bertindak sebagai imunomodulator [6,7].

Selanjutnya pada penelitian ini juga diteliti efek ekstrak etanol daun sirsak terhadap aktivitas makrofag. Makrofag berperan penting pada mekanisme kerja sistem imunitas, baik pada sistem imunitas seluler maupun sistem imun humoral [8,9]. Makrofag merupakan salah satu efektor yang berperan untuk mengeliminasi parasit melalui mekanisme fagositosis pada sistem imun tak spesifik. Aktivitas makrofag dapat ditingkatkan dengan agen imunostimulansia, baik berupa vaksin maupun senyawa kimia termasuk senyawa dari bahan alam. Sehingga pada penelitian ini dilakukan untuk meneliti efek imunomodulator dari bahan alam ekstrak etanol daun sirsak terhadap aktivitas fagositosis makrofag.

Tabel 7. Aktivitas fagositosis makrofag kelompok mencit akibat perlakuan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) (EAM) (0 dan 10 kGy) selama 14 hari.

Kel	Perlakuan	Jumlah makrofag yang memfagositosis lateks (%) (Purata ± SEM)	Jumlah lateks yang difagositosis 120 makrofag (Purata ± SEM)
Ekstrak (0 kGy)			
I.	Kontrol CMC Na 0.5%	60.42 ± 8.54	133.80 ± 28.97
II.	EAM 50 mg/kg	60.84 ± 8.17	132.50 ± 37.86
III.	EAM 100 mg/kg	60.84 ± 8.15	138.60 ± 26,67
IV.	EAM 200 mg/kg	69.75 ± 3.97*	162,70 ± 21,42*
Ekstrak (10 kGy)			
I.	Kontrol CMC Na 0.5%	83.42 ± 4.20	260.30 ± 41.32
II.	EAM 50 mg/kg	85.42 ± 6.47	307.38 ± 50.36
III.	EAM 100 mg/kg	79.17 ± 4.11	247.57 ± 8.77
IV.	EAM 200 mg/kg	79.58 ± 4.24	292.40 ± 89.01

*p<0.05 menunjukkan perbedaan yang bermakna terhadap kelompok kontrol CPA

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun sirsak dosis 200 mg/kg BB (0kGy), terbukti secara bermakna meningkatkan jumlah dan aktivitas makrofag dalam memfagositosis lateks dan pada dosis radiasi 10 kGy dosis 200 mg/kg BB juga menunjukkan kecenderungan meningkatkan jumlah lateks yang difagosit walaupun secara statistik tidak bermakna (Tabel 7.).

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak dosis 100-200 mg/kg BB memiliki aktivitas imunostimulator. Pengaruh radiasi tidak bermakna terhadap limfosit maupun fagositosis makrofag.

7. Hasil pengujian antikanker daun sirsak

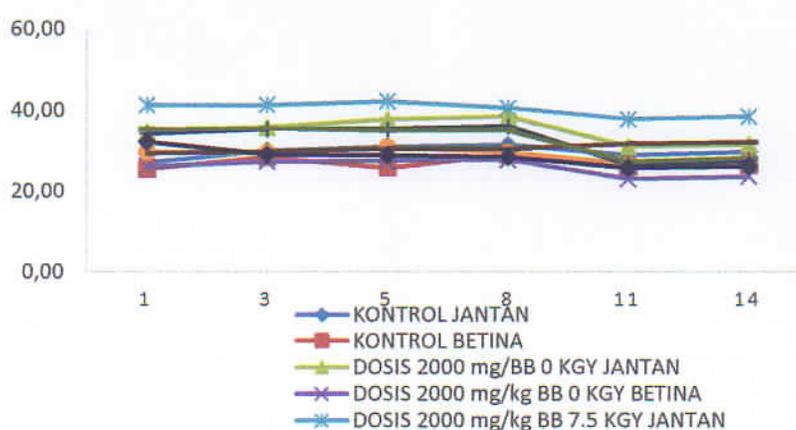
Telah diperoleh % inhibisi dari 80 ppm ekstrak etanol dari daun sirsak kontrol dan yang diirradiasi 7,5 kGy terhadap sel HeLa, 92 dan 85%; ekstrak etil asetat 74 dan 87%; % inhibisi dari 16 ppm fraksi ke-8 adalah 74 dan 70%.



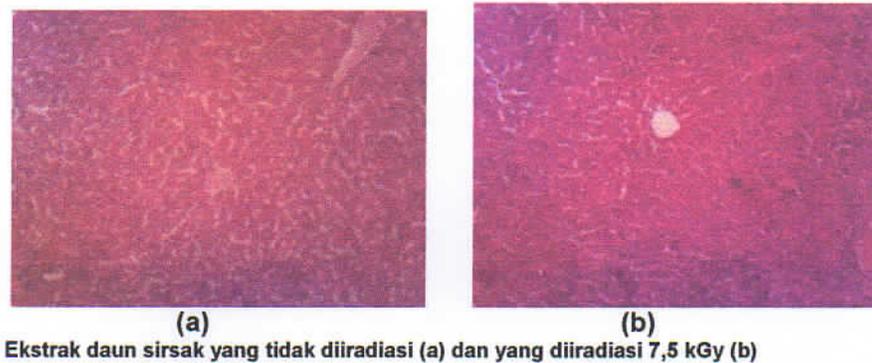
Gambar 5. Penanaman sel kanker ke dalam media tumbuh dan menghitung sel; Sel kanker MCF-7
 Juga telah diperoleh % Inhibisi dari 80 ppm ekstrak etanol daun sirsak kontrol dan yang diirradiasi 7,5 kGy terhadap sel kanker payudara MCF-7 78 dan 74%; ekstrak etil asetat 74 dan 75%; % inhibisi dari 16 ppm fraksi ke-8 adalah 72 dan 72%.

8. Hasil pengujian toksisitas daun sirsak pada mencit

Hasil uji toksisitas akut menunjukkan bahwa secara keseluruhan berdasarkan hasil pemeriksaan histopatologi pemberian sediaan uji ekstrak etanol daun sirsak yang tidak diirradiasi dan yang diirradiasi (7.5 kGy) pada limit test dosis 2.000 dan 5.000 mg/kg BB tidak menunjukkan spektrum wujud efek toksik – khas yang berarti pada organ-organ vital mencit jantan dan betina (Gambar 7).



Gambar 6. Grafik berat badan mencit sampai hari ke-14



(a) Ekstrak daun sirsak yang tidak diiradiasi (a) dan yang diiradiasi 7,5 kGy (b)

Gambar 7. Hasil uji histologi jaringan hepar mencit yang diberi dosis 5.000 mg/kg

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. hasil analisis sampel dengan FTIR menunjukkan terbentuknya ikatan hydrogen antara komponen biopolymer (kitosan dan kolagen) dengan mineral (HA) yang terjadi pada pita bilangan gelombang 3470 dan 2885 cm^{-1} . Di samping itu, foto SEM juga menunjukkan dukungan yang positif dari keberhasilan scaffold ini, dimana komponen yang membangun komposit ini interkoneksi satu dengan lainnya. Kurva DTG menunjukkan bahwa komposit secara termal stabil hingga suhu 200 °C. Terdapat dua kehilangan massa dari komposit scaffold yaitu yang berkaitan dengan evaporasi dari kandungan air dan degradasi dari kitosan-kolagen. Serapan air scaffold tanpa gelasi lebih tinggi dibandingkan dengan gelasi. Iradiasi dapat meningkatkan serapan air.
2. Perlakuan iradiasi sinar gamma pada dosis 10 kGy dapat menurunkan persentase rendeman ekstrak daun sirsak, menurunkan angka kuman sebesar lima desimal, dan menurunkan angka kapang sebesar empat desimal. Namun perlakuan iradiasi tidak mempengaruhi khasiatnya sebagai antidiabetes, antiinflamasi, imunomodulator, antikanker, dan tidak toksik melalui uji toksistas akut pada mencit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kepala PAIR BATAN yang telah menyetujui penelitian melalui DIPA 2015. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu baik moril maupun materiil sehingga kegiatana penelitian dapat terlaksana sesuai dengan yang direncanakan.

DAFTAR PUSTAKA

A. Komposit kitosan-kolagen-HA sebagai biomaterial pengganti graf tulang

1. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, and Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 2014, 9:18
2. Vaccaro AR. The Role of the Osteoconductive Scaffold in Synthetic Bone Graft. *Orthopedics* 2002, 25(5), 571-578.
3. Sotto-Maior BS, Senna PM, Aarestrup BJV, Ribeiro RA, Picorelli Assis NMS, Bel Cury AAD. Effect of bovine hydroxyapatite on early stages of bone formation. *Rev Odonto Cienc* 2011;26(3):198-202
4. Venkatesan J, Lowe B, Manivasagan P, Kang KH, Chalisserry EP, Anil S, Kim DG, and Kim SK. Isolation and Characterization of Nano-Hydroxyapatite from Salmon Fish Bone. *Materials* 2015, 8, 5426-5439
5. Mondal S, Mondal B, Dey A, and Mukhopadhyay SS. Studies on Processing and Characterization of Hydroxyapatite Biomaterials from Different Bio Wastes. *Journal of Minerals & Materials Characterization & Engineering* 2012, Vol. 11, No.1, pp.55-67.
6. Hui P, Meena SL, Singh G, Agarawal RD, and Praksh S. Synthesis of Hydroxyapatite Bio-ceramic Powder by Hydrothermal Method. *Journal of Minerals & Materials characterization & Engineering* 2010, 9(8), 683-692.
7. Langer R and Vacanti JP. *Tissue Engineering*. Science 1993, Vol. 260, 5110, 920-926.
8. Hasan MAA, Li TP, Noor ZZ. Coagulation and Flocculation Treatment of Waste Water in Textile Industry Using hitosan. *Journal of Chemical and Natural Resources Engineering*, Vol.4(1):43-53
9. Qin Y, Shi B, and Liu J. Application of hitosan and Alginate in Treating Waste Water containing Heavy Metal Ions. *Indian Journal of hemical Technology* 2006, 13, 464-469.
10. Niekraszewicz A. Chitosan Medical Dressings. *Fibers & Textiles in Eastern Europe* 2005, Vol. 13, No. 6 (54), 16-18.
11. Dutta PK, Dutta J, and Tripathi VS. chitin and chitosan: Chemistry, Properties, and Applications. *Journal of Scientific & Industrial Research* 2004, 63, 20-31.
12. Danilchenko SN, Kalinkevich OV, Pogorelov MV, Kalinkevich AN, Sklyar AM, Kalinichenko TG, Ilyashenko VY, Starikov V, Bumeyster VI, Sikora VZ, Sukhodub LF, Mamalis AG, Lavrynenko SN, and Ramsden JJ. Chitosan-hydroxyapatite composite biomaterials made by a one step co-precipitation method: preparation, characterization and in vivo tests. *Journal of Biological Physics and Chemistry* 2009, 9, 119-126
13. Maachoua H, Balb KE, Balb Y, Chagnesd A, Coted G and Alliouchea D. Characterization and In Vitro Bioactivity of Chitosan/Hydroxyapatite Composite Membrane Prepared by Freeze-Gelation Method. *Trends Biomater. Artif. Organs* 2008, Vol 22(1), 16-27.

14. Chenite A, Bushman M, Wang D, Chaput C, and Kandani N. Rheological characterization of Thermogelling chitosan/Glycerol-Phosphate Solution. *Arbohydrate Polymers* 2001, 46, 39-47
15. Maa L, Gao C, Maa Z, Zhou J, Shen J, Hu X, Han C. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials* 2003, 24 4833–4841
16. Szatkowski T, Kolodziejzak-Radzimska A, Zdzarta J, Szwarz-Rzepka K, Paukszta D, Wysokowki M, Ehrlich H, and Jesionowski T. Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite/chitosan composites. *Physicochem. Probl. Miner. Process.* 2015, 51(2), 575–585

B. Daya anti inflamasi, diabetes simplisia ekstrak daun sirsak yang diiradiasi dengan radiasi gamma

1. Sunarjono H. 2005. *Sirsak dan Srikaya : Budi Daya untuk Menghasilkan Buah Prima*. Bogor: Penebar Swadaya.
2. Taylor L. 2002. *Technical Data Report For Graviola Annona muricata*, 2nd edition. Austin : Sage Press.
3. Wijayanti, M.A., 1996, Peranan Makrofag dalam Imunitas terhadap Infeksi Malaria: Kajian Kemampuan Fagositosis dan Sekresi Reactive Oxygen Intermediates Makrofag Peritoneum Mencit yang Diimunisasi dan tidak Di-imunisasi In Vitro, *Tesis*, Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
4. American Cancer Society, 2005, *Cancer Facts and Figures*, American Cancer Society, Atlanta, GA: American Cancer Society.
5. Baratawidjaya, KG, 2000. *Imunologi Dasar*, Balai Penerbit Fak. Kedokteran UI, Jakarta.
6. BPOM, 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Depkes RI.
7. Burnet, M. 1995. *The helper T-cell responses*, pp. 139-154. In I. R. Tizard (ed.). *Immunology, an Introduction*, 4th Ed. Saunders, Philadelphia.
8. Butt, A.J., McNeil, C. M., Musgrove, E.A., and Sutherland, R.L., 2005, Downstream Targets Of Growth Factor and Oestrogen Signalling and Endocrine Resistance: The Potential Roles of C-Myc, Cyclin D1 And Cyclin E, *Endocrine-Related Cancer*, 12, 47-59.
9. Clark, B. D., I. Bedrosian, R. Schindler, F. Cominelli, J. G. Cannon, A. R. Shaw, and C. A. Dinarello. 1991. Detection of interleukin 1 alpha and 1 beta in rabbit tissues during endotoxemia using sensitive radioimmunoassays. *J. Appl. Physiol.* 71: 2412-2418.