

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Sirsak

1. Sistematika tanaman

Klasifikasi daun sirsak (*Annona muricata* L) menurut Sunarjono (2005) sebagai berikut:

Divisi	: <i>Spermatiphyta</i>
Sub-divisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledoneae</i>
Ordo	: <i>Ranales</i>
Famili	: <i>Annonaceae</i>
Genus	: <i>Annona</i>
Spesies	: <i>Annona muricata</i> L.



Gambar 1. Foto daun sirsak (Anonim 2018).

2. Nama lain

Tanaman sirsak memiliki nama yang berbeda-beda di setiap wilayah Indonesia yaitu angka sebrang, angka landa (Jawa), angka walanda (Sunda), angka buris (Madura), srikaya jawa (Bali), deureuyan belanda (Aceh), durio ulondro (Nias), serekaja (Bugis), jambu landa (Lampung), durian betawi (Minangkabau), sedangkan diberbagai negara sirsak dikenal dengan nama

guayabano (Filipina), durian benggala (India), sauersack sausap (Papua Nugini) dan stachelannone (Jerman) (Sunarjono 2005).

3. Morfologi tanaman

Sirsak merupakan tanaman yang tumbuh kisan iklim yang cukup luas, pada dataran rendah (0 m dari permukaan laut/dpl hingga 1.200 mdpl). Sirsak merupakan tanaman tropis yang bersifat tahunan. Sirsak merupakan tanaman perdu dengan tinggi sekitar 3–10 m. Tanaman sirsak memiliki kayu yang keras, tetapi umumnya kecil, agak liat, dan mudah patah. Daun sirsak sendiri memiliki bentuk bulat panjang dengan ujung lancip pendek, berukuran (8–16) cm × (3 × 7) cm. Tangkai daun panjangnya 3–7 mm. Daun tuanya berwarna hijau tua, sedangkan daun mudanya berwarna hijau kekuningan. Daun sirsak tebal dan agak kaku dengan urat daun menyirip atau tegak pada urat daun utama. Aroma yang ditimbulkan daunnya terkadang menimbulkan bau yang tidak sedap (Mardiana dan Ratnasari 2011).

Akar tanaman sirsak cukup dalam karena dapat menembus tanah sampai kedalaman 2 m. Tanaman sirsak berbunga sepanjang tahun. Bunga muncul dari ketiak daun, cabang, ranting, dan ujung cabang. Bunga-bunga akan muncul secara teratur, 1–2 kuntum berada pada perbungaan yang pendek, berwarna kuning kehijauan. Buah sirsak merupakan buah yang semu, daging buah lunak atau lembek, berwarna putih, berserat, dan berbiji hitam pipih. Kulitnya berduri dan tangkal buah menguning. Buah sirsak yang sudah matang mempunyai berat sekitar 500 g, warna kulit agak terang, hijau kekuningan, dan mengkilap (Mardiana dan Ratnasari 2011).

4. Kandungan kimia

Daun sirsak (*Annona muricata* L.) mengandung berbagai macam senyawa kimia yaitu alkaloid, saponin, tanin, kumarin dan flavonoid (Gavamukulya *et al.* 2014).

4.1. Alkaloid. Alkaloid pada daun sirsak teruji dapat membunuh larva nyamuk *Aedes aegypti* (Harfriani 2012). Alkaloid memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 35218 (Sari 2010).

4.2. Saponin. Saponin memiliki potensi untuk mencegah infeksi bakteri *E. coli* dengan mengganggu permeabilitas membran sel mikroba yang mengakibatkan kerusakan membran sel (Permatasari 2013). Saponin juga memiliki efek antidiare dengan menghambat pelepasan histamin sehingga sekresi dan mortalitas intestinal berkurang (Anas *et al.* 2016).

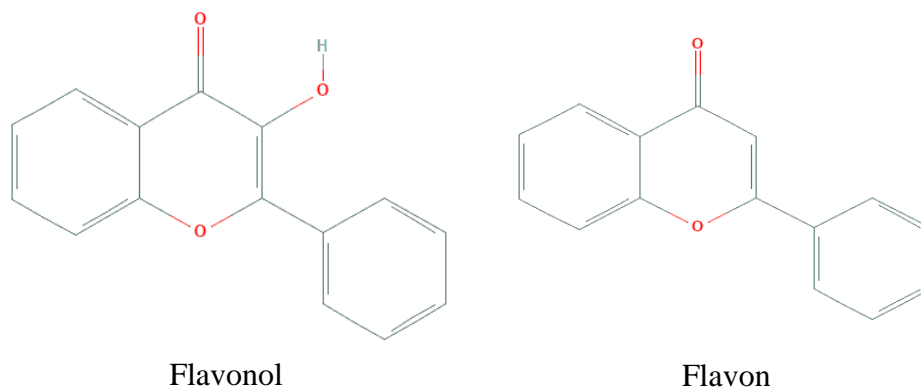
4.3. Tanin. Tanin merupakan zat adstringensia yang mampu berikatan dengan membran mukosa sehingga mampu membentuk pembatas yang resisten sehingga mampu mengurangi cairan yang masuk ke dalam saluran cerna. Adstringen bersifat meringankan diare dengan menciutkan selaput lendir usus, mengendapkan protein pada permukaan usus sehingga melindungi usus lebih tahan terhadap iritasi atau rangsangan senyawa kimia yang mengakibatkan diare (Anas *et al.* 2016).

4.4. Kumarin. Kumarin merupakan senyawa yang memiliki aktivitas antifungi, kumarin memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan miselium jamur *C. citri* (Labib *et al.* 2015). Kumarin dapat membantu mencegah kerusakan sel dari radikal bebas, sehingga menurunkan mutasi yang menjadi penyebab terjadinya sel kanker (Rusdiana 2018).

4.5. Flavonoid. Flavonoid merupakan metabolit sekunder yang terdapat pada vakuola tanaman, salah satu fungsi flavonoid pada tanaman adalah sebagai zat warna pada bunga (Sumiati *et al.* 2016). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Neldawati *et al.* (2013), daun sirsak mengandung flavonoid jenis flavon dan flavonol, sedangkan penelitian Nawwar *et al.* (2012) daun sirsak mengandung quercetin 3-O- α -rhamnosyl-(1^{'''}→6^{''})- β -sophoroside. Flavonoid daun sirsak memiliki aktivitas sebagai antioksidan (Sari *et al.* 2016 dan Sitompul *et al.* 2017).

5. Manfaat dan khasiat

Daun sirsak dapat digunakan untuk menurunkan kadar asam urat (Artini 2012), menurunkan kadar glukosa darah (Florence 2014). Kandungan flavonoid (termasuk flavonol dan flavon) dalam daun sirsak dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan karena mampu menghambat autooksidasi melalui mekanisme penangkapan radikal dengan cara mendonorkan satu elektron dari elektron bebas ke dalam radikal bebas (Pokorny 2001).



Gambar 2. Struktur Flavonol dan Flavon (Anonim 2018).

Hasil penelitian Sari *et al.* (2016), ekstrak daun sirsak mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat. Nilai IC_{50} dari ekstrak daun sirsak adalah 41,52 ppm. IC_{50} didefinisikan sebagai jumlah antioksidan yang diperlukan untuk menurunkan konsentrasi awal DPPH sebesar 50% maka, semakin kecil nilai IC_{50} berarti semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Berdasarkan hasil penelitian Sitompul dan Manjouito (2017), nilai IC_{50} ekstrak daun muda dan daun tua sirsak sama memiliki aktivitas antioksidan dengan kategori sangat kuat yaitu sebesar 46,77 $\mu\text{g/ml}$ dan 44,37 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini dapat dilihat dari nilai IC_{50} dengan intensitas antioksidan pada tingkat kekuatan antioksidan dengan metode DPPH yaitu $<50 \mu\text{g/ml}$ menunjukkan kekuatan antioksidan sangat kuat, nilai 51-100 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan kekuatan antioksidan kuat, nilai 101-150 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan kekuatan antioksidan sedang, nilai 151-200 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan kekuatan antioksidan lemah.

B. Perasan

1. Pengertian perasan

Perasan adalah cara yang digunakan untuk memperoleh sari perasan sebagai material awal digunakan tumbuhan segar yang dihaluskan. Sari perasan sendiri adalah larutan dalam air dan memiliki seluruh bahan yang terkandung dalam tumbuhan segarnya, sebanding dengan material awalnya yang tetap tinggal hanyalah bahan yang tidak terlarut (Wulandari 2009). Perasan bisa dilakukan secara manual maupun mekanik. Cara manual adalah cara tradisional yang dilakukan dengan cara dihaluskan atau dipotong atau dilumatkan kemudian disaring dengan

menggunakan kain, sedangkan cara mekanik dilakukan dengan cara diblender (Trisunuwati & Setyowati 2017).

2. Pengeringan

Pengeringan merupakan cara untuk menurunkan kadar air sampai batas tertentu sehingga reaksi biologis terhenti dan mikroorganisme tidak bisa hidup di dalamnya. Berdasarkan energinya pengeringan dapat dibedakan menjadi pengeringan alami dan pengeringan buatan. Pengeringan alami merupakan pengeringan yang dilakukan dengan cara menjemur di bawah sinar matahari. Pengeringan ini bergantung pada cuaca, jika cuaca tidak memungkinkan proses pengeringan akan memerlukan waktu yang cukup lama. Kelemahan dari pengeringan dengan cara penjemuran diantaranya adalah mudah terkontaminasi, perlu tempat yang luas, dan dengan waktu yang lama (Syahrul *et al.* 2016). Menurut Prasetyaningrum (2010), lama pengeringan 2-7 hari tergantung dari produk yang dikeringkan dan kualitas produk dari hasil pengeringan tidak seragam.

Pengeringan buatan menggunakan alat mekanis atau pengering buatan, sehingga pengeringan tidak bergantung pada cuaca. Pengeringan mekanis memerlukan energi untuk memanaskan bahan dan menguapkan air pada bahan. Keuntungan dari pengeringan buatan yaitu tidak memerlukan tempat yang luas serta pengeringan dapat dikontrol. Pengeringan buatan memerlukan investasi awal yang cukup besar (Syahrul *et al.* 2016). Salah satu cara pengeringan buatan yaitu dengan oven yang dimana udara panas dihasilkan melalui proses pemanasan baik dengan *steam*, listrik atau gas hasil pembakaran. Pemanasan menggunakan oven membutuhkan waktu yang lebih singkat, kadar air dalam produk dapat dikontrol, dan tidak bergantung pada cuaca (Prasetyaningrum 2010). Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode *freeze dry*.

Prinsip dasar pengeringan menggunakan metode *freeze dry* adalah lebih menitik beratkan pada proses penghilangan kandungan air dalam suatu bahan atau produk yang telah membeku tanpa melalui fase cair terlebih dahulu. Keunggulan pengeringan dengan metode ini yaitu dalam mempertahankan mutu hasil pengeringan, terutama untuk produk-produk yang sensitif terhadap panas. Keunggulan lainnya adalah dalam mempertahankan stabilitas produk (menghindari

perubahan aroma, warna, dan unsur organoleptik lainnya), dan dapat mempertahankan stabilitas struktur bahan (pengkerutan dan perubahan bentuk setelah pengeringan sangat kecil (Yulvianti *et al.* 2015).

Pengeringan dengan metode *freeze dry* memiliki dua tahapan proses yakni proses pembekuan dan proses pengeringan (sublimasi), untuk proses pembekuan bahan yang telah siap dimasukkan dalam ruang pembeku dengan suhu sekitar -40°C . Produk akan cepat membeku pada suhu ini dan akan menghasilkan produk beku yang tidak merusak tekstur. Tahap selanjutnya adalah pengeringan (proses sublimasi), proses ini dilakukan dengan cara memasukkan produk beku ke dalam ruangan vakum. Kondisi selama proses harus tetap dijaga sehingga bisa dijamin bahwa proses sublimasi bisa terjadi, dan tidak terjadi pelelehan. Kristal-kristal es yang berada pada struktur produk dipaksa untuk langsung mengalami sublimasi. Hal tersebut bisa dicapai dengan menjaga keadaan ruangan vakum, dan suhu kemudian dinaikkan secara terkontrol sampai mencapai suhu sekitar 38°C sehingga terjadi proses sublimasi. Berdasarkan mekanisme alat *freeze dry*, uap air yang dihasilkan kemudian disedot dan dikondensasi sehingga tidak membahasi produk yang sedang dikeringkan (Hariyadi 2013).

C. Daya Ingat

1. Uraian dan klasifikasi ingatan

Memori (daya ingat) yaitu kemampuan individu untuk menyimpan informasi kemudian informasi tersebut dapat dipanggil kembali untuk dapat dipergunakan beberapa waktu kemudian (Putranto 2009). Para psikolog mendefinisikan ingatan (memori) sebagai penyimpanan suatu informasi atau pengalaman seiring dengan berjalannya waktu. Ingatan tersebut terjadi melalui tiga proses: encoding informasi, penyimpanan informasi, dan pengambilan kembali informasi (King 2010).

Informasi yang kita ingat sebagian ada yang kurang dari satu detik, selama setengah menit, dan sebagian yang lain selama beberapa menit, jam, tahun, dan bahkan seumur hidup.

1.1. Ingatan berdasarkan tempat menyimpan data

1.1.1. Ingatan sensoris. Ingatan sensori menyimpan informasi dalam bentuk sensoris dari indra penglihatan, pendengaran atau indra lainnya dalam waktu sekejap, tetapi informasi ini juga akan hilang dengan cepat (King 2010). Informasi tersebut akan ditransfer bila melalui perhatian dan proses registrasi (berupa *attention*) (Putra dan Issetyadi 2010).

1.1.2. Ingatan jangka pendek (*short-term memory*). Ingatan jangka pendek merupakan sistem ingatan yang kapasitasnya terbatas saat informasi dipertahankan sekitar 30 detik. Ingatan jangka pendek dapat menyimpan informasi dalam jangka waktu yang lebih lama dibandingkan dengan ingatan sensoris (King 2010). Ingatan jangka pendek bila dilakukan latihan, informasi tersebut akan disimpan di ingatan jangka panjang (Putra dan Issetyadi 2010).

1.1.3. Ingatan jangka panjang (*long-term memory*). Ingatan jangka panjang merupakan jenis ingatan yang relatif permanen, menyimpan jumlah informasi yang luar biasa besar untuk jangka waktu yang lama (King 2010). Ingatan ini terbagi menjadi substruktur ingatan eksplisit dan ingatan implisit.

Ingatan eksplisit adalah pengumpulan informasi yang secara sadar seperti fakta atau kejadian tertentu. Ingatan eksplisit dibagi menjadi dua subjenis, yaitu ingatan episodik dan ingatan semantik. Ingatan episodik merupakan penyimpanan mengenai informasi mengenai dimana, kapan, dan apa yang terjadi dalam hidup. Ingatan semantik adalah pengetahuan seseorang mengenai dunia, mencakup keahlian seseorang, pengetahuan umum yang dipelajari disekolah, pengetahuan sehari-hari mengenai makna dari suatu kata, orang terkenal, dan hal-hal umum lainnya (King 2010).

Menurut Cassenti & Carlson (2008), memori spasial termasuk dalam memori eksplisit. Memori spasial berkaitan dengan kemampuan mengingat ruang, mengenali bentuk, jarak, dan luas, serta mengetahui arah atau posisi seseorang. Seseorang akan mengalami kesulitan dalam memahami posisi diri, melihat bentuk dan ruang bidang, tidak dapat mengingat arah atau letak suatu benda, serta tidak dapat memperkirakan jarak suatu tempat jika tanpa adanya memori spasial (Matrangelo *et al.* 2009).

Ingatan implisit merupakan ingatan yang terkait dengan mengingat keahlian dan persepsi sensorisnya tidak disadari dibandingkan dengan secara sadar mengingat fakta, misalnya keahlian bermain tenis atau mengetik dengan *keyboard* komputer (King 2010).

1.2. Ingatan berdasarkan waktu keawetannya

1.2.1. Semantik. Semantik merupakan memori tentang makna simbol dan kata, dengan memori ini kita bisa membedakan antara anjing dengan kucing. Memori ini disimpan di otak pada bagian *gyrus*.

1.2.2. Implisit. Implisit merupakan memori yang menyangkut kecakapan tertentu, misalnya bersepeda atau berenang. Memori ini disimpan dalam serebrum.

1.2.3. Working. *Working* atau memori jangka pendek yang biasa diandalkan saat melakukan kegiatan sehari-hari seperti mengingat kalimat pertama saat lawan bicara sedang mengucap kalimat yang kedua. Memori ini disimpan di prefrontal korteks pada otak.

1.2.4. Episodik. Episodik merupakan memori yang menyangkut pengalaman yang terjadi, misalnya judul film yang ditonton semalam, dimana memarkir kendaraan., dan sebagainya. Memori ini akan mengalami kemunduran seiring dengan bertambahnya usia. Memori ini disimpan di hippocampus.

1.2.5. Remote. *Remote* merupakan gudang data yang juga umumnya akan melemah seiring bertambahnya usia. Memori ini menyangkut data-data seperti urutan nama preseiden RI dari pertama sampai yang menjabat sekarang, ibukota provinsi yang ada di Indonesia, dan sebagainya. Memori ini disimpan di otak pada bagian selebral korteks (Uno 2009).

2. Fungsi kognitif

Fungsi kognitif merupakan kemampuan berfikir dan rasionalisasi, termasuk proses belajar, mengingat, menilai, orientasi, persepsi, dan memperhatikan. Gangguan fungsi kognitif berkaitan erat dengan fungsi otak karena kemampuan untuk berfikir akan dipengaruhi oleh otak (Herlina 2010). Gangguan fungsi kognitif merupakan gangguan fungsi luhur otak yang berupa gangguan orientasi, perhatian atau atensi, konsentrasi, daya ingat, dan bahasa (Lisnaini 2012).

3. Radikal bebas, stres oksidatif dan antioksidan terhadap penurunan daya ingat

Radikal bebas merupakan bentuk senyawa oksigen reaktif, yang secara umum diketahui sebagai senyawa yang memiliki elektron yang tidak berpasangan. Elektron yang tidak berpasangan dalam senyawa radikal memiliki kecenderungan untuk mencari pasangan dengan cara, elektron dari senyawa lain ditarik atau diserang sehingga, mengakibatkan terbentuknya radikal baru (Winarsi 2007).

Radikal bebas berasal dari berbagai reaksi oksidasi biologi (Widayati 2018). Manusia dalam sehari-hari tentu sangat membutuhkan oksigen untuk menjalankan metabolisme basal. Terbentuknya radikal bebas juga dapat dipicu dari berbagai faktor misalnya, ketika komponen makanan diubah menjadi bentuk energi melalui proses metabolisme. Proses metabolisme ini sering terjadi kebocoran elektron. Kondisi ini mudah sekali terbentuk radikal bebas. Radikal bebas juga bisa terbentuk dari senyawa lain yang sebenarnya bukan radikal bebas, tetapi mudah berubah menjadi radikal bebas misalnya, hidrogen peroksida (H_2O_2), ozon, dan lain-lain. H_2O_2 merupakan oksidan yang relatif lemah, namun mampu menginisiasi reaksi oksidatif dan membentuk spesies radikal bebas (Winarsi 2007).

Tubuh akan terus-menerus membentuk radikal bebas, baik melalui metabolisme sel normal, dan pengaruh dari luar tubuh seperti polusi lingkungan, ultraviolet (UV), asap rokok, dan lain-lain. Faktor-faktor tersebut secara sinergis meningkatkan jumlah radikal bebas di dalam tubuh. Tingginya radikal bebas akan mengakibatkan sel-sel dalam tubuh mengalami degenerasi, proses metabolisme menjadi terganggu, dan respon imun juga akan menurun. Faktor-faktor ini akan memicu tumbuhnya berbagai penyakit degeneratif sehingga, tubuh memerlukan antioksidan yang dapat membantu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas (Winarsi 2007).

Antioksidan merupakan senyawa pendonor elektron atau reduktan. Antioksidan juga dapat menghambat reaksi oksidasi dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif (Winarsi 2007). Sumber antioksidan dapat berupa antioksidan alami. Antioksidan alami selain untuk melindungi tubuh dari serangan radikal bebas juga mampu memperlambat tumbuhnya penyakit kronik

yang disebabkan oleh penurunan *Reactive Oxygen Species* (ROS) terutama radikal hidroksil dan radikal superoksida (Wahdaningsih *et al.* 2011).

ROS merupakan representasi kategori yang luas, merupakan derivat oksigen radikal dan nonradikal. Derivat oksigen meliputi ion OH, superoksida, nitric oxide, dan peroksil, sedangkan derivat oksigen yang nonradikal meliputi ozon, singlet oksigen, lipid peroksida, dan hidrogen peroksida. Terdapat berbagai macam ROS, namun yang paling banyak dipelajari karena efeknya yang berbahaya dan merusak yaitu superoksida ($O^{\cdot-}$), hidroksil ($^{\cdot}OH$), dan perhidroksil (O_2H). Kerusakan jaringan akibat ROS dikenal dengan stres oksidatif (Widayati 2018).

Stres oksidatif adalah kondisi dimana jumlah radikal bebas yang ada dengan jumlah antioksidan di dalam tubuh tidak seimbang. Antioksidan diperlukan dalam mencegah stres oksidatif. Berdasarkan sumbernya, antioksidan terbagi menjadi dua yaitu antioksidan endogen dan antioksidan eksogen. Antioksidan endogen yaitu enzim-enzim yang sifatnya antioksidan seperti, Superoksida Dismutase (SOD), katalase (Cat), dan glutathione peroksidase (Gpx), sedangkan antioksidan eksogen yaitu antioksidan yang didapat dari luar tubuh atau dari makanan seperti, vitamin C, vitamin E, provitamin A, flavonoid (Werdhasari 2014). Stres oksidatif dapat menyebabkan kerusakan pada berbagai sel di dalam tubuh, termasuk sel yang ada di otak sehingga fungsi kognitif dapat terganggu (Vijayakumar 2012). Gangguan fungsi kognitif merupakan gangguan fungsi luhur otak yang berupa gangguan daya ingat (Lisnaini 2012).

Antioksidan berperan dalam menetralkan kelebihan radikal bebas dan sebagai pelindung dalam melawan efek racun dari radikal bebas sehingga dapat menurunkan terjadinya stres oksidatif yang berkontribusi dalam penurunan daya ingat (Lingga 2012).

4. Ginkgo biloba sebagai peningkat daya ingat

Ginkgo biloba telah lama digunakan dalam pengobatan tradisional Cina, salah satu khasiatnya yaitu meningkatkan pembelajaran dan defisit ingatan. Ginkgo biloba efektif untuk meningkatkan baik memori jangka pendek maupun memori jangka panjang baik pada manusia muda dan tua yang sehat (Chen 2016).

Kandungan yang terdapat dalam ekstrak daun ginkgo biloba yaitu 6% terpenoid dan 24% turunan flavonoid. Terpenoid diwakili oleh ginkgolides A, B, C, J, dan bilobalide. Ginkgolides merupakan antagonis faktor aktivasi dan agregasi trombosit sehingga memiliki potensi untuk meningkatkan sirkulasi darah. Turunan dari senyawa flavonoid ini adalah senyawa flavonol, ginkgo biloba ini terdiri dari 3 flavonol: quercetin, kaemferol, dan isohamnetin. Flavonoid adalah senyawa antioksidan yang dapat menjebak spesies oksigen reaktif (ROS), dan kelat ion logam prooksidan (Ramassamy *et al.* 2007).

Hasil penelitian Chen *et al.* (2016) menunjukkan ekstrak ginkgo biloba dengan dosis 50, 100, dan 200 mg/kg BB tikus dapat menyebabkan penurunan latensi pelarian. Dosis tinggi ekstrak ginkgo biloba (200 mg/kg) dapat mengais radikal bebas. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Prabawati (2018) menunjukkan bahwa dosis ginkgo biloba 9,75 mg/kg BB mencit dapat meningkatkan daya ingat sebesar 65,16%.

D. Metode Uji Daya Ingat

1. Metode uji

Terdapat beberapa metode pengujian daya ingat dan kecerdasan pada hewan uji. Kebanyakan dari metode-metode tersebut didasarkan pada perhitungan waktu latensi. Waktu latensi adalah waktu yang diperlukan hewan uji untuk sampai pada platform.

Berikut ini beberapa metode untuk pengujian peningkatan daya ingat :

1.1. Morris Water Maze. *Morris water maze* merupakan pengujian yang umum digunakan untuk tikus kecil. Pengujian ini terdiri dari kolam melingkar (diameter 122 cm dengan kedalaman dinding 76 cm) dimana hewan uji dilatih untuk melarikan diri dari air dengan cara berenang ke platform (1,5 cm di bawah permukaan air) yang tersembunyi, untuk mengidentifikasi lokasi platform digunakan isyarat ekstra-labirindistal yang melekat pada dinding kolam. Isyarat visual tersebut memiliki warna dan dimensi yang berbeda dan tetap konstan selama percobaan. Parameter yang digunakan dalam uji ini yaitu waktu latensi dan panjang lintasan untuk mencapai platform (Sudarshan *et al.* 2009).

1.2. Fear Conditioning. Pengujian ini dilakukan dalam sebuah ruang dengan lebar 20 cm-16 cm-tinggi 20,5 cm. Bagian atas ruang dipasang lampu. Ruangan dijaga dari cahaya dan kebisingan dari luar. Perilaku hewan uji direkam dengan video analog (percobaan X-Ray) atau digital (GFAP-TK) yang dipasang diatas ruang. Video analog diberi skor dengan *Stopwatch* untuk menilai pembekuan. Pembekuan ini diartikan sebagai tidak adanya gerakan hewan uji, termasuk gerakan *vibrissae*, minimal 0,5 detik. Perangkat lunak *FreezeFrame* digunakan untuk menganalisis rekaman video digital. Dalam pengujiannya hewan uji ditempatkan diruangan kemudian diberikan nada (20 s, 80 dB, 2 KHz) dan kejutan (1 s, 0,7 mA). Pengujian dilakukan selama 3 hari (Saxe *et al.* 2006).

1.3. Y-maze. Pengujian menggunakan alat terbuat dari *Plexiglas* abu-abu atau kayu yang ditutupi kertas hitam dan terdiri dari tiga lengan dengan sudut 120°C diantara masing-masing lengan. Setiap lengan memiliki ukuran panjang 8 cm – lebar 30 cm – tinggi 15 cm. Salah satu lengan labirin diberi pelet makanan, sebagai intensif untuk belajar dan mengingat tata letak. Hewan ditempatkan di bagian bawah T, dan dilatih untuk bergantian antara lengan kiri dan kanan untuk mencari pelet (Savage *et al.* 2014), setelah dilakukan percobaan pada tiap hewan uji, lantai labirin ditutupi dengan serbuk gergaji untuk menghilangkan rangsangan penciuman. Analisis yang dilakukan yaitu jumlah entri dan waktu yang dihabiskan pada masing-masing lengan (MA *et al.* 2007).

1.4. Radial Arm Maze. Labirin ditinggikan 50 cm dari tanah yang terdiri dari delapan lengan dengan ukuran 30 × 5 (cm) dari platform pusat (He *et al.* 2009). Awalnya setiap lengan diberikan umpan tetapi, secara bertahap akan dibatasi pemberiannya (periode pembentukan). Empat lengan labirin diberi umpan pelet dan empat lainnya tidak diberi pelet. Jumlah kesalahan memori referensi (memasuki lengan yang tidak diberi umpan). Jumlah kesalahan memori yang bekerja (masuk kembali ke lengan yang berisi umpan dimana umpan telah dikonsumsi atau lengan tidak diberi umpan), jumlah kegagalan makan (memasukkan lengan yang berisi umpan dan meninggalkan lengan tanpa memakan umpan), dan latensi per entri lengan dicatat (Enomoto *et al.* 2008).

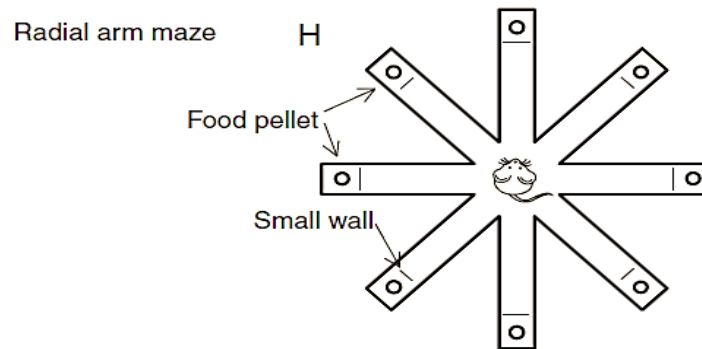
Parameter tipe kesalahan dalam *Radial Arm Maze* yaitu kesalahan tipe A dan kesalahan tipe B. Kesalahan tipe A berupa kesalahan yang diperhitungkan jika tikus memasuki kembali lengan *maze* yang telah dilalui dan kesalahan tipe B yaitu hewan uji memasuki lengan *maze* lebih dari separuh panjang lengan tetapi tidak memakan umpan yang disediakan (Sari *et al.* 2000, diacu dalam Hamidi 2009). Penelitian ini menggunakan tipe kesalahan B.

Cara pengujian menggunakan *Radial Arm Maze* menurut Sari *et al.* (2013), tahap pertama dilakukan uji pendahuluan pada hewan uji selama 12 hari didahului dengan latihan uji *maze* 3 hari. Setelah menjalani uji pendahuluan, hewan uji diberi stres listrik selama 10 menit/hari untuk menimbulkan efek depresi kemudian, dilakukan pencatatan jumlah lintasan yang dilewati. Tahap selanjutnya hewan uji diberikan ekstrak tumbuhan kemudian dilakukan post-test selama 12 hari tetapi, sebelum dilakukan pengujian hewan uji dipuasakan selama 12 jam. Hewan uji selanjutnya diletakkan ditengah *maze*, dibiarkan bergerak ke segala lengan untuk mencari umpan makanan diujung lengan *maze*.

Hewan uji dilakukan adaptasi selama 3 hari, hari pertama hewan uji dimasukkan ke dalam *maze* dan umpan diletakkan di tiga tempat lengan *maze*, yaitu di pintu masuk, di pertengahan, dan di ujung lengan *maze*. Hari kedua umpan diletakkan di dua tempat lengan *maze*, yaitu di bagian tengah dan di ujung lengan *maze*. Hari ketiga umpan hanya diletakkan di ujung lengan *maze*, selanjutnya selama 12 hari berturut-turut dilakukan uji kinerja *maze*. Perlakuan diakhiri setelah hewan uji memakan semua umpan di seluruh ujung lengan *maze* atau selama 10 menit. Jika tikus masuk lebih dari setengah lengan *maze* maka hewan uji dikatakan telah memasuki lengan *maze* dan apabila hewan uji memasuki kembali lengan *maze* yang telah dilalui maka hewan uji dikatakan salah (Rochman *et al.* 2015).

Menurut Zuniarto *et al.* (2017), tahap awal hewan uji diadaptasikan dalam alat *Radial Arm Maze* selama 10 menit tanpa pemberian obat dan makanan dari hari ke-0 sampai hari ke-7. Hari berikutnya dilanjutkan untuk pembelajaran hewan uji disertai pemberian sediaan uji yang telah disiapkan dan disalah satu lengan diberikan makanan sebagai umpan selama 10 hari tetapi, sebelumnya mencit dipuasakan terlebih dahulu selama 12 jam. Tahap pengujian kemampuan daya ingat

dilakukan setelah pemberian sediaan uji dihentikan, namun umpan tetap diberikan yaitu pada hari ke-18.



Gambar 3. Ilustrasi *Radial Arm Maze Test* (Savage & Ma 2014).

2. Pb asetat sebagai penginduksi penurunan daya ingat

Pb asetat digunakan sebagai penginduksi penurunan daya ingat pada mencit. Pb atau lebih dikenal dengan nama timah hitam (timbal) yang merupakan salah satu logam berat yang secara alami terdapat di kerak bumi. Pencemaran dapat terjadi oleh banyak zat, diantaranya adalah logam berat yaitu Pb asetat (Ma'rufah & Adib 2018). Logam Pb banyak ditemukan dalam saluran air, peralatan rumah tangga, zat warna dalam industri kosmetik, dan bahan bakar kendaraan bermotor (Gusnita 2012). Pb asetat juga merupakan polutan beracun yang ada di lingkungan dan kawasan industri. Organ-organ penting yang menjadi target toksisitas Pb antara lain: ginjal, hati, jantung dan otak (Suradkar *et al.* 2010).

Pb bermanifestasi dalam kerusakan oksidatif sebagai akibat dari pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) dan penipisan langsung pertahanan antioksidan. Pb asetat yang dipaparkan dalam tubuh menghasilkan peningkatan H₂O₂ dan MDA, dengan pengurangan pada GSH. Hal ini menunjukkan induksi stres oksidatif selama periode paparan Pb. Peningkatan kadar MDA mungkin karena produksi superoksida, peroksil, dan radikal hidroksil (Oyagbemi *et al* & Ding *et al* 2014).

Menurut Ercal *et al.* (2001), mekanisme Pb dalam pembentukan radikal bebas terdiri dari 2 cara berbeda yang berhubungan, yakni pembentukan ROS dan penekanan sistem antioksidan.

2.1. Pembentukan ROS. Senyawa Pb dapat menghambat *delta aminolevulinic acid dehydrogenase* (DALAD), enzim utama dalam biosintesis heme yang menyebabkan peninggian kadar substrat *aminolevulinic acid* (ALA). Peningkatan kadar ALA menyebabkan pembentukan hidrogen peroksida, radikal superoksida dan juga interaksi keduanya menghasilkan radikal hidroksil, suatu radikal paling reaktif (Ercal *et al.* 2001). Pb dapat berikatan dengan senyawa lain yang memiliki kompleks sulfhidril seperti *aminolevulinic acid dehydrogenase* (ALAD), enzim tersebut berfungsi untuk mengubah *delta-aminolevulinic acid* (ALA) menjadi prophobilinogen yang menjadi bahan dasar pembentukan heme. Enzim ALAD jika diikat oleh timbal maka jumlah ALA akan terakumulasi karena tidak dapat diubah menjadi prophobilinogen. *Delta-aminolevulinic acid* yang menumpuk akan merangsang pembentukan ROS di membran sel (Dizdaroglu 2002, diacu dalam Mahardika 2012).

2.2. Penekanan sistem antioksidan. *Glutathion* mempunyai gugus tiol (-SH) yang bersifat reduktif yang menjadikan molekul ini pelindung sel dari stres oksidatif. Pb yang berikatan dengan gugus tiol dari GSH, menyebabkan kadar GSH menurun dan mempengaruhi aktivitas antioksidannya. Selain itu enzim glutathion reduktase (GR) membantu sistem pertahanan antioksidan secara tak langsung. Enzim ini memiliki disulfida pada tempat katalitiknya, yang merupakan target dari Pb. Pb yang terikat pada enzim ini akan menghambat aktivitasnya (Ercal *et al.* 2001).

E. Hewan Uji

1. Sistematika hewan uji

Berikut ini sistematika mencit putih :

Kerajaan : Animalia

Filum : Chordata

Sub Filum : Vertebrata

Kelas : Mamalia
Sub Kelas : Theria
Ordo : Rodentia
Famili : Muridae
Genus : Mus
Spesies : *Mus musculus* (Akbar 2010).



Gambar 4. Foto hewan uji mencit (Ganguly & Rahman 2013).

2. Biologi hewan uji

Mencit (*Mus musculus*) memiliki ciri berupa bentuk tubuh kecil, dan berwarna putih. Ruang untuk pemeliharaan mencit (*Mus musculus*) harus senantiasa bersih, kering, dan jauh dari kebisingan. Suhu ruang pemeliharaan juga harus dijaga kisarannya antara 18-19°C serta kelembaban udara antara 30-70% (Akbar 2010).

3. Reproduksi hewan uji

Mencit betina dewasa dengan umur 35-60 hari memiliki berat badan 18-35 g. Lama hidupnya 1-2 tahun, dapat mencapai 3 tahun. Mencit betina memiliki masa reproduksi 1,5 tahun, jumlah anak mencit rata-rata 6-15 ekor dengan berat lahir antara 0,5-1,5 g. Periode kebuntingan mencit relatif singkat, dan mempunyai anak yang banyak (Akbar 2010).

4. Karakteristik hewan uji

Mencit termasuk hewan omnivora dan juga termasuk hewan nocturnal karena aktivitas hidup mencit ini lebih aktif pada malam hari daripada siang hari seperti aktivitas mencari makan dan minum (Kusumawati 2016).

F. Landasan Teori

Memori (daya ingat) yaitu kemampuan individu untuk menyimpan informasi kemudian informasi tersebut dapat dipanggil kembali untuk dapat dipergunakan beberapa waktu kemudian (Putranto 2009). Stres oksidatif adalah kondisi dimana jumlah radikal bebas yang ada dengan jumlah antioksidan di dalam tubuh tidak seimbang (Werdhasari 2014). Radikal bebas dapat terbentuk dari proses metabolisme dan dapat terbentuk dari senyawa lain yang sebenarnya bukan radikal bebas tetapi, mudah untuk berubah menjadi radikal bebas. Misalnya, hidrogen peroksida (H_2O_2). Kelompok senyawa tersebut dikenal sebagai *reactive oxygen species* (ROS) (Winarsi 2007).

Tanaman yang sudah terbukti khasiatnya dalam mengatasi masalah penurunan daya ingat adalah ginkgo biloba. Kandungan flavonoid dalam ginkgo biloba sebagai senyawa antioksidan yang dapat menjebak spesies oksigen reaktif (ROS), dan kelat ion logam prooksidan (Ramassamy *et al.* 2007). Tanaman herba lainnya yang memiliki kemampuan serupa sebagai antioksidan dan digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang memiliki banyak manfaat bagi kesehatan, kandungan senyawa yang terkandung dalam daun sirsak antara lain alkaloid, saponin, tanin, kumarin dan flavonoid (flavonol dan flavon) (Gavamukulya *et al.* 2014).

Kandungan flavonol dan flavon dalam daun sirsak dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan karena mampu menghambat autooksidasi melalui mekanisme penangkapan radikal dengan cara mendonorkan satu elektron dari elektron bebas ke dalam radikal bebas (Pokorny 2001). Hasil penelitian Sitompul (2017), nilai IC_{50} ekstrak daun muda dan daun tua sirsak sama memiliki aktivitas antioksidan dengan kategori sangat kuat yaitu sebesar 46,77 $\mu g/ml$ dan 44,37 $\mu g/ml$. Daun sirsak diharapkan dapat memberikan efek yang sama dengan efek ginkgo biloba yang digunakan sebagai kontrol pembandingan terhadap peningkatan daya ingat.

Penelitian ini akan melihat efek daun sirsak dalam sediaan ekstrak kering terhadap peningkatan daya ingat untuk dapat dijadikan alternatif dalam peningkatan daya ingat.

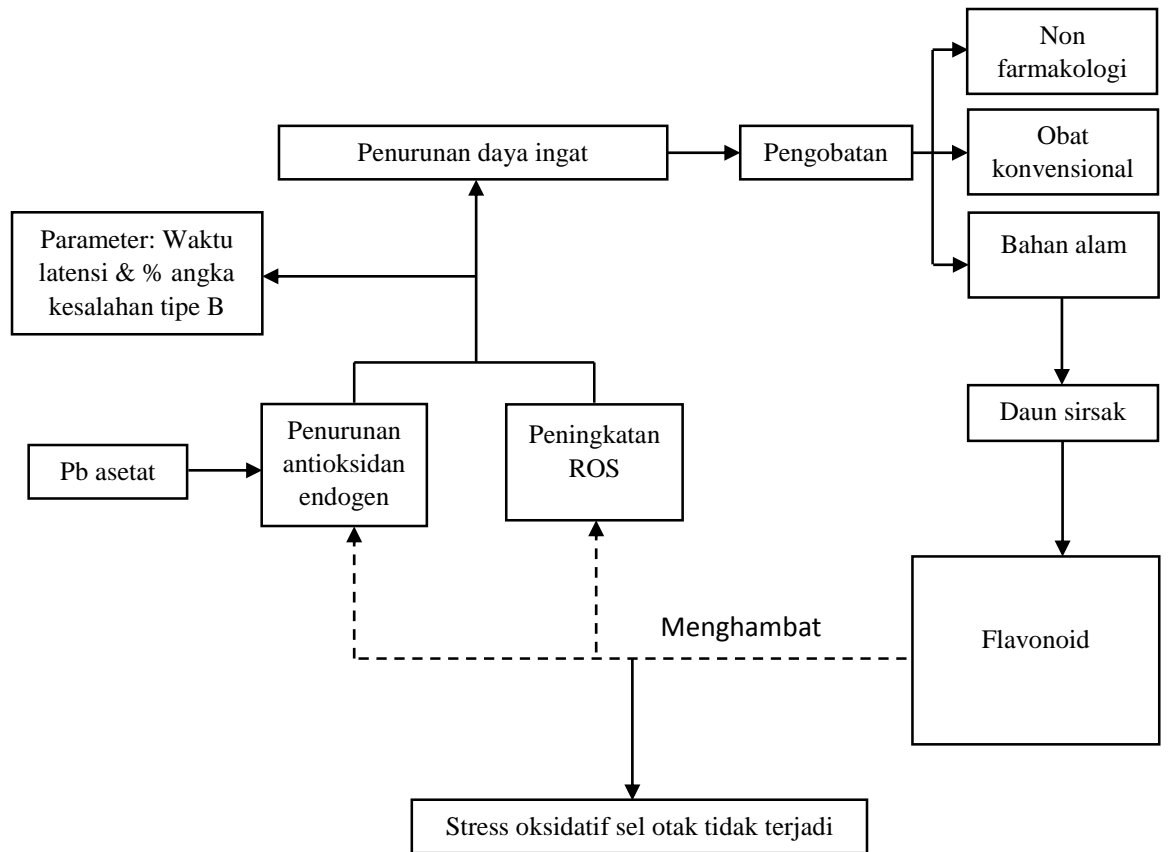
Berdasarkan penelitian yang dilakukan Supratanda (2014) menyatakan bahwa ekstrak etanol daun sirsak dengan variasi dosis 100 ; 200 ; 400 mg/kg BB tikus dapat menurunkan kerusakan sel hepar tikus. Penelitian lainnya dosis ekstrak daun sirsak sebesar 400 mg/kg BB mencit menunjukkan aktivitas sebagai antioksidan pada sistem respirasi mencit terpapar asap anti nyamuk bakar (Yunianto 2014).

G. Hipotesis

Hipotesis yang dapat disusun dalam penelitian ini adalah :

1. Pemberian ekstrak kering perasan daun sirsak (*Annona muricata* L.) dengan dosis 200, 400, dan 800 mg/kg BB dapat menurunkan angka kesalahan pada mencit putih (*Mus musculus*) dengan metode *radial arm maze*.
2. Pemberian ekstrak kering perasan daun sirsak (*Annona muricata* L.) dengan dosis 200, 400, dan 800 mg/kg BB dapat meningkatkan waktu menemukan makanan pada mencit putih (*Mus musculus*) dengan metode *radial arm maze*.
3. Ekstrak kering perasan daun sirsak (*Annona muricata* L.) dengan berbagai dosis memiliki dosis efektif dalam meningkatkan daya ingat pada mencit putih (*Mus musculus*).

A. Kerangka Pikir



Gambar 5. Skema konsep penelitian