



**KAJIAN LITERATUR AKTIVITAS ANTIHIPERLIPIDEMIA  
EKSTRAK DAUN SIRSAK (*Annona muricata L.*)  
SECARA IN VIVO**

ARTIKEL

Oleh  
**RAHMANIAR**  
052191174

PROGRAM STUDI S1 FARMASI  
FAKULTAS KESEHATAN  
UNIVERSITAS NGUDI WALUYO  
2021

## Efek ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap profil lipid tikus putih jantan (*Rattus Norvegicus*)

Indrawati Wurdianing<sup>1</sup>, SA Nugraheni<sup>2</sup>, Zen Rahfiludin<sup>2</sup>

### ABSTRACT

**Background** : Lipid profile effects is a risk factor for Coronary Heart Disease. Soursop leaves (*Annona muricata* L) is a traditional medicine plant containing metabolic compounds that contribute to the improvement of the lipid profile.

**Objective** : To determine the effects of soursop leaves extract on lipid profile (total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol and triglyceride).

**Methods** : An experimental study using randomized pre-posttest with control group design. Sample consisted of 28 male Wistar rats, were divided into four groups. The control group (K) was only given High Fat High Cholesterol (HFHC) diet and treatment groups (P1, P2, P3) were given a HFHC diet plus *Annona muricata* L extract with doses of 100, 200 and 300 mg/kgBB per day for 28 days respectively. Data were analyzed by Wilcoxon test, Kruskal-Wallis and Mann Whitney.

**Results** : The mean total cholesterol level significantly decreased in the treatment group P1 ( $p = 0.028$ ) from 60.7 mg/dl (47.6-75.3) to 45.5 mg/dl (38.4-62.4). Mean HDL cholesterol level significantly increased in the treatment group P2 ( $p=0.043$ ) from 26.0 mg/dl (19.7-35.3) to 27.9 mg/dl (18.8-38.0). The mean levels of LDL cholesterol and triglyceride decreased but not significantly.

**Conclusion** : The administration of *Annona muricata* L extract can decrease total cholesterol and increase HDL cholesterol significantly.

**Keywords**: lipid profile (total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol and triglyceride), HFHC diet, *Annona muricata* L

### ABSTRAK

**Latar Belakang** : Profil lipid merupakan salah satu faktor risiko terjadinya penyakit jantung koroner. Daun sirsak merupakan tanaman obat tradisional yang mengandung berbagai senyawa metabolik yang berperan terhadap perbaikan profil lipid.

**Tujuan** : Mengetahui efek ekstrak daun sirsak terhadap profil lipid ( kadar kolesterol total, kolesterol LDL, kolesterol HDL dan trigliserida).

**Metoda** : Studi eksperimen dengan rancangan penelitian randomized pre-posttest with control group design pada 28 tikus Wistar jantan yang dibagi menjadi 4 kelompok. Kelompok kontrol (K) hanya diberikan diet tinggi lemak tinggi kolesterol dan kelompok perlakuan (P1,P2,P3) diberikan diet tinggi lemak tinggi kolesterol dan ekstrak daun sirsak dengan dosis masing-masing 100,200,dan 300 mg/kgBB per hari selama 28 hari. Analisis data yang digunakan adalah uji Wilcoxon, Kruskal-Wallis dan Mann Whitney.

**Hasil** : Rerata kadar kolesterol total menurun signifikan pada kelompok perlakuan P1 ( $p=0,028$ ) dari 60,7 mg/dl (47,6-75,3) menjadi 45,5 mg/dl (38,4-62,4). Rerata kadar kolesterol HDL meningkat signifikan pada kelompok perlakuan P2 ( $p=0,043$ ) dari 26,0 mg/dl (19,7-35,3) menjadi 27,9 mg/dl (18,8-38,0). Rerata kadar kolesterol LDL dan trigliserida menurun meskipun secara statistic tidak signifikan.

**Simpulan** : Pemberian ekstrak daun sirsak secara signifikan dapat menurunkan kadar kolesterol total dan meningkatkan kadar kolesterol HDL.

**Kata Kunci** : Profil lipid (kolesterol total, kolesterol LDL, kolesterol HDL, dan trigliserida), diet tinggi lemak tinggi kolesterol, ekstrak daun sirsak

### PENDAHULUAN

Penyakit jantung koroner merupakan penyebab kematian utama di dunia. Kasus-kasus penyakit jantung dan pembuluh darah banyak menyebabkan kematian nomor satu sebesar 15%.<sup>1</sup> Penyakit jantung koroner disebabkan penyempitan pembuluh arteri yang mengalirkan darah ke otot jantung yang dikenal sebagai *atherosclerosis*. Aterosklerosis ini

merupakan endapan lemak dan kolesterol yang berada disepanjang dinding arteri.

Tingginya prevalensi hiperkolesterolemia menjadi alasan para peneliti melakukan kajian penelitian untuk menurunkan kadar kolesterol. Menurut Mustapa, pemberian infusa daun manggis pada konsentrasi 15%b/v dan 60%b/v dapat menurunkan kadar kolesterol.<sup>2</sup> Pemberian dekok *Zea mays* dosis 7,7 ml/hari berpengaruh sangat nyata terhadap penurunan kadar kolesterol total, trigliseridadan kolesterol LDL serta peningkatan kadar kolesterol HDL pada tikus yang diberi diet tinggi lemak.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Balai Pelatihan Kesehatan, Kota Semarang

<sup>2</sup> Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Diponegoro, Indonesia

Daun sirsak mengandung senyawa metabolik sekunder antara lain alkaloid, triterpenoid, kumarin, saponin dan flavonoid yang berperan dalam proses hipoglikemik, hipotensi, analgesik dan antiinflamatory.<sup>4,5,6</sup> Larbie *et al.* mengemukakan bahwa ekstrak daun sirsak menggunakan metode dekok menghasilkan senyawa metabolik saponin, tannin, *glycoside* dan flavonoid.<sup>7</sup> Senyawa metabolit tersebut seperti senyawa flavonoid dan saponin bersifat sebagai antioksidan yang berperan terhadap mekanisme perbaikan profil lipid.<sup>8,9</sup>

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada penderita hiperkolesterolemia dan masyarakat tentang efek pemberian ekstrak daun sirsak sebagai antihiperkolesterolemia, yang dapat menurunkan kadar kolesterol total, LDL kolesterol dan trigliserid serta meningkatkan HDL kolesterol.

## METODE DAN BAHAN

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar berumur 10 minggu dengan berat awal 180-200 gram, diet standar AD II, daging sapi dan kuning telur sebagai sumber lemak dan kolesterol, air minum, daun sirsak, air suling, aluminium foil, serum, larutan standar (kolesterol, trigliserid, LDL HDL), reagen uji (kolesterol, trigliserid, LDL dan HDL).

Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental (*True Experiment Design*) dengan rancangan penelitian *randomized pre-posttest with control group design*.

Penentuan besar sampel menggunakan ketentuan WHO yaitu jumlah sampel minimal 5 ekor tikus tiap kelompok yang diambil secara acak.<sup>10</sup> Penelitian ini dibagi menjadi empat kelompok yaitu kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan dengan jumlah sampel terdiri dari 7 ekor tikus tiap kelompok sehingga didapat total sampel sejumlah 28 ekor tikus. Kelompok kontrol (K) hanya diberi diet TLTK (tinggi lemak tinggi kolesterol) dan kelompok perlakuan (P1, P2, P3) diberi diet TLTK dan ekstrak *Annona muricata L* dengan dosis 100, 200 dan 300 mg/kgBB per hari selama 28 hari. Diet TLTK dibuat dengan cara menambahkan lemak sapi 10% ke dalam diet standar AD II dan kolesterol 2% berupa kuning telur yang diberikan dengan cara di sonde secara *intermittent*. Pengambilan darah dari pleksus retroorbitalis hewan coba pada hari ke 8 dan 29. Parameter pengujian profil lipid terdiri dari total kolesterol, LDL kolesterol, HDL kolesterol dan trigliserid.

Data yang diperoleh ditampilkan dalam bentuk median (minimum-maksimum). Jumlah sampel sedikit (< 30) maka uji beda profil lipid sebelum dan

sesudah perlakuan menggunakan *Wilcoxon* sedangkan uji beda profil lipid diantara keempat kelompok perlakuan menggunakan *Kruskal-Wallis*, apabila hasilnya signifikan maka dilanjut analisis dalam kelompok perlakuan menggunakan *Mann Whitney*. Nilai signifikan dalam penelitian ini jika variabel yang dianalisis memiliki nilai  $p < 0,05$ .

## HASIL

Ekstrak daun sirsak diidentifikasi golongan senyawa metabolik dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Hasil penapisan fitokimia ekstrak daun sirsak menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak positif mengandung senyawa flavonoid dan saponin.

### Perubahan Profil Lipid

Perubahan profil lipid selama 28 hari masa pemeliharaan dengan perlakuan diet yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 1.

### Kolesterol Total

Gambar 1(a) dapat dilihat rerata kadar kolesterol total diantara keempat kelompok perlakuan yang mengalami penurunan signifikan pada kelompok perlakuan P1 ( $p = 0.028$ ) yaitu dari 60.7 mg/dl (47.6-75.3) menjadi 45.5 mg/dl (38.4-62.4). Hasil uji statistik *Kruskal-Wallis* menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan diantara keempat kelompok perlakuan ( $p = 0.355$ ).

### LDL Kolesterol

Berdasarkan Gambar 1(b) bahwa rerata kadar LDL kolesterol untuk kelompok kontrol mengalami peningkatan yaitu dari 18.9 mg/dl (10.8-21.4) menjadi 19.1 mg/dl (12.9-24.8). Kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 kadar LDL kolesterolnya mengalami penurunan tapi tidak bermakna secara statistik.

Berdasarkan uji statistik *Kruskal-Wallis* menunjukkan hasil tidak ada perbedaan yang signifikan diantara keempat kelompok perlakuan ( $p = 0.596$ ).

### HDL Kolesterol

Perubahan kadar HDL kolesterol dapat dilihat pada Gambar 1(c) bahwa rerata kadar HDL kolesterol diantara keempat kelompok perlakuan yang mengalami peningkatan signifikan pada kelompok perlakuan P2 ( $p = 0.043$ ) yaitu dari 26.0 mg/dl (19.7-35.3) menjadi 27.9 mg/dl (18.8-38.0).

Berdasarkan uji statistik *Kruskal-Wallis* menunjukkan hasil tidak ada perbedaan yang signifikan diantara keempat kelompok perlakuan ( $p = 0.390$ ).

**Trigliserid**

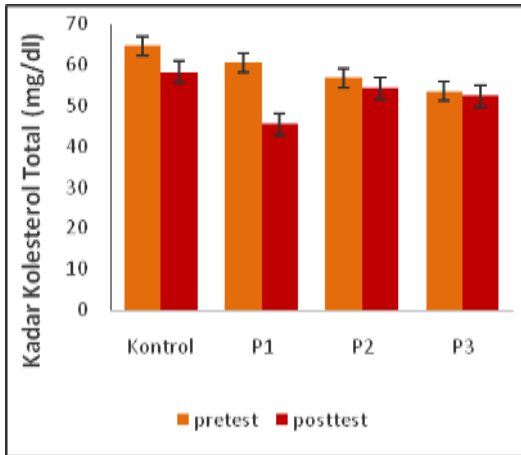
Hasil penelitian rata-rata kadar trigliserid sebelum aklimatisasi dan sesudah perlakuan selama 28 hari dapat dilihat pada Gambar 1(d). Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan kadar trigliserid terjadi pada semua kelompok. Kadar trigliserid yang mengalami peningkatan terbesar terjadi pada kelompok kontrol yaitu sebesar 52.7 mg/dl dari 37.4 mg/dl (26.1-88.0) menjadi 90.1 mg/dl (59.8-150.7).

Berdasarkan uji statistik Kruskal-Wallis menunjukkan hasil tidak ada perbedaan yang

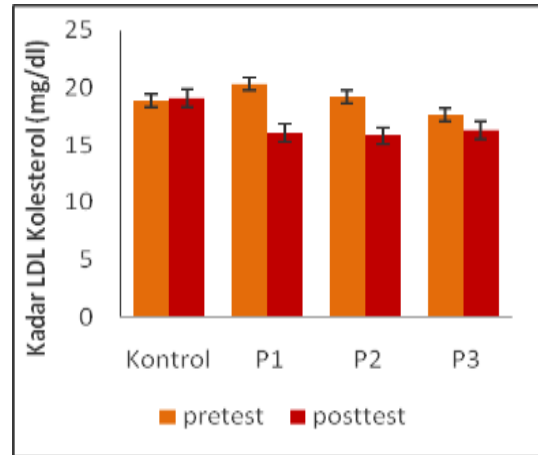
signifikan diantara keempat kelompok perlakuan (p=0.849).

**PEMBAHASAN**

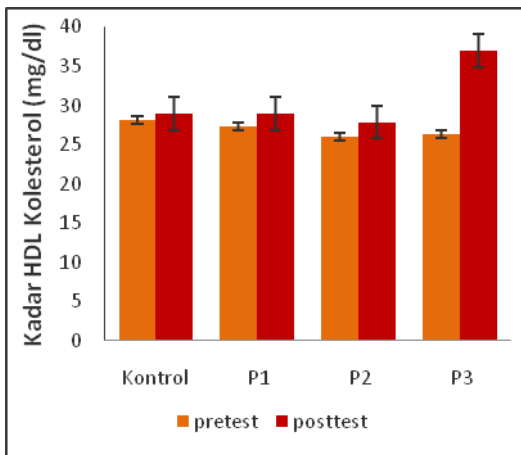
Konsumsi lemak berlebih bisa meningkatkan kolesterol, LDL dan trigliserid serta menurunkan HDL. Salah satu cara untuk menurunkan kolesterol, LDL dan trigliserid serta menaikkan HDL dengan mengkonsumsi makanan yang mengandung antioksidan. Daun sirsak



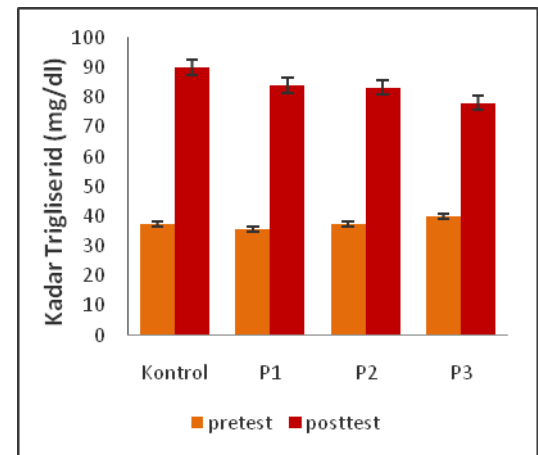
(a)



(b)



(c)



(d)

Gambar 1. Perubahan Profil Lipid Sebelum (*pretest*) dan sesudah (*posttest*) Perlakuan. (a) Kolesterol total (b) LDL kolesterol (c) HDL kolesterol (d) Trigliserid

mengandung senyawa metabolik sekunder seperti kumarin, flavonoid, saponin, tannin<sup>4</sup>, alkaloid<sup>5</sup>, dan triterpenoid<sup>6</sup> yang berfungsi sebagai antioksidan.

Pemberian diet tinggi lemak dan tinggi kolesterol pada penelitian Kovar *et al*, diet kolesterol 2% dan lemak sapi 5% selama 2 minggu menyebabkan hiperkolesterolemia sampai 5 mmol/l pada tikus wistar.<sup>11</sup> Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian Kovar *et al* dimana hasil kadar kolesterol totalnya mengalami penurunan tapi tidak signifikan.

Hal ini disebabkan dalam penelitian ini sumber kolesterolnya menggunakan kuning telur segar dan sumber lemaknya berasal dari daging sapi. Menurut Valenzuela *et al* bahwa kuning telur segar mengandung kolesterol sebanyak 0.2-0.22g/100g. Telur yang diolah dengan suhu tinggi merupakan sumber oxysterol tetapi tidak untuk kuning telur segar.<sup>12</sup> Rata-rata kadar lemak dari daging adalah 10% berat basah dimana komponen utamanya adalah

trigliserid dan fosfolipid sedangkan kolesterol hanya sedikit 50-89 mg.<sup>12</sup>

Lemak diserap tubuh diubah menjadi asam lemak dan trigliserid, sehingga semakin banyak yang dimakan akan menyebabkan perubahan kadar trigliserid yang banyak.

Berdasarkan identifikasi kualitatif senyawa metabolik bahwa ekstrak daun sirsak mengandung saponin dan flavonoid. Hal ini didukung oleh Larbie *et al* bahwa hasil skrining fitokimia ekstrak air daun sirsak mengandung tannin, glikosid, saponin dan flavonoid.<sup>7</sup> Penurunan kolesterol disebabkan kandungan senyawa metabolik yang terdapat dalam ekstrak daun sirsak.

Menurut Wilcox *et al* dan Malinow *et al* bahwa saponin berperan menghambat penyerapan kolesterol di usus.<sup>13,14</sup> Konsekuensi penghambatan penyerapan kolesterol adalah kolesterol dikeluarkan dari tubuh bersama feses yang merupakan lintasan utama untuk mengeluarkan kolesterol.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Messina dan Lee *et al* bahwa saponin akan berikatan dengan asam empedu dan meningkatkan ekskresi asam empedu di dalam feses dan sterol netral (seperti koprostanol dan kolestanol).<sup>15,16</sup> Hal ini menyebabkan konversi kolesterol menjadi asam empedu sangat meningkat untuk upaya mempertahankan depot asam empedu. Konsekuensinya, reseptor LDL dari hati akan dinaikkan sehingga terjadi peningkatan pengambilan LDL yang akan disertai dengan penurunan kadar kolesterol plasma. Senyawa metabolit flavonoid terbukti dapat menghambat sekresi apoB dan membantu meningkatkan ekspresi reseptor LDL (*LDLr*) di jaringan serta terjadi peningkatan penyerapan kolesterol dalam LDL kolesterol sehingga kadar kolesterol dalam LDL kolesterol di darah menurun.<sup>17,18</sup> Kemampuan *LDLr* berkorelasi negatif dengan LDL kolesterol, ketika *LDLr* lebih banyak maka LDL kolesterol sedikit. Bertambahnya jumlah reseptor LDL menyebabkan peningkatan penyerapan kolesterol LDL dari darah.<sup>19,20</sup>

Selain menurunkan kadar kolesterol total, ekstrak daun sirsak mampu meningkatkan kadar HDL kolesterol. HDL ini berperan mengangkut kolesterol dari jaringan perifer dan diuraikan kembali di dalam hati.<sup>21</sup> Penelitian menggunakan flavonoid menunjukkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas *lecithin cholesterol acyl transferase* (LCAT).<sup>22</sup> LCAT merupakan enzim yang mengubah kolesterol bebas menjadi ester kolesterol dan sangat penting untuk pematangan metabolisme HDL.<sup>21</sup> Ester kolesterol yang dikumpulkan oleh HDL kolesterol dikembalikan ke hati.<sup>19</sup>

Menurut Sato *et al* bahwa saponin menghambat aktivitas *pancreatic lipase* dan menghambat

penyerapan asam lemak bebas.<sup>23</sup> Lipase pankreas berfungsi untuk menghidrolisis asam lemak dari semua rantai panjang dari posisi 1 dan 3 gugus gliserol pada triasilgliserol sehingga menghasilkan asam lemak bebas dan 2- monoasilgliserol. Di dalam sel epitel usus, asam lemak dan 2- monoasilgliserol digabung kembali oleh reaksi enzimatik untuk membentuk triasilgliserol. Jadi penghambatan aktivitas lipase pankreas berdampak menurunnya kadar triasilgliserol di usus. Pengaruh ekstrak daun sirsak terhadap trigliserid pada kelompok perlakuan sudah terlihat tapi belum bermakna secara statistik.

Dosis 100 mg/KgBB/hari lebih efektif untuk menurunkan kolesterol dibanding dosis 200 mg/KgBB/hari dan 300 mg/KgBB/hari. Hal ini didukung dengan penelitian Larbie *et al* dimana dosis 100 mg/KgBB/hari lebih optimal menurunkan kadar kolesterol total dibanding dosis 1000 mg/KgBB/hari.<sup>7</sup> Flavonoid dapat diserap saluran pencernaan maksimal tidak lebih dari 1µmol/L.<sup>24</sup> Selain itu bertambahnya dosis tidak akan meningkatkan efek namun akan memberikan dampak yang tidak diinginkan. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Wang *et al* dimana dosis rendah memberikan efek protektif namun dosis tinggi memberikan dampak hepatotoksik.<sup>25</sup> Daun sirsak bermanfaat untuk menurunkan kolesterol pada dosis 100 mg/kgBB/hari setara dengan 5 lembar daun sirsak basah sedangkan untuk menaikkan HDL kolesterol dosis 200 mg/kgBB/hari setara dengan 10-11 lembar daun sirsak basah.

Ekstrak air daun sirsak bermanfaat terhadap profil lipid namun harus memperhatikan efek toksik atau efek merugikan yang tidak diinginkan dari daun sirsak tersebut. Menurut Adewole *et al* bahwa ekstrak daun sirsak menggunakan metode ekstraksi maserasi pelarut air perbandingan 1 : 2,5 pemberian melalui intraperitoneal sudah memberikan efek toksik pada tikus dengan dosis 200 mg/kgBB/hari.<sup>4</sup> Ekstrak alkohol daun sirsak pada dosis 100 mg/kg tidak menunjukkan efek toksik atau efek samping pada tikus sedangkan pada dosis 300 mg/kg sudah memberikan efek penurunan perilaku eksploratif dan kontraksi perut ringan.<sup>26</sup> Studi toksisitas ekstrak daun sirsak menggunakan metode ekstraksi dekok pelarut air perbandingan 1:10 secara oral dosis 5 g/kgBB/hari baru menghasilkan efek toksik atau efek yang tidak diinginkan.<sup>7</sup>

## SIMPULAN

Pemberian ekstrak *Annona muricata L* dapat menurunkan kolesterol total dan meningkatkan HDL kolesterol secara signifikan. Daun sirsak bermanfaat untuk menurunkan kolesterol pada dosis 100 mg/kgBB setara dengan 5 lembar daun sirsak basah sedangkan untuk menaikkan HDL kolesterol dosis

200 mg/kgBB setara dengan 10-11 lembar daun sirsak basah berdasarkan perhitungan hasil ekstraksi daun sirsak.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Dinas Kesehatan Kota Semarang. Profil Dinas Kesehatan Kota Semarang Tahun 2010. Semarang: Dinas Kesehatan Kota Semarang; 2010.
2. Mustapa M.A. Pengaruh pemberian infuse daun manggis terhadap kadar kolesterol darah mencit jantan. *Jurnal Health & Sport*. 2011 Agustus; 3(1):199-84.
3. Utariningsih. Dekok Rambut Jagung (*Zea mays*) Efektif dalam Menurunkan Kadar Kolesterol Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). Malang: PKM UMM; 2007.
4. Adewole SO and Ojewole JAO. Immunohistochemical and Biochemical Effect of *Annona muricata* linn (Annonaceae) Leaf Aqueous Extract on Pancreatic  $\beta$ -cell of Streptozotocin-treated Diabetic Rats. *Pharmacologyonline*. 2006; 2:335-55.
5. Sangi M, Runtuwene M, Simbala H dan Makang V. Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat di Kabupaten Minahasa Utara. *Chem. Prog*. 2008; 1(1).
6. Muzakir. Karakterisasi simplisia dan isolasi senyawa steroid/triterpenoid dari ekstrak *n*-heksana daun sirsak (*annona muricata* linn.). Fakultas Farmasi: USU digital library; 2010.
7. Larbie C, Arthur, Woode E and Terlabi EO. Evaluation of Acute and Subchronic Toxicity of *Annona Muricata* (Linn) Aqueous Extract in Animal. *European Journal of Experimental Biology*. 2011;1(4):115-24.
8. Hollman PC and Katan MB. Absorption, Metabolism and Health Effects of Dietary Flavonoid in Man. *Biomed Pharmacother*. 1997;51(8):305-10.
9. Grassi D, Desideri G and Ferri C. Flavonoid : Antioksidans Against Atherosclerosis. *Nutrients*. 2010;2:889-02.
10. WHO. Research Guidelines for Evaluating The Safety and Efficacy of Herbal Medicines. Manila: World Health Organization Regional Office for The Western Pacific; 1993. p.35.
11. Kovar J, Tonar Z, Heczakova M, and Poledne R. Prague Hereditary Hypercholesterolemic (PHHC) Rat a Model of Polygenic Hypercholesterolemia. *Physiol. Res*. 2009; 58 (Suppl. 2):S95-S9.
12. Valenzuela A, Sanhueza J, and Nieto S. Cholesterol Oxidation: Health Hazard and The Role of Antioxidants in Prevention. *Biol Res*. 2003;36:291-02.
13. Wilcox EB. and Galloway LS. Serum and Liver Cholesterol, Total Lipids and Lipid Phosphorus Levels of Rats under Various Dietary Regimens. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1961;9:236-43.
14. Malinow MR, McLaughlin P, Papworth L, Stafford C, Kohler GO, Livingston AL and Cheeke PR. Effect of Alfalfa saponins on intestinal cholesterol absorption in rats. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1977;30:2061-7.
15. Messina MJ. Legumes and Soybeans: Overview of their Nutritional Profiles and Health Effects. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1999;70:439S-50S.
16. Lee S, Simons AL, Murphy PA and Hendrich S. Soyasaponins Lowered Plasma Cholesterol and Increased Fecal Bile Acids in Female Golden Syrian Hamsters. *Experimental Biology and Medicine*. 2005; 230: 472-8.
17. Borradaile NM, de Dreu LE, and Huff MW. Inhibition of Net HepG2 Cell Apolipoprotein B Secretion by the Citrus Flavonoid Naringenin Involves Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase, Independent of Insulin Receptor Substrate-1 Phosphorylation. *Diabetes*. 2003;52 (10): 2554-61.
18. Morin B, Nichols LA, Zalasky KM, Davis JW, Manthey JA, and Holland LJ. The Citrus Flavonoids Hesperetin and Nobiletin Differentially Regulate Low Density Lipoprotein Receptor Gene Transcription in HepG2 Liver Cells. *J. Nutr*. 2008 Jul;138(7):1274-81.
19. Marks DB, Marks AD and Smith CM. Biokimia Kedokteran Dasar: Sebuah Pendekatan Klinis (Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach). Alih Bahasa Bra ham U. P endit. Jakarta: EGC; 2000.
20. Musa HH, Cheng XS, Wu HPJ, Meki DM, and Chen GH. Analysis of LDL Receptor mRNA Expression, Serum Biochemical and Abdominal Fat Weight and Lean Chicken. *J. Biological Sci*. 2007;7:693-6.
21. Lee S, Joo H, Kim CT, Kim IH, and Kim Y. High Hydrostatic Pressure Extract of Garlic Increases The HDL Cholesterol Level Via Up-Regulation of Apolipoprotein A-I Gene Expression in Rats Fed A High-Fat Diet. *Lipids Health Dis*. 2012;11:77.
22. Sudheesh S, Presannakumar G, Vijayakumar S, and Vijayalakshmi NR. Hypolipidemic Effect

- of Flavonoids from *Solanum Melongena*. Plant Foods for Human Nutrition. 1997;51:321-30.
23. Sato M, Ueda T, Nagata K, Shiratake S, Tomoyori H, Kawakami M *et al.* Dietary kakrol (*Momordica dioica roxb.*) flesh inhibits triacylglycerol absorption and lowers the risk for development of fatty liver in rats. *Experimental Biology and Medicine*. 2011; 236: 1139-46.
24. Halliwell B, Rafter J, and Jenner A. Health Promotion by Flavonoids, Tocopherols, Tocotrienols, and Other Phenols: Direct or Indirect Effects? Antioxidant or Not? *Am J Clin Nutr*. 2005;81(suppl):268S-76S.
25. Wang JB, Zhao HP, Zhao YL, Jin C, Liu DJ, Kong WJ, *et al.* Hepato toxicity or Hepatoprotection? Pattern Recognition for the Paradoxical Effect of the Chinese Herb *Rheum palmatum* L. in Treating Rat Liver Injury. *PLoS One*. 2011;6(9):e24498.
26. Taylor L. Technical Data Report for Graviola (*Annona muricata*). In *Herbal Secretes of The Rainforest*. 2nd ed. Austin: Sage press; 2002.

## **PENGARUH INFUSA DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.) TERHADAP PENURUNAN KADAR KOLESTEROL MENCIT JANTAN (*Mus musculus*) GALUR SWISS WEBSTER**

**Rheima Indriani Iskandar, Nuri Handayani, Tovani Sri**

### **ABSTRAK**

Kolesterol bermanfaat bagi tubuh pada kadar normal tetapi jika berlebihan dapat mengancam kesehatan. Sirsak merupakan salah satu tanaman yang dapat digunakan untuk menurunkan kadar kolesterol. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh infusa daun sirsak untuk menurunkan kadar kolesterol mencit putih jantan galur swiss webster dan dosis infusa daun sirsak yang paling efektif dalam menurunkan kadar kolesterol.

Penelitian ini merupakan studi eksperimental dengan menggunakan 15 ekor mencit jantan galur swiss webster yang dibagi tiga kelompok secara acak, dosis I 520 mg/kg BB, dosis II 910 mg/kg BB, dan dosis III 1.690 mg/kg BB. Kadar kolesterol mencit diukur setelah perlakuan selama 7 hari.

Hasil dari penelitian menunjukkan infusa daun sirsak dosis 520 mg/kg BB , 910 mg/kg BB , 1.690 mg/kgBB menurunkan kolesterol sebesar 125 mg/dL , 93 mg/dL dan 92,33 mg/dL berdasarkan uji T didapatkan adanya perbedaan signifikan penurunan kolesterol pada dosis 910 mg/kg BB dan 1.690 mg/kgBB. Sedangkan pada dosis 520 mg/kgBB tidak ada perbedaan signifikan. Namun, jika dilihat dari penurunan rata-rata dosis 520 mg/kgBB menunjukkan penurunan terbaik. Perlu penelitian lanjut mengenai kolesterol mana (HDL,LDL,atau VLDL) yang paling berpengaruh terhadap pemberian infusa daun sirsak dengan dosis yang lebih bervariasi.

**Kata Kunci** : Infusa daun sirsak, kadar kolesterol, Uji T

### **ABSTRACT**

Cholesterol is beneficial both to the body when at a normal level and the higher cholesterol in the body, the greater danger that threatens the health of the body. This study aimed to determine the effect of sirsak (*Annona muricata* L.) leaf infusion to decrease total blood cholesterol level of male mice model swiss webster and to know the most effective dose of giving sirsak (*Annona muricata* L.)

The research was laboratory experimental using 15 male mices model swiss webster were divided randomly into three groups. First blood total cholesterol level of mices was measured then treatment with hypercholesterolemia during 7 days. After hypercholesterol, three groups mices was treatment with Sirsak (*Annona muricata* L.) infuse with dose 520; 910; and 1.690 mg/kgBB. Total blood cholesterol level was measured after one week,



The study showed dose 520; 910; and 1.690 mg/kgBB lower cholesterol amounting to 125; 93; and 92,33 mg/dL. Dependent T test shows that there is a significant difference in lowering cholesterol in a dose 910 mg/kg BB and 1.690 mg/kg BB. While in a dose 520 mg/kg BB there is no significant difference but if it's seen from average lowering, dose 520 mg/kg BB show the best result.

**Key Word** : Infusior leaf sirsak, cholesterol levels, T test

## 1. PENDAHULUAN

Kadar kolesterol yang tinggi dapat menyebabkan aterosklerosis yaitu penyempitan pada pembuluh darah arteri yang dapat terjadi karena adanya penumpukan kolesterol atau protein lain yang berasal dari makanan yang masuk ke dalam tubuh. Penumpukan ini juga menyebabkan pembuluh darah menjadi kaku (Sutanto, 2010). Penurunan kadar kolesterol dapat dilakukan dengan obat-obatan antihiperlipidemia. Namun, obat dari bahan alam pada saat ini banyak diminati oleh masyarakat dan menjadi pilihan lain selain terapi dengan obat-obat medis.

Sirsak (*Annona muricata* L.) merupakan tanaman tropis, termasuk kedalam keluarga *Annonaceae* merupakan tumbuhan berbunga, dengan sekitar 2300 sampai 2500 spesies dan lebih dari 130 genus (Kedari *et al.*, 2014). Daging buahnya berwarna putih susu, rasanya manis asam dan berbiji kecil. Sirsak lebih dikenal sebagai tanaman buah. Namun, seiring dengan penelitian terhadap tanaman tersebut, kini populer sebagai tanaman obat. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa tanaman sirsak mengandung banyak khasiat untuk kesehatan. Bagian tanaman sirsak, mulai dari daun, bunga, buah, biji, akar, sampai kulit batang dan akarnya dapat dimanfaatkan sebagai obat (Mardina, 2011 *dalam* Uneputty *et al.*, 2013)

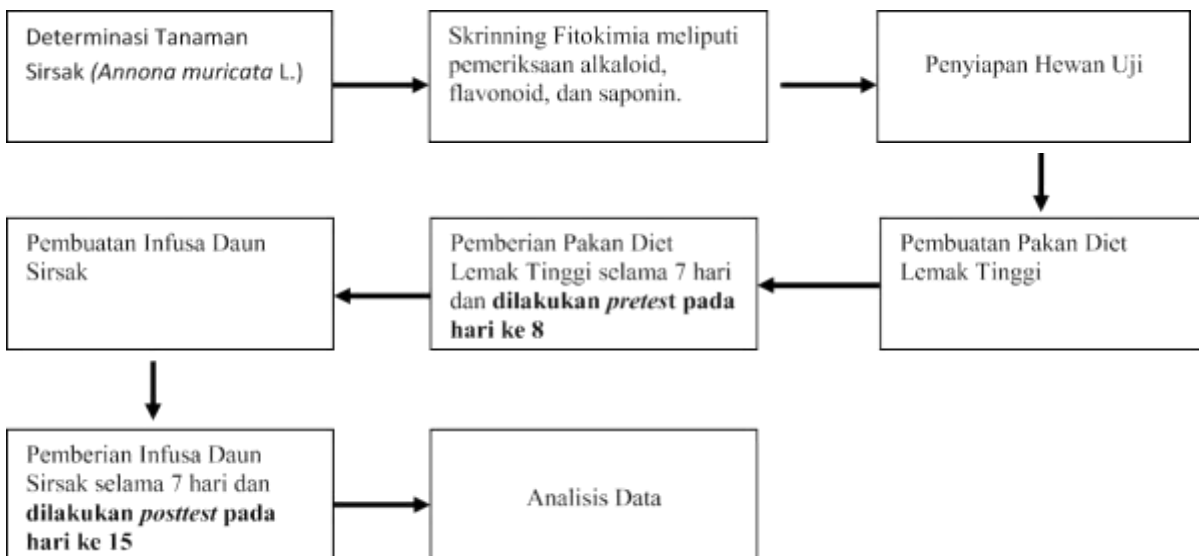
Secara empiris daun sirsak telah digunakan masyarakat untuk menurunkan kolesterol. biasanya cara yang digunakan di masyarakat yaitu sebanyak 3-5 lembar daun sirsak sehari direbus dalam 3 gelas air hingga tersisa 1 gelas kemudian diminum (Redaksi Trubus, 2012 *dalam* Uneputty *et al.*, 2013). Untuk memastikan hal terbut perlu diketahui secara pasti apakah ada pengaruh pemberian infusa daun sirsak (*Annona muricata* L.) dalam menurunkan kadar kolesterol dan Berapa dosis optimalnya dengan menggunakan hewan uji mencit (*Mus musculus*).

## 2. METODE

Metode yang digunakan dalam penelitian ini termasuk penelitian eksperimental (*True Experiment Design*) dengan rancangan penelitian *randomized pretest and posttest*. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang metabolik, gelas kimia, *hot plate*, gelas ukur, corong kaca, batang pengaduk, spuit, lanset, sonde oral, alat ukur kolesterol *easy touch* GCU 3in1, strip cek kolesterol *easy touch* GCU 3in1, timbangan elektronik, timbangan hewan, kertas saring, dan kapas. Bahan yang digunakan yaitu daun sirsak (*Annona Muricata* L.), aquades, pakan standar (BR II), dan pakan tinggi lemak. Variabel bebas yaitu dosis cairan infusa daun sirsak dan variabel tergantung yaitu kadar kolesterol mencit.

Penelitian ini dibagi tiga kelompok yaitu kelompok A sebagai kelompok mencit yang diberikan dosis 3 lembar daun sirsak, kelompok B yaitu kelompok mencit yang diberikan 5 lembar daun sirsak, dan Kelompok C yang diberikan 10 lembar daun sirsak. Jumlah sampel tiap kelompok terdiri dari 3 ekor mencit, sehingga didapatkan semua jumlahnya yaitu 15 ekor mencit. Pengambilan data pertama dimulai seminggu setelah mencit diinduksi kolesterol dan seminggu setelah pemberian infusa daun sirsak. Penelitian kali ini bersifat deskriptif. *Simple random sampling* digunakan dengan cara mengambil sampel dari suatu populasi secara acak.

Metode analisis data yang akan digunakan adalah uji T berpasangan untuk mengetahui perubahan kadar kolesterol pada setiap kelompok perlakuan.



Gambar 1. Prosedur Pengambilan data

**Determinasi tumbuhan** dilakukan di laboratorium Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Insitut Teknologi Bandung.

### **Skrining Fitokimia**

Skrining Fitokimia yang dilakukan meliputi skrining alkaloid, saponin, dan flavonoid.

- a. Pemeriksaan golongan senyawa alkaloid  
Infusa ditambahkan dengan amonia encer lalu ditambahkan pereaksi mayer, lalu diamati ada tidaknya endapan berwarna putih.
- b. Pemeriksaan golongan senyawa saponin  
Infusa dipindahkan kedalam tabung reaksi kemudian dikocok kuat-kuat selama beberapa menit, pembentukan busa sekurangnya setinggi 1 cm dan persisten selama beberapa menit dan tidak hilang dengan penambahan asam menunjukkan adanya saponin.
- c. Pemeriksaan golongan senyawa flavonoid

Infusa ditambahkan serbuk Zn, larutan alkohol asam klorida (1:1) dan amil alkohol, kemudian campuran dikocok kuat-kuat, adanya flavonoid akan menyebabkan filtrat berwarna merah, kuning atau jingga yang dapat ditarik oleh amil alkohol.

d. Pemeriksaan golongan senyawa tanin

Infusa ditambahkan larutan gelatin 2%, sehingga akan terbentuk endapan putih.

### Penyiapan hewan uji

Sebelum dimulai penelitian, di lakukan adaptasi hewan uji dahulu selama seminggu agar mencit terbiasa dengan lingkungan laboratorium. Selama seminggu adaptasi tersebut mencit diberikan pakan standar berupa pelet BR II yang sudah umum digunakan sebagai pakan hewan.

### Pembuatan pakan tinggi lemak

Komposisi dari pakan ini yaitu lemak sapi dan minyak kelapa dengan perbandingan lemak sapi : minyak goreng (5:1) Cara pembuatan pakan ini yaitu dengan memanaskan lemak sapi yang berupa padatan berwarna putih sampai mencair, panaskan sampai didapatkan 25 ml, setelah mencair, masih dalam keadaan panas tambahkan minyak goreng 5 ml pelan-pelan sambil diaduk hingga homogen (Widyaningrum., 2015).

### Pemberian pakan tinggi lemak

Pemberian Pakan diet lemak tinggi dilakukan selama seminggu sebagai penginduksi kenaikan kolesterol pada mencit, setelah itu dihari ke-8 akan dilakukan pengecekan kadar kolesterol mencit.

### Pembuatan infusa daun sirsak

Infusa Daun sirsak dibuat dengan cara merebus masing-masing 3 lembar, 5 lembar, dan 10 lembar daun pada 100 ml aquades selama 15 menit terhitung pada suhu 15 menit, setelah itu infusa disaring lalu ditambahkan aquades panas sampai 100 ml (Unepetty *et al.*, 2013).

## 3. HASIL

Tabel 1. Hasil Skrining Fitokimia Infusa Daun Sirsak

Metabolit Sekunder	Hasil
Alkaloid	(+) endapan putih
Flavonoid	(+) larutan kuning kemerahan
Polifenol	(+) hijau kehitaman / biru tua
Tanin	(+) endapan putih
Saponin	(-) tidak terdapat busa

Pemberian pakan diet tinggi lemak bertujuan untuk induksi kolesterol agar mencit menjadi hiperlipidemia. Sebelum diberikan pakan diet tinggi lemak, setiap hari mencit ditimbang terlebih dahulu untuk mengetahui jumlah pakan yang harus diberikan.

**Tabel 2. Pemberian pakan tinggi lemak selama 7 hari**

Mencit Ke	1	2	3	4	5	6	7	
1	BB (g)	32	31	32	31	33	32	33
Dosis (ml)	0,64	0,62	0,64	0,62	0,66	0,64	0,66	
2	BB (g)	30	26	27	27	28	29	31
Dosis (ml)	0,60	0,52	0,54	0,54	0,56	0,58	0,62	
3	BB (g)	36	35	35	31	35	40	40
Dosis (ml)	0,72	0,70	0,70	0,62	0,70	0,80	0,80	
4	BB (g)	25	24	24	22	24	24	23
Dosis (ml)	0,50	0,48	0,48	0,44	0,48	0,48	0,48	0,46
5	BB (g)	31	31	30	29	31	31	29
Dosis (ml)	0,62	0,62	0,60	0,58	0,62	0,62	0,62	0,58
6	BB (g)	38	38	35	38	38	38	36
Dosis (ml)	0,76	0,76	0,70	0,76	0,76	0,76	0,76	0,72
7	BB (g)	33	31	30	32	30	29	30
Dosis (ml)	0,66	0,62	0,60	0,64	0,60	0,58	0,6	
8	BB (g)	30	30	29	29	29	29	27
Dosis (ml)	0,60	0,60	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	0,54
9	BB (g)	31	35	35	33	34	34	34
Dosis (ml)	0,62	0,58	0,58	0,66	0,68	0,68	0,68	0,68

Setelah seminggu pemberian pakan, pada hari ke-8 mencit akan diambil darahnya dibagian ekor untuk dilakukan pengecekan kadar kolesterol dengan menggunakan alat *easy touch GCU 3in1*, berikut tabel hasil pengukurannya.

**Tabel 3. Kadar kolesterol setelah pemberian diet tinggi lemak**

Mencit Ke	Kadar kolesterol setelah induksi kolesterol
1	381 mg/dl
2	172 mg/dl
3	203 mg/dl
4	282 mg/dl
5	168 mg/dl
6	182 mg/dl

7	209 mg/dl
8	236 mg/dl
9	189 mg/dl

Infusa daun sirsak dibuat baru setiap hari, diberikan pada mencit pada hari ke-8 sampai hari ke-14. Untuk pemberian infusa daun sirsak pada mencit diperlukan konversi dosis terlebih dahulu,

**Tabel 4. Dosis 3 kelompok hewan uji**

Nama Kelompok	Kelompok Uji	Perlakuan
Kelompok A	Dosis infusa 3 lembar	Infusa Daun sirsak 520 mg/kg BB/hari
Kelompok B	Dosis infusa 5 lembar	Infusa Daun sirsak 910 mg/kg BB/hari
Kelompok C	Dosis infusa 10 lembar	Infusa daun sirsak 1.690 mg/kg BB/hari

Hasil rata-rata perubahan kadar kolesterol darah mencit sebelum diberikan perlakuan pemberian infusa daun sirsak dan sesudah diberikan perlakuan pemberian infusa daun sirsak selama seminggu.

**Tabel 5. Kadar kolesterol sebelum dan setelah perlakuan**

Kelompok	Kadar Kolesterol total (mg/dL)	
	Sebelum perlakuan (H-0)	Setelah Perlakuan (H-8)
Kelompok A ( dosis I)	252,00	127,00
Kelompok B (dosis II)	210,66	117,66
Kelompok C (dosis III)	211,33	119,00

**Keterangan :**

- Dosis I = infusa daun sirsak dengan dosis 520 mg/kg BB
- Dosis II = infusa daun sirsak dengan dosis 910 mg/kg BB
- Dosis III = infusa daun sirsak dengan dosis 1.690 mg/kg BB

Data pengukuran kolesterol di uji t berpasangan (*Paired-Samples T Test*) dengan derajat kepercayaan 95% ( $p < 0,05$ ). Data kolesterol yang dianalisis yaitu data perlakuan sebelum pemberian perlakuan dan data setelah pemberian perlakuan, tujuannya untuk mengetahui bermakna atau tidaknya perubahan kadar kolesterol pada masing-masing kelompok setelah 7 hari perlakuan.

**Tabel 6. Hasil Uji t ( *Paired-Samples T Test* ) kadar Kolesterol pada Mencit Jantan**

Kelompok	Kelompok A (Dosis I) sesudah perlakuan	Kelompok B (Dosis II) sesudah perlakuan	Kelompok C (Dosis III) sesudah Perlakuan
----------	---	--	---

Kelompok A (Dosis I)	0,19	
Kelompok B (Dosis II)		0,04
Kelompok C (Dosis III)		0,04

Berdasarkan tabel 6. kelompok A dengan dosis infusa daun sirsak 520 mg/kg BB nilai *sig* 0,191 ( $p < 0,05$ ) ini berarti perlakuan pada kelompok A sebelum dan sesudah perlakuan tidak terjadi perubahan secara signifikan meskipun secara rata-rata selisih perlakuan menunjukkan jika kelompok A merupakan kelompok dengan rata-rata penurunan kadar kolesterol tertinggi di antara kelompok lainnya, selanjutnya pada kelompok B dengan dosis infusa daun sirsak 910 mg/kg BB nilai *sig* 0,049 ( $p < 0,05$ ) ini berarti perlakuan pada kelompok B sebelum dan sesudah perlakuan memiliki pengaruh yang signifikan terhadap penurunan kadar kolesterol mencit, lalu pada kelompok C dengan dosis infusa 1.690 mg/kg BB nilai *sig* 0,044 ( $p < 0,05$ ) menunjukkan jika pada kelompok ini terjadi perubahan yang signifikan sebelum dan setelah pemberian perlakuan.

#### 4. Pembahasan

Hasil skrining fitokimia menunjukkan hasil positif untuk senyawa metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, polifenol, dan tanin. Di beberapa jurnal di laporkan jika senyawa metabolit sekunder flavonoid mempunyai aktivitas biologis yang berperan dalam menurunkan kadar kolesterol. Flavonoid mampu mengurangi sintesis kolesterol dengan cara menghambat aktivitas enzim ACAT pada sel HepG2 yang berperan dalam penurunan esterifikasi kolesterol pada usus dan hati, serta menghambat aktivitas enzim 3-hidroksi-3-meti-glutaril-Coa yang menyebabkan penghambatan sintesis kolesterol. Flavonoid dalam daun sirsak berperan menurunkan penyerapan kolesterol dan asam empedu pada usus halus demi menginduksi peningkatan ekskresi fekal asam empedu dan steroid. Hal ini menyebabkan hati lebih banyak merubah kolesterol dalam tubuh menjadi empedu yang akibatnya dapat menurunkan kolesterol dan meningkatkan aktivitas reseptor kolesterol LDL, yang mengakibatkan peningkatan laju penurunan kadar kolesterol. Setiap hari, sekitar 1 gram kolesterol dikeluarkan dari tubuh. Sekitar separuhnya diekskresikan di dalam tinja setelah mengalami konversi menjadi asam empedu. Sisanya diekskresikan sebagai kolesterol (Prahastuti *et al.*, 2011).

Adewole *et al.*, (2006) menjelaskan bahwa ekstrak air daun sirsak (*Annona muricata* L.) dapat mengurangi peroksidasi lipid pada kasus tikus diabetes dengan induksi streptozotocin. Data yang diperoleh menunjukkan infusa daun sirsak berpengaruh terhadap penurunan kadar kolesterol mencit. Dari ketiga dosis infusa daun sirsak yang memiliki pengaruh terbesar dalam menurunkan kadar kolesterol yaitu dosis 520 mg/kg BB. Apabila dosis yang digunakan melebihi titik optimal dosis tersebut masih dapat menurunkan kadar kolesterol namun efeknya lebih kecil. Tidak menutup kemungkinan bahwa dosis dibawah dosis 520 mg/kg BB memberikan efek penurunan kadar kolesterol yang lebih besar. Oleh karena itu perlu dilakukan variasi dosis lagi. Pada dosis 910 mg/kg

BB terjadi penurunan kadar kolesterol meskipun tidak sebesar dosis I, akan tetapi secara statistika menggunakan uji T memberikan nilai yang signifikan, begitu pula dengan dosis 1.690 mg/kg BB.

## 5. Kesimpulan

Berikut adalah kesimpulan dari penelitian ini:

1. Pemberian infusa daun sirsak (*Annona muricata* L.) dengan dosis 520 mg/kgBB, 910 mg/kgBB, dan 1.690 mg/kgBB dapat menurunkan kadar kolesterol mencit (*Mus musculus*) jantan galur swiss webster.
2. Dosis infusa daun sirsak 520 mg/kgBB menunjukkan menurunkan rata-rata kadar kolesterol terbesar dibanding dosis lainnya.

## 6. Referensi

- Adewole, S.O, and Ojewole, J.AO. 2006. Protective Effects *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) Leaf Aqueous Extract on Serum Lipid Profiles and Oxidative Stress in Hepatocytes of Streptozotocin-Treated Diabetic Rats, *African Journal of Biomedical Research*, Vol.9, No.4: 173-180.
- Kedari, Tai S., Khan, Ayesha A., 2014, Guyabano (*Annona Muricata*): A review of its Traditional uses Phytochemistry and Pharmacology, *American Journal of Research Communication*, 2(10): 247-268.
- Prahastuti, Sijani, 2011, *Konsumsi Fruktosa Berlebihan dapat Berdampak Buruk bagi Kesehatan Manusia*. JKM.vol.10 No.2 Februari 2011
- Sutanto, d., 2010, *Cekal Penyakit Modern Hipertensi, Stroke, Jantung, Kolesterol, dan Diabetes*, Yogyakarta, C.V ANDI OFFSET
- Uneputti, Jonly Piere, Paulina V.Y. Yamlean, Novel Stien Kojong., 2013, Potensi Infusa Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Terhadap Kadar Kolesterol Darah Tikus Putih jantan (*Rattus novergicus*), *Jurnal Ilmiah Farmasi*, Vol. 2,56-59.
- Widyaningrum, Annisa, 2015, Pengaruh Perasan Daun Sambung Nyawa (*gynura procumbens* (Lour) Merr.) Terhadap Kadar Kolesterol Mencit (*Mus musculus* L.) dan Pemanfaatannya Sebagai Karya Ilmiah Populer, Skripsi, Program Studi Pendidikan Biologi Universitas Jember.

# PENGARUH EKSTRAK ETANOLDAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.) TERHADAP KADAR LDL PADA MENCIT PUTIH JANTAN

Surya Dharma<sup>1)</sup>, Oki Supanda<sup>2)</sup> dan Elisma<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Fakultas Farmasi Universitas Andalas (UNAND) Padang

<sup>2)</sup>Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi (STIFARM) Padang

## ABSTRACT

Study about the influence of the aethanolic extract of *Annona muricata* L on male mice induced by high fat diet and propylthiouracil has been done. The aethanolic extract of *Annona muricata* L was given orally one a day for 7, 14, and 21 days. The doses used were 2, 6, 18 mg/20 g body weight respectively. Negative control group was given standard food. Parameters were measured blood levels of LDL. Result showed that the giving of the aethanolic extract of *Annona muricata* could decrease blood levels of LDL significantly ( $p > 0.05$ ). Whereas the factors of the days does not show significantly ( $p > 0.05$ ).

**Keywords:** The Aethanolic Extract of *Annona muricata* L, LDL, Fotometer Clinical.

## ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap kadar LDL pada mencit putih jantan yang diinduksi dengan makanan lemak tinggi dan propiltiourasil. Mencit diberikan ekstrak daun sirsak secara oral sehari sekali selama 7, 14, 21 hari. Dosis yang digunakan 2, 6, dan 18 mg/20 g BB. Kelompok kontrol negatif hanya diberikan makanan standar. Parameter yang diukur adalah kadar LDL dalam darah. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun sirsak dapat menurunkan kadar LDL darah mencit putih jantan dengan signifikan ( $p < 0,05$ ). Sedangkan faktor lama pemberian tidak memperlihatkan pengaruh yang signifikan ( $p > 0,05$ ) terhadap penurunan kadar LDL.

**Kata Kunci :** Ekstrak Daun Sirsak, LDL, Fotometer Klinikal.

## Pendahuluan

Sejak dahulu tanaman yang ada di Indonesia sudah menjadi bahan penelitian dan kajian yang mendalam dari pakar dunia. Penelitian terhadap berbagai tanaman yang berkhasiat terus dilakukan. Salah satu kekayaan alam Indonesia adalah tanaman sirsak, tanaman ini termasuk jenis tanaman tropis yang bersifat tahunan. Selain diambil manfaat buahnya tanaman sirsak juga bisa dijadikan bahan pengobatan (Hasnawati, 2012).

*Annona muricata* L yang termasuk family Annonaceae biasa dikenal dengan nama sirsak, soursop dan guabana, merupakan buah yang mempunyai nilai ekonomi. Ekstrak daun sirsak ini mengandung senyawa metabolik sekunder seperti tanin, steroid, glikosida jantung, dan

juga mengandung acetogenin (Pathak, *et al.*, 2010; Kim, *et al.*, 1998).

Hasil penelitian menunjukkan daun sirsak mempunyai aktivitas farmakologi sebagai antibakteri (Prusti, *et al.*, 2008; Osorio, *et al.*, 2007) antikarsinogenik (Pathak, *et al.*, 2010), antioksidan (Melo & Thiago, 2010), antihyperlipidemia (Adeyemi, *et al.*, 2009), antivirus herpes simplex (Padma, *et al.*, 1999), mengobati penyakit parkinson (Champy, *et al.*, 2005), antihipertensi (Nwokocha, *et al.*, 2012). Dari penelitian lain juga telah dibuktikan bahwa daun sirsak memiliki aktivitas anti inflamasi (Foong & Hamid, 2012), antikanker (George, *et al.*, 2012), sedangkan buah sirsak telah dibuktikan sebagai antidepresi (Hasrat, *et al.*, 1997).



Daun sirsak mengandung beragam senyawa yang berguna untuk pengobatan beberapa penyakit. Diantaranya senyawa acetogenins yang terdiri atas anomurisin A, anomurisin B, gigantetrosin A, murikatosin B, annonasin, howiicins, montanacins, rolliniastatin, bulatasi, solamin, muricine, stigmasterol dan  $\beta$ -sitosterol (Somasundaram, 2013). Zat acetogenin ini berkhasiat menumpas kanker. Selain itu, kandungan niasin (asam nikotinat) dalam sirsak juga mampu meningkatkan kadar HDL (Hasnawati, 2012; Gajalakshmi, *et al.*, 2011).

Hiperlipidemia adalah suatu keadaan terjadinya peningkatan kolesterol atau trigliserida serum di atas batas normal. Peningkatan kolesterol serum yang terjadi, terutama mencerminkan peningkatan kolesterol-LDL. LDL (Low Density Lipoprotein) merupakan lipoprotein yang memiliki kandungan kolesterol tertinggi dibandingkan lipoprotein lainnya (Price & Wilson, 2006; Murray, *et al.*, 2006). LDL dalam pembentukannya membutuhkan apolipoprotein B yang merupakan apolipoprotein primer pada lipoprotein ini (Murray, *et al.*, 2006). LDL darah dalam tubuh akan teroksidasi oleh radikal bebas, maka perlu diberikan antioksidan. Jika sel endotel terganggu maka terjadi penumpukan kolesterol pada dinding pembuluh darah, pada saat inilah kadar LDL darah meningkat, sehingga terjadinya pengendapan lemak pada pembuluh darah. Dalam jangka yang lama oleh penumpukan lemak tersebut akan menyebabkan aterosklerosis dan akhirnya komplikasi yang terpenting dari aterosklerosis adalah penyakit jantung koroner, gangguan pembuluh darah serebral dan gangguan pembuluh darah perifer (Ganiswara, 1995). Dengan demikian perlu diteliti bagaimana pengaruh ekstrak daun sirsak ini terhadap kadar kolesterol LDL pada mencit putih jantan.

## METODE PENELITIAN

### Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah botol maserasi, *rotary evaporator* IKA<sup>®</sup>, timbangan digital, timbangan hewan, wadah hewan, pipet tetes, gelas ukur, beaker glass, spuit injeksi, silet, tabung reaksi, mikrotube, lumpang dan stamper, sudip, vial, spatel, corong, krus porselen, kaca arloji, kertas tisu, erlenmeyer, batang pengaduk, desikator, oven Memmert<sup>®</sup>, sentrifus, pipet mikro Socorex<sup>®</sup>, vortex, fotometer klinik Microlab 300<sup>®</sup>.

### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun sirsak (*Annona muricata* L.), etanol 70 %, Na CMC, air suling, propylthiourasil (Indofarma), lemak sapi, kuning telur ayam, makanan standar mencit, larutan-larutan pereaksi (reagen) yaitu:

Reagen LDL precipitan (Ecoline<sup>®</sup>) yang terdiri dari:

Heparine	100 000 U/L
Sodium citrat	64 mmol/L

Larutan pereaksi kolesterol (DiaSys<sup>®</sup>) yang terdiri dari:

Good's buffer pH 6,7	50 mmol/L
Phenol	5 mmol/L
4-Aminoantipyrine	0,3 mmol/L
Cholesterol esterase (CHE)	$\geq 200$ U/L
Cholesterol oxidase (CHO)	$\geq 50$ U/L
Peroxidase (POD)	$\geq 3$ kU/L
Kolesterol standar	200 mg/dL

### Prosedur Kerja

#### Tanaman

Sampel yang digunakan adalah daun sirsak (*Annona muricata* L.) segar. Daun segar diambil didaerah sekitar Kota Padang, Sumatera Barat sebanyak 2,4 kg, kemudian dilakukan identifikasi di Herbarium

Universitas Andalas (ANDA) Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Kampus Limau Manis Padang Sumbar. Hasil identifikasi tumbuhan sirsak adalah spesies *Annona muricata* L., family Annonaceae. Dalam penelitian ini digunakan daun sirsak (*Annona muricata* L.) kering yang disebut sebagai simplisia. Simplisia adalah bahan alamiah yang digunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dinyatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan. Simplisia tumbuhan obat merupakan bahan baku proses pembuatan ekstrak, baik sebagai bahan obat atau produk sediaan (Departemen Kesehatan RI, 2000).

### **Pembuatan Ekstrak**

Masukkan satu bagian simplisia daun sirsak ke dalam maserator, tambahkan 10 bagian pelarut. Rendam selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam, pisahkan maserat dengan cara pengendapan, sentrifugasi, dekantasi atau fitrasi. Ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Kumpulkan semua maserat, kemudian uapkan dengan penguap vakum atau penguap tekanan rendah hingga di peroleh ekstrak kental (Departemen Kesehatan RI, 2008).

### **Hewan**

Hewan yang digunakan adalah mencit putih jantan dengan umur 2-3 bulan dengan berat badan 20-30 gram sebanyak 45 ekor. Hewan dikelompokkan secara acak menjadi 5 kelompok, dimana tiap-tiap kelompok terdiri dari 9 ekor mencit. Sebelum diperlakukan mencit diaklimatisasi selama 7 hari (sebelum dan sesudah aklimatisasi hewan ditimbang berat badan)

dengan diberi makan dan minum yang cukup. Mencit yang akan digunakan adalah mencit jantan yang sehat, pertumbuhannya normal, tidak menunjukkan kelainan yang berarti, deviasi bobot selama pemeliharaan tidak lebih dari 10 %, (Departemen Kesehatan RI, 1979).

### **Penyiapan Sediaan**

#### **Pembuatan makanan lemak tinggi (MLT)**

Makanan lemak tinggi (MLT) merupakan penginduksi kolesterol pada mencit, diberikan setiap hari. Setiap pembuatan 5 kg MLT terdiri dari lemak sapi 1 kg, makanan standar 4 kg, kuning telur ayam 4 butir. Makanan lemak tinggi dibuat dengan cara lemak sapi dipanaskan hingga cair, ditambahkan makanan standar, diaduk sampai merata, kemudian ditambahkan kuning telur ayam, dipanaskan sambil diaduk beberapa menit (10 menit), kemudian didinginkan.

#### **Pembuatan suspensi propylthiourasil (PTU)**

Suspensi propylthiourasil diberikan pada mencit peroral. Tujuan pemberian suspensi PTU adalah untuk menurunkan fungsi metabolisme pada mencit, sehingga dapat membantu peningkatan kolesterol. Dosis PTU untuk manusia dewasa 1 x 100 mg, dikonversikan pada mencit dengan dosis 0,26 mg/20 g BB. Suspensi PTU dibuat dengan konsentrasi 0,13 % dengan volume pemberian 0,2 cc/20 g BB. Suspensi PTU dibuat dengan cara menggerus 1 tablet PTU di dalam lumpang, ditambahkan Na CMC 0,5 % (Na CMC ditaburkan kedalam air suling panas sebanyak 20 x beratnya di dalam lumpang gerus sampai homogen), digerus hingga terbentuk suspensi.

### **Pembuatan sediaan suspensi ekstrak etanol daun sirsak**

Sediaan dibuat dengan mensuspensikan ekstrak kedalam Na CMC 0,5%. Konsentrasi ekstrak yang dibuat 1%, 3% dan 9%.

### **Perencanaan Dosis**

Dosis ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang akan diberikan pada mencit adalah 2 mg/20 g BB, 6 mg/20 g BB dan 18 mg/20 g BB.

### **Perlakuan Pada hewan Percobaan**

Hewan percobaan dibagi menjadi 5 kelompok, masing- masing kelompok terdiri dari 9 ekor mencit. Sebelum perlakuan, setiap hewan dipuasakan lebih kurang 18 jam, tapi air tetap diberikan, kemudian hewan diperlakukan.

### **Kelompok I**

Diberikan makanan standar dan minum serta larutan NaCMC 0.5% selama 7, 14, 21 hari (kontrol negatif).

### **Kelompok II**

Diberikan makanan lemak tinggi, minum dan suspensi PTU dosis 0,26 mg/20g BB selama 7, 14, 21 hari (kontrol positif).

### **Kelompok III**

Diberikan makanan lemak tinggi, minum dan suspensi PTU dosis 0,26mg/20g BB, kemudian diberi suspensi ekstrak etanol daun sirsak secara oral selama 7, 14, 21 hari dengan dosis 2 mg/20 g BB (dosis I).

### **Kelompok IV**

Diberikan makanan lemak tinggi, minum dan suspensi PTU dosis 0,26mg/20g BB, kemudian diberi suspensi ekstrak etanol

daun sirsak secara oral selama 7, 14, 21 hari dengan dosis 6 mg/20 g BB (dosis II).

### **Kelompok V**

Diberikan makanan lemak tinggi, minum dan suspensi PTU dengan dosis 0,26mg/20g BB, kemudian diberi suspensi ekstrak etanol daun sirsak secara oral selama 7, 14, 21 hari dengan dosis 18 mg/20 g BB (dosis III). Perlakuan terhadap hewan percobaan dilakukan setiap hari satu kali selama 21 hari.

### **Pengukuran kadar LDL darah mencit putih jantan**

Pengukuran kadar LDL dilakukan pada hari ke 7, 14 dan 21. Darah diambil dengan cara memotong pembuluh darah leher mencit dan ditampung dalam tabung eppendorf, kemudian didiamkan selama 15 menit lalu disentrifus selama 20 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Bagian cairan jernih dari darah (serum) digunakan untuk pengukuran kadar LDL menggunakan alat fotometer klinikal (Microlab 300®).

### **Analisa Data**

Data hasil penelitian dianalisa secara statistik dengan menggunakan metoda uji statistik analisa variansi (Anova) dua arah SPSS 17 dan dilanjutkan dengan uji jarak berganda metoda Duncan (Jones, 2010).

### **Hasil dan Pembahasan**

Hasil karakterisasi organoleptik ekstrak daun sirsak menunjukkan bau khas aromatik, warna coklat kehitaman, bentuk kental dan rasa pahit.

**Tabel I.** Hasil penetapan parameter susut pengeringan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.)

N O	W <sub>0</sub>	W <sub>1</sub>	W <sub>2</sub>	A
1	12,3377	13,349 6	13,198 8	14,9026
2	12,636 1	13,676 7	13,521 5	14,9245
3	12,374 8	13,396 4	13,254 5	13,8899
	Jumlah			43,717
	Rata-rata ± SD			14,5723±0,59

Hasil penetapan parameter susut pengeringan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) didapat persen rata-ratanya adalah 14,5723 %.

**Tabel II.** Hasil penetapan parameter kadar abu ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.)

N O	W <sub>0</sub>	W <sub>1</sub>	W <sub>2</sub>	A
1	33,6725	35,679 4	37,792 5	5,9943
2	38,165 5	40,188 6	38,256 9	4,5178
3	38,471 4	40,182 5	38,563 1	5,3591
	Jumlah			15,8712
	Rata-rata ± SD			5,2904±0,74

Hasil penetapan parameter kadar abu ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) didapat persen rata-ratanya adalah 5,2905 %

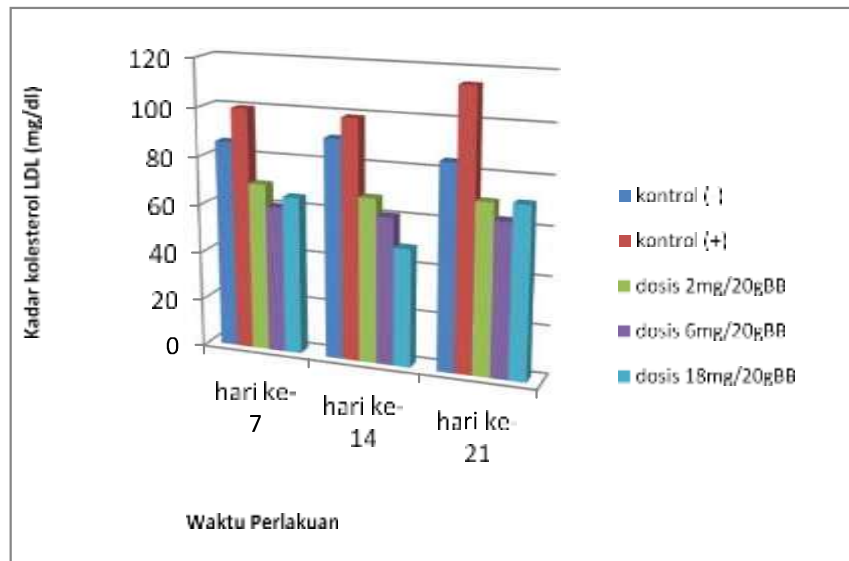
**Tabel III.** Hasil pemeriksaan kadar LDL darah mencit putih jantan setelah pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.)

Kelompok	Nomor Hewan	Kadar LDL Darah (mg/dL)		
		Hari Ke-7	Hari Ke-14	Hari Ke-21
Kontrol (-)	1	94,76	92,04	94,71
	2	74,61	92,84	80,55
	3	88,58	86,67	78,59
	Jumlah	257,95	271,55	253,85
	<b>Rata-rata ± SD</b>	<b>85,98±10,32</b>	<b>90,45±3,28</b>	<b>84,61±8,79</b>
Kontrol (+)	1	98,37	81,69	93,73
	2	100,73	104,88	124,72
	3	100,93	110,38	124,91
	Jumlah	300,03	296,95	343,37
	<b>Rata-rata ± SD</b>	<b>99,89±1,34</b>	<b>98,98±15,22</b>	<b>114,45±17,94</b>
Dosis 2 mg/ 20 g BB	1	64,99	76,99	59,46
	2	73,94	61,43	81,02
	3	69,62	65,22	70,56
	Jumlah	208,55	203,64	211,04

Kelompok	Nomor Hewan	Kadar LDL Darah (mg/dL)		
		Hari Ke-7	Hari Ke-14	Hari Ke-21
	<b>Rata-rata ± SD</b>	<b>69,51±4,47</b>	<b>67,88±8,11</b>	<b>70,34±10,78</b>
Dosis 6 mg/ 20 g BB	1	73,69	63,70	64,45
	2	47,52	42,09	59,57
	3	60,32	76,78	66,47
	Jumlah	181,53	182,57	190,49
	<b>Rata-rata ± SD</b>	<b>60,51±13,08</b>	<b>60,85±17,51</b>	<b>63,49±3,54</b>
Dosis 18 mg/ 20 g BB	1	47,67	41,34	77,32
	2	81,13	64,61	56,03
	3	66,92	40,27	78,61
	Jumlah	195,72	146,22	211,96
	<b>Rata-rata ± SD</b>	<b>65,24±16,79</b>	<b>48,74±13,75</b>	<b>70,65±12,68</b>

**Tabel IV.** Data persentase penurunan kadar LDL darah mencit pada variasi tiga dosis yang dibandingkan dengan kontrol positif.

Perlakuan	Persentase penurunan kadar LDL darah mencit dari kontrol positif		
	pada hari ke-7 (%)	pada hari ke-14(%)	pada hari ke-21 (%)
Dosis 2 mg/20 g BB	30,41	31,42	38,54
Dosis 6 mg/20 g BB	39,42	39,53	44,52
Dosis 18 mg/20 g BB	34,69	50,76	38,27



**Gambar 1.** Diagram batang pemeriksaan kadar LDL

Diagram batang pemeriksaan kadar LDL darah mencit setelah pemberian makanan standar, suspensi PTU, makanan lemak tinggi dan pemberian ekstrak daun sirsak dengan tiga variasi dosis (2mg/20 g BB; 6 mg/20 g BB; 18 mg/20 g BB) pada pengamatan hari ke 7, 14 dan 21.

**Tabel V.** Hasil pengujian berdasarkan statistik Anova dua arah pada perlakuan dan hari terhadap kadar LDL darah mencit putih jantan.

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable:Kadar LDL

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	13813.016 <sup>a</sup>	14	986.644	7.131	.000
Intercept	265244.189	1	265244.189	1917.110	.000
Perlakuan	12497.725	4	3124.431	22.583	.000
Hari	409.832	2	204.916	1.481	.244
Perlakuan * Hari	905.459	8	113.182	.818	.593
Error	4150.687	30	138.356		
Total	283207.893	45			
Corrected Total	17963.704	44			

a. R Squared = ,769 (Adjusted R Squared = ,661)

**Tabel VI** Hasil uji Duncan dari faktor perlakuan (dosis) terhadap hasil rata-rata pemeriksaan kadar LDL darah mencit putih jantan.

<b>Kadar LDL</b>				
Duncan <sup>a,b</sup>				
Perlakuan	N	Subset		
		1	2	3
Dosis 18 mg/20 g BB	9	61.5444		
Dosis 6 mg/20 g BB	9	61.6211		
Dosis 2 mg/20 g BB	9	69.2478		
Kontrol Negatif	9		87.0167	
Kontrol Positif	9			104.4422
Sig.		.199	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 138,356.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000.

b. Alpha = 0,05.

Pada hasil statistik dapat dilihat tabel dependen variable menunjukkan data bahwa untuk faktor perlakuan (dosis) memperlihatkan pengaruh yang nyata ( $p < 0,05$ ), faktor hari (lama pemberian) tidak memperlihatkan pengaruh yang nyata ( $p > 0,05$ ), sedangkan hasil pengujian berdasarkan statistik F juga menunjukkan bahwa tidak terjadi pengaruh interaksi antara perlakuan (dosis) dan hari (lama pemberian) terhadap penurunan kadar LDL darah mencit putih jantan ( $p > 0,05$ ). Dari tabel uji Duncan faktor perlakuan (dosis) diatas menunjukkan bahwa dosis 2 mg/20g BB, dosis 6 mg/20g BB dan dosis 18 mg/20g BB berada dalam subset pertama, ini berarti ketiga dosis tidak berbeda nyata dan berpengaruh efeknya terhadap penurunan kadar LDL, dibandingkan dengan kontrol negatif yang berada pada subset kedua dan kontrol positif berada pada subset ketiga yang berarti menunjukan kadar kolesterol LDL yang sangat tinggi. Berdasarkan hasil penelitian yang

telah dilakukan dapat diasumsikan bahwa pemberian ekstrak etanol daun sirsak pada ketiga variasi dosis (dosis 2mg/20g BB, 6 mg/20g BB dan 18 mg/20g BB) dapat menurunkan kadar LDL kolesterol darah pada mencit putih jantan yang telah diinduksi makanan lemak tinggi dan propiltiourasil. Sedangkan faktor hari (lama pemberian) tidak memperlihatkan pengaruh yang nyata ( $p > 0,05$ ) terhadap penurunan kadar LDL. Ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) mengandung senyawa  $\beta$ -sitosterol dan stigmasterol (Somasundaram, 2013). Jones (2000) menyatakan bahwa  $\beta$ -sitosterol dapat menurunkan konsentrasi kolesterol pada laki-laki dewasa yang hiperlipidemia.

## KESIMPULAN

Pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) dapat menurunkan kadar LDL darah mencit putih jantan yang telah diinduksi makanan lemak tinggi dan propiltiourasil.

Faktor hari (lama pemberian) tidak memperlihatkan pengaruh yang nyata ( $p > 0,05$ ) dengan penurunan kadar LDL darah mencit putih jantan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adeyemi, D.O., Komolafe, O.A., Adewole, S.O., Obuator, E.M. (2009). Antihyperlipidemic activities of *Annona muricata* Linn. *Int. J. Alt. Med.* Volume 7 (1);1-8.
- Champy, P., Melot, A., Guerineau, E. V., Gleye, C., Fall, D., Hoglinger, G.U., Ruberg, M., Lannuzel, A., Laprovote, O., Laurens, A., Hocquemiller, R. (2005). Quantification of acetogenins in *Annona muricata* linked to atypical parkinsonism in guadeloupe. *Mov. Disord.* 20, (12), 1629-1633
- Departemen Kesehatan RI, Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan, Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. (2000). *Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat.* (Cetakan 1). Jakarta: Departemen Kesehatan
- Departemen Kesehatan RI. (1979). *Farmakope Indonesia.* (Edisi 3). Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan RI. (2008). *Farmakope Herbal Indonesia.* (Edisi 1). Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Foong, P.C., Hamid, R.A. (2012). Evaluation of anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Annona muricata* leaves. *Def. Bio. Sci.* Vol 22, (6): 1301-1307.
- Gajalakshmi, S., Vijayalakshmi, V., Devi, R. (2011). Phytochemical and pharmacological properties of *Annona muricata*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* Vol 4, 3-6.
- Ganiswara, G. S. (1995). *Farmakologi dan terapi.* (Edisi IV). Jakarta: Bagian Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.
- George, V.C., Kumar, DR. N., Rajkumar, V., Suresh, PK., Kumar R.A. (2012). Quantitative assessment of the relative antineoplastic potential of the n-butanolic Leaf extract of *Annona muricata* Linn. in normal and immortalized human cell lines. *Asian. Pac. J. Cancer. Prev.* Vol 13, 699-704.
- Hasnawati, E. (2012). *Keajaiban sirsak menumpas 7 penyakit yang mematikan.* Yogyakarta: Easy Media.
- Hasrat, JA., De, Bruyne, T., De, Backer, JP., Vauquelin, G., Vlietinck, AJ. (1997). Isoquinoline Derivatives Isolated from the Fruit of *Annona muricata* as 5-HTergic 5-HT<sub>1A</sub> Receptor Agonists in Rats: Unexploited Antidepressive (Lead) Products. *J. Pharm. Pharmacol.* Vol 49, 1145-1149.
- Jones, D. S. (2010). *Statistika farmasi.* Penerjemah Harrizul Rivai dan Hesty Utami Ramadaniati. Jakarta: Penerbit EGC.
- Jones, P.J., Sarjaz, M.R., Ntanios, F.Y., Vanstone, C.A., Feng, J.Y., Parsons, W.E., (2000). Modulation of plasma lipid levels and cholesterol kinetics by phytosterol versus pytostanol esters. *J. Lipid Research.* Vol 41, 697-705.



- Kim, G.S., Zeng, L., Alali, F., Rogers, L.L., Wu, F.E., Sastrodihardjo, S., McLaughlin, J.L. (1998). Muricoreacin and murihexocin C mono-tetrahydrofuran acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. *Phytochemistry*. 38(1) : 454-460.
- Melo, J.G And Thiago, A.S.A.(2010). Antiproliferative Activity, Antioxidant Capacity and Tannin content in plants of semi- Arid Northeastern Brazil. *J. Molecules*, 15, 8534-8542.
- Murray, R. K., Granner D. K., Mayes, P. A. & Rodwell V. W. (2006). *Biokimia Harper*. (Edisi ke-25).Diterjemahkan oleh A. Hartono. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Nwokocha, CR., Owu, DU., Gordon, A., Thaxter, K., Mccalla, G., Ozolua, RL, Young, L. (2012). Possible mechanism of action of the hypotensive effect of *Annona muricata* (soursop) in normotensive Sprague-Dawley rats. *Phar. Biol.* Vol 50, 1436-1441.
- Osorio, E., Arango, GJ., Jimenez, N., Alzate F., Ruiz G., Gutierrez, D., Paco, MA., Gimenez, A., Robledo, S. (2007). Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. *J. Ethnopharmacol.* Vol 111, (3), 630-635.
- Padma, P., Pramod N.P., Thyagarajan S.P., dan Khosa R.L. (1999). Effect of the extract of *Annona muricata* and *Petunia nyctaginiflora* on herpes simplex virus. *Journal Ethnopharmacol.* 61(1):81-83.
- Pathak, P., Saraswathy., Vora, A., Saval J. (2010). In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of the leaves of *Annona muricata*. *Inter Journal of Pharma Research and Development.* 2(5),1-6.
- Price, S. A., & Wilson, N. L. (2006). *Patofisiologi konsep klinis proses-proses penyakit*.(Edisi 6). Penerjemah H. Hartanto dkk. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Prusti, A., Mishra, S. R., Sahoo, S. & Mishra, S. K. (2008). Antibacterial activity of some Indian medicinal plants. *Journal of Ethnobotanical Leaflets.* 12, 227-230.
- Somasundaram, J. (2013). Evaluation of laxative effect of ethanol extract of leaves of *Annona muricata* L. *Int. J. Innovative Drug Discovery.* Vol 3(1): 28-32.

Penelitian

## Potensi Ekstrak Air Daun Sirsak Sebagai Penurun Kolesterol dan Pengendali Bobot Badan

(*Soursop Leaves Aqueous Extract Inhibits Weight Gain and Reduces Blood Cholesterol Level In High Fat Diet Rat Model*)

Lelly Yuniarti<sup>1\*</sup>, Miranti Kania Dewi<sup>2</sup>, Uci Ary Lantika<sup>3</sup>, Tryando Bhatara<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bagian Biokimia, <sup>2</sup>Bagian Farmakologi, <sup>3</sup>Bagian Biologi Medik, <sup>4</sup>Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung, Jl. Hariangbanga No.2, Bandung 40292, Jawa Barat, Indonesia

\*Penulis untuk korespondensi: lelly.yuniarti@gmail.com

Diterima 14 Januari 2016, Disetujui 25 Juni 2016

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak air daun sirsak terhadap bobot badan dan kadar kolesterol darah. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan 5 kelompok perlakuan masing-masing sebanyak 3 ulangan. Hewan coba berupa tikus galur Wistar sebanyak 15 ekor dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, yaitu kelompok yang diberikan ekstrak air daun sirsak dengan dosis 200 mg/kgBB, 400mg/kgBB, kontrol positif, kontrol negatif, dan kontrol normal. Rerata bobot badan dan kadar kolesterol kemudian dianalisis menggunakan *Sapphiro Wilk test*, ANOVA dan *Kruskall Wallis*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua kelompok yang diberikan ekstrak daun sirsak memiliki efek menghambat peningkatan bobot badan jika dibandingkan dengan kontrol normal, sedangkan untuk kadar kolesterol darah didapatkan bahwa seluruh kelompok perlakuan menunjukkan kadar kolesterol darah yang sama dengan kelompok yang diberikan simvastatin. Kesimpulan penelitian ini adalah bahwa ekstrak air daun sirsak memiliki efek mengendalikan bobot badan dan kolesterol darah. Efek terhadap kolesterol darah serupa dengan simvastatin, karena ekstrak air daun sirsak mengandung flavonoid yang mempunyai efek menghambat enzim HMG CoA reduktase, serupa dengan mekanisme kerja simvastatin dalam menurunkan kadar kolesterol darah.

**Kata kunci:** ekstrak air daun sirsak, pengendalian bobot badan, kolesterol

### ABSTRACT

This study aim to determine effect of soursop leaves aqueous extract on bodyweight and blood cholesterol levels in rats. This is an experiment with random with 5 intervention group each given 3 repetition. 15 Wistar rats divide into 5 groups. First group given soursop leaves aqueous extract of 200 mg/kgBB, second group 400mg/kgBB, third group acted as positive control, fourth negative control and the last group given no intervention. *Sapphiro Wilkins*, ANOVA and *KruskallWallis* were used to analyze body weight average and cholesterol level. Results showed groups given soursop water extract show inhibition in increased body weight compared to normal group. Cholesterol level in all groups showed same results with groups given simvastatin. Conclusion of this study was that soursop water extract showed bodyweight control effect. Soursop water extract effect on cholesterol similar to simvastatin since it contains flavonoid which contribute to HMG CoA reductase enzyme. It is similar with simvastatin mechanism to lower cholesterol level.

**Key words:** soursop leaves aquos extract, control body weight, cholesterol,

## PENDAHULUAN

Dengan perubahan gaya hidup saat ini, 1,6 miliar orang dewasa di seluruh dunia mengalami bobot badan berlebih (*overweight*), dan sekurangnya 400 juta diantaranya mengalami obesitas. Pada tahun 2015, diperkirakan 2,3 miliar orang dewasa akan mengalami *overweight* dan 700 juta di antaranya obesitas (WHO, 2006).

Obesitas adalah akumulasi lemak yang abnormal atau berlebihan yang dapat mengganggu kesehatan. Obesitas biasanya ditentukan melalui *Body Mass Index (BMI)* atau Indeks Massa Tubuh (IMT), diperoleh dari pembagian bobot badan dalam kilogram dibagi dengan tinggi badan dalam meter dan dikuadratkan ( $\text{kg/m}^2$ ) (Pico et.al., 2003). Perubahan gaya hidup selain menyebabkan obesitas juga dapat menyebabkan hiperlipidemia, yaitu peningkatan kadar kolesterol di dalam darah. Hiperlipidemia berhubungan dengan proses atherogenesis yang merupakan faktor risiko penyakit jantung koroner. Tingkat kematian yang disebabkan penyakit jantung koroner cukup tinggi. WHO melaporkan lebih dari tujuh juta orang di dunia meninggal karena penyakit ini pada tahun 2002. Di Indonesia penyakit jantung koroner menduduki peringkat pertama penyebab kematian. Penurunan kadar kolesterol darah sebesar 1% akan menurunkan risiko penyakit kardiovaskuler 2% dan kenaikan kadar HDL sebesar 1% akan menurunkan risiko penyakit kardiovaskular sebesar 2-3% (Adam, 2006).

Obat yang sering digunakan untuk menurunkan kolesterol adalah simvastatin, yang berkerja dengan mekanisme penghambatan pembentukan kolesterol dengan cara menghambat enzim HMG CoA reductase (*3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase*). Hanya saja, penggunaan simvastatin dalam jangka panjang dapat memberikan beberapa efek samping, antara lain hepatotoksik, malaise, rhabdomyolisis, miopati, dan lain lain. Oleh karena terlalu banyaknya efek samping dari penggunaan obat kimiawi dalam jangka panjang, maka saat ini masyarakat beralih dari pengobatan kimiawi menjadi herbal remedies. Salah satu tanaman obat yang diketahui memiliki efek anti hiperlipidemia adalah daun sirsak (Adeyemi et.al., 2009). Secara empiris masyarakat sering menggunakan jus buah sirsak dan rebusan daun sirsak untuk menurunkan bobot badan dan kolesterol darah. Kandungan pada buah dan daun sirsak seperti flavonoid, tannin dan saponin diduga berperan dalam hal ini.

Tujuan penelitian ini adalah untuk melihat efek ekstrak air daun sirsak dalam menurunkan berat badan dan kadar kolesterol pada tikus sebagai model.

## Bahan dan Metode

Subjek penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jantan galur *Wistar* berjenis kelamin jantan, kondisi sehat, bobot badan 150-250 g. Dilakukan proses adaptasi terhadap tikus selama 1 minggu sebelum penelitian. Selama proses adaptasi, tikus diberikan pakan standar dan air minum *ad libitum*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun sirsak, pakan standar dan pakan tinggi lemak (lemak sapi 5 bagian, kuning telur 10 bagian, dan air hingga 100 bagian), pakan normal, air minum, ekstrak daun sirsak, simvastatin, CMC Na, dan propiltiourasil (PTU).

Alat-alat yang digunakan terdiri dari gelas ukur, kandang individual tikus yang dilengkapi wadah makanan dan minuman khusus, alat suntik untuk pemberian oral pada tikus, timbangan, sonde oral, spuit, gloves.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium murni *in vivo* dengan rancangan acak lengkap. Pada penelitian ini diberikan ekstrak air daun sirsak terhadap hewan coba model obesitas untuk melihat pengaruhnya terhadap berat badan dan kadar kolesterol total.

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi air daun sirsak dan konsentrasi simvastatin, sedangkan variable terikatnya adalah berat badan dan kolesterol. Variabel terkontrol adalah jenis kelamin, pakan, temperature, pencahayaan, dan ventilasi.

Daun sirsak yang digunakan diambil dari perkebunan Subang. Kemudian dilakukan ekstrak dengan air, yang dilakukan di Laboratorium Pusat Antar Universitas ITB Bandung. Sejumlah 10 kg daun sirsak dicuci bersih kemudian dipotong-potong membentuk simplisia dan dikeringkan menjadi 1 kg simplisia kering. Setelah kering simplisia ini dihancurkan. Daun sirsak yang telah menjadi bubuk direbus dengan menambahkan 5 L aquadest selama 2 jam disaring dengan ukuran 125 mesh, bagian yang masih kasar kemudian diekstrak. Campuran di atas lalu dimasukkan ke waterbath pada suhu 70 derajat celsius sampai lunak. Panaskan dalam oven dengan suhu 58 derajat celsius sampai kering. Hasil akhirnya adalah serbuk kering.

Peningkatan berat badan dan kolesterol darah tikus dilakukan dengan memberikan pakan tinggi lemak dan propiltiourasil (PTU) 0,01. Pakan tinggi lemak dibuat dari kuning telur dan lemak sapi dengan komposisi 5 bagian lemak sapi, 10 bagian kuning telur dan air sebagai bahan pembawanya hingga 100 bagian. Pembuatan emulsi ini dimulai

dengan menimbang semua bahan yaitu 10 g kuning telur dan 5 g lemak sapi. Lemak sapi dipanaskan hingga meleleh kemudian ditambahkan dengan kuning telur dan diaduk hingga homogen. Setelah itu ditambahkan air 15 ml dan diaduk cepat hingga diperoleh korpus emulsi dan ditambahkan sisa air hingga 100 ml. Pembuatan pakan diet tinggi lemak ini dilakukan setiap hari selama dua minggu perlakuan diet tinggi lemak.

#### Rancangan Percobaan dan Pemberian Perlakuan

Berat badan diukur menggunakan neraca dalam satuan gram. Dikatakan obesitas apabila terdapat kenaikan berat badan hingga 15%. Kadar kolesterol diukur dengan metode enzimatik.

Pada penelitian ini akan melihat efek penurunan dan berat badan pada tikus sebagai model. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok:

1. Kelompok uji yang diberi diet tinggi lemak selama 30 hari dan PTU 0,01% dilanjutkan dengan pemberian ramuan ekstrak daun sirsak dengan dosis 200mg/kg berat badan per hari (1/2 n) dan NaCMC selama 14 hari.
2. Kelompok uji yang diberi diet tinggi lemak selama 30 hari dan PTU 0,01% dilanjutkan dengan pemberian ramuan ekstrak daun sirsak dengan dosis 400mg/kg berat badan per hari (n) dan NaCMC selama 14 hari.
3. Kelompok kontrol positif yang diberi diet tinggi lemak selama 30 hari dan PTU 0,01% dilanjutkan dengan pemberian obat simvastatin dan NaCMC selama 14 hari.
4. Kelompok kontrol negatif yang diberi diet tinggi lemak dengan kandungan lemak 25%, PTU 0,01% dan NaCMC.
5. Kelompok normal yang diberi diet standar dan NaCMC.

Jumlah sampel minimal dihitung dengan menggunakan rumus Gomez dan didapatkan tiga buah sampel untuk setiap kelompok perlakuan. Total hewan coba yang dibutuhkan adalah 15 ekor tikus.

#### Prosedur Penelitian

Sebelum dilakukan penelitian, dilakukan persiapan hewan coba selama 1 minggu. Lalu dilakukan induksi pada tikus dengan menggunakan pakan tinggi lemak dan PTU sampai tikus mengalami kenaikan berat badan sebesar 15%. Setelah itu dilakukan intervensi pada hewan coba berdasarkan kelompok-kelompok yang telah ditetapkan selama 2 minggu. Berat badan diukur sebelum dan sesudah intervensi, setelah intervensi, darah tikus diambil untuk dilakukan uji pengukuran kadar kolesterol.

Pengukuran bobot badan awal ( $B_0$ ) dilakukan setelah masa adaptasi selama 7 hari, kemudian pengukuran kedua dilakukan setelah masa induksi selama 30 hari ( $B_i$ ) dan pengukuran terakhir dilakukan setelah pemberian terapi selama 14 hari ( $B_a$ ). Penurunan berat badan dinilai dengan melihat persen penurunan berat badan, menggunakan rumus perhitungan:  $((B_a - B_i) / B_a) \times 100\%$ .

Untuk mengukur kadar kolesterol darah dilakukan pengambilan darah melalui jantung sebanyak  $\pm 3$  cc. Sebelumnya dilakukan pembiusan pada tikus dengan menggunakan chloroform. Selanjutnya darah disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Bagian jernih (serum) diambil 10  $\mu$ l dan digunakan untuk analisis. Kolesterol darah diukur dengan menggunakan metode enzimatis, dan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 546 nm.

#### Analisis Data

Data diuji normalitas dengan menggunakan *Shapiro Wilks Test*. Data akan diuji dengan menggunakan ANOVA test untuk berat badan dan *Kruskal Wallis* untuk kadar kolesterol. Uji statistik lanjutan dengan menggunakan *Post Hoc Test* untuk mengetahui pada kelompok perlakuan mana yang menunjukkan hasil paling bermakna. Data diolah dengan menggunakan program SPSS 17.0

Tabel 1. Rerata Berat Badan

Kelompok Perlakuan	Rerata BB (Berat Badan)		
	B0 (BB awal)	Bi (BB setelah induksi)	Ba (BB setelah terapi)
I	213.00	301.00	301.00
II	226.00	302.33	302.33
III	193.67	311.33	310.33
IV	237.67	324.67	324.00
V	215.33	213.00	224.67

## HASIL PENELITIAN

### *Pengaruh Pemberian Ekstrak Air Daun Sirsak sebagai Antiobesitas*

Hasil pengukuran berat badan awal ( $B_0$ ), berat badan akhir masa induksi ( $B_i$ ) dan berat badan setelah pemberian terapi ( $B_a$ ) dapat dilihat pada tabel 1 dan persen penurunan berat badan dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil uji non parametrik melalui ANOVA Test untuk penurunan berat badan didapatkan  $P = 0,019$ . Dilihat dari nilai sig yang  $< 0,05$ , maka dapat disimpulkan bahwa paling tidak terdapat perbedaan penurunan BB yang bermakna pada dua kelompok. Untuk melihat pada kelompok manakah yang terdapat perbedaan yang bermakna maka selanjutnya dilakukan analisis Post Hoc dengan menggunakan Tukey HSD.

Berdasarkan hasil analisis uji statistik didapatkan antara kelompok perlakuan dan kelompok yang diberikan diet standar terdapat perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa antara kelompok yang diberi ekstrak air daun sirsak mengalami peningkatan berat badan yang berbeda secara bermakna dibandingkan kelompok yang hanya diberi diet standar. Selain itu, berdasarkan hasil analisis uji statistik juga didapatkan antara kelompok ekstrak daun sirsak 200mg/kgBB dan kelompok ekstrak daun sirsak 400mg/kgBB tidak

terdapat perbedaan yang bermakna ( $p > 0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan efek dalam menghambat peningkatan bobot badan yang bermakna dengan penambahan dosis ekstrak air daun sirsak.

Hasil perhitungan pada tabel 3 kelompok yang diberikan ekstrak air daun sirsak 200mg/kgBB terjadi peningkatan bobot badan sebesar 0,0013%. Pada kelompok yang diberikan ekstrak air daun sirsak 400mg/kgBB terjadi pula peningkatan bobot badan sebesar 0,018%. Peningkatan ini masih lebih kecil dibandingkan dengan kelompok yang diberikan diet standar, dimana terdapat peningkatan bobot badan sebesar 5,45%. Berdasarkan data tersebut terlihat bahwa pemberian ekstrak air daun sirsak memiliki efek menghambat peningkatan bobot badan.

Ditinjau dari hasil analisis uji statistik didapatkan tidak terdapatnya perbedaan yang bermakna antara kedua dosis ekstrak air daun sirsak, tetapi jika dilihat berdasarkan rerata persen penurunan bobot badan, pada ekstrak air daun sirsak 200mg/kgBB peningkatan bobot badan yang terjadi lebih kecil dibanding ekstrak air daun sirsak 400mg/kgBB.

### *Pengaruh Pemberian Ekstrak Air Daun Sirsak terhadap Kadar Kolesterol Darah*

Rerata hasil pengukuran kadar kolesterol darah setelah 14 hari pemberian terapi dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 2. Rerata Persen Penurunan Berat Badan

Kelompok Perlakuan	% Penurunan BB		
	Tikus 1	Tikus 2	Tikus 3
I	-0,64	-2,4	3,03
II	0,95	-1,35	0,34
III	-1,07	2,76	-0,92
IV	-0,33	-1,41	2,51
V	-4,19	-5,7	-6,49

Tabel 3. Rerata Kadar Kolesterol Darah

Kelompok Perlakuan	Rerata
	Kadar Kolesterol Darah (mg/dL)
I	97
II	102
III	97
IV	86
V	73,33

Dari Tabel 3 dapat dilihat bahwa rerata kadar kolesterol untuk kelompok hewan coba yang diberi ekstrak daun sirsak 200 mg/dl adalah 97 mg/dl, sedangkan rerata kadar kolesterol hewan coba yang diberikan ekstrak daun sirsak 400 mg/dl adalah 102 mg/dl. Untuk rerata kadar kolesterol darah pada kelompok kontrol positif adalah 97 mg/dl dan kelompok normal adalah 73.33 mg/dl, serta kontrol negatif adalah 86 mg/dl.

Berdasarkan hasil uji statistik didapatkan tidak terdapat perbedaan kadar kolesterol yang bermakna antara kelompok yang diberikan ekstrak air daun sirsak 200mg/kgBB dengan kelompok yang diberi simvastatin ( $p=0,658$ ). Didapatkan juga tidak terdapatnya perbedaan yang bermakna antara kelompok yang diberikan ekstrak air daun sirsak 400mg/kgBB dengan kelompok yang diberi simvastatin ( $p=0,275$ ).

Dari perhitungan statistika dengan menggunakan *kruskal wallis test* didapatkan  $p=0,025$ . Hal ini berarti paling tidak terdapat perbedaan yang bermakna antar dua kelompok ( $p<0,05$ ) pada penelitian ini. Untuk melihat lebih lanjut, kemudian dilakukan uji *post hoc* dengan menggunakan Mann-Whitney.

Dari hasil uji Mann-Whitney didapatkan  $p=0,658$  ( $p>0,05$ ). Hal ini berarti tidak terdapat perbedaan kadar kolesterol yang bermakna antara kelompok yang diberikan ekstrak air daun sirsak 200mg/kgBB dengan kelompok yang diberikan simvastatin. Sedangkan perbandingan antara kelompok yang diberikan ekstrak air daun sirsak 400mg/kgBB uji Mann-Whitney didapatkan  $p=0,275$  ( $p<0,05$ ), yang berarti tidak terdapat perbedaan kadar kolesterol yang bermakna antara kelompok yang diberikan ekstrak air daun sirsak 400mg/kgBB dengan kelompok yang diberi simvastatin.

Hasil uji perbandingan kadar kolesterol pada kelompok ekstrak air daun sirsak 200mg/kgBB dan kelompok yang diberikan ekstrak air daun sirsak 400mg/kgBB, didapatkan bahwa  $p=0,184$  ( $p>0,05$ ), yang berarti antara kelompok yang diberi ekstrak air daun sirsak 200mg/kgBB dan kelompok yang diberikan ekstrak air daun sirsak 400mg/kgBB tidak terdapat perbedaan kadar kolesterol yang signifikan. Dapat disimpulkan bahwa dosis ekstrak daun sirsak yang berbeda tidak memberikan perbedaan yang bermakna pada kadar kolesterol darah.

## PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian di atas didapatkan bahwa ekstrak air daun sirsak tidak secara langsung

menurunkan berat badan namun dapat menghambat peningkatan bobot badan. Hal ini kemungkinan berkaitan dengan kandungan saponin yang dimiliki daun sirsak (Taylor, 2002). Penelitian terdahulu yang menguji efek saponin memperlihatkan bahwa saponin dapat menghambat kerja enzim lipase pankreas sehingga dapat menghambat penyerapan lemak di usus dan akhirnya menghambat penurunan bobot badan (Karu, 2007). Pada penelitian ini, bobot badan setelah pemberian terapi ekstrak air daun sirsak selama 14 hari tidak mengalami penurunan. Hal ini kemungkinan disebabkan terdapatnya perbedaan kadar saponin pada jenis tanaman yang berbeda, sehingga besarnya efek penghambatan terhadap enzim lipase pankreas pun akan berbeda.

Secara definisi, obesitas adalah suatu keadaan kronis yang ditandai dengan peningkatan akumulasi lemak di jaringan adiposa (Tsigos, 2008). Definisi ini menunjukkan bahwa indikator obesitas tidak hanya berdasarkan berat badan, tapi dapat juga berdasarkan akumulasi lemak di jaringan. Terdapat penelitian yang dilakukan dengan tujuan melihat adanya hubungan antara berat badan dan lemak tubuh (*body fat*) dan didapatkan bahwa terdapat hubungan yang tidak linier antara berat badan dan lemak tubuh (Meeuwssen, 2010). Berdasarkan penelitian tersebut dapat diasumsikan bahwa meskipun pada penelitian ini tidak terjadi penurunan berat badan, namun kadar lemak tubuhnya mungkin saja mengalami penurunan.

Pada penelitian ini, berdasarkan persen penurunan badan, didapatkan bahwa ekstrak air daun sirsak 200mg/kgBB memiliki efek penghambatan berat badan yang lebih baik dibandingkan ekstrak air daun sirsak 400mg/kgBB. Hal ini kemungkinan disebabkan adanya efek antagonis dari interaksi beberapa senyawa yang terdapat dalam daun sirsak, dimana semakin besar dosis menyebabkan peningkatan efek antagonisnya.

Obesitas berkaitan erat dengan gangguan metabolisme, diantaranya resistensi insulin. Adanya resistensi insulin menyebabkan terjadinya gangguan metabolisme glukosa (Qantanani, 2007). Gangguan metabolisme glukosa ini dapat menjadi salah satu penyebab turunnya berat badan pada kelompok IV yang diberi diet tinggi lemak tanpa diberi terapi.

Dari hasil penelitian didapat bahwa ekstrak air daun sirsak berpengaruh terhadap kadar kolesterol darah. Pada penelitian ini juga didapat bahwa ekstrak air daun sirsak mempunyai efek yang sama baik dengan simvastatin dalam menurunkan kolesterol. Hal ini dikarenakan daun sirsak mengandung flavonoid (Taylor, 2002) yang mempunyai efek

menghambat enzim HMG Co A reduktase (Gross, 2004) sehingga dapat bekerja menurunkan kolesterol darah (Munish,2012). Mekanisme penghambatan enzim ini juga merupakan mekanisme kerja dari simvastatin (O'Sullivan, 2007).

Dalam penelitian ini juga didapatkan bahwa kadar kolesterol pada kelompok negatif dalam batas normal. Hal ini kemungkinan terjadi akibat dari efek penghentian yang tiba-tiba dari PTU yang digunakan sebagai induktor.

Berdasarkan hasil analisa uji statistik didapatkan tidak terdapat perbedaan bermakna antara ekstrak air daun sirsak 200 mg/kgBB dengan ekstrak air daun sirsak 400 mg/kgBB. Namun, berdasarkan rerata kadar kolesterol pada pemberian ekstrak air daun sirsak 200 mg/kgBB kadar kolesterol darahnya sedikit lebih rendah dibandingkan dengan kadar kolesterol pada pemberian ekstrak air daun sirsak 400 mg/kgBB.

Sebagai kesimpulan, ekstrak air daun sirsak tidak memiliki efek menurunkan berat badan, hanya menghambat kenaikan berat badan pada tikus model obese. ekstrak air daun sirsak mempengaruhi kadar kolestrol darah tikus model obese dengan efek yang sama baik dengan simvastatin.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih atas kontribusinya selama proses penelitian ini berlangsung, kami sampaikan kepada Laboratorium Pusat Antar Universitas ITB Bandung, LPPM Universitas Islam Bandung, Fakultas Kedokteran Unisversitas Islam Bandung.

*"Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini".*

## DAFTAR PUSTAKA

- Adam, J.M. 2006. Dislipidemia. Dalam : A.W. Sudoyo, B. Setyohadi, I. Alwi, M. S. K, & S. Setiati, ed : *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Edisi ke-4. Jilid III. Jakarta: FK-UI.Hal. 1926-32
- Adeyemi D., Adewole SO.,Komolafe OA., Obuotor EM.2009. Anti Hyperlipidemic Activities of *AnnonaMuricata* (Linn). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 7(1)

Gross M. 2004. Flavonoids and cardiovascular disease. *Pharmaceutical Biology* 42 : 21–35.

Karu N. 2007. Wight gain reduction in mice fed panax ginseng saponin, a pancreatic lipase inhibitor. *Journal Agricultural Food Chemistry* 55 :2824-2828.

Meeuwsen S, Horgan GW, Elia M.2010. The relationship between BMI and percent body fat, measured by bioelectrical impedance, in a large adult sample is curvilinear and influenced by age and sex. *Clinical Nutrition* 29 :560-566.

Munish G.2012. Effect of phyllanthusurinaria in biochemical profile of experimental hyperglycemic albino rats. *Research Journal of Pharmaceutical* 1:2-6.

Pico C, Oliver P, Sanchez J, Palou A. 2003. Gastric leptin: A putative role in the short term regulation of food intake. *British journal of Nutrition* 90 : 735-741.

Qatanani M, Lazar MA. 2007. Mechanism of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes and Development* 21 : 1443-1455.

Taylor L. 2002. Technical Data Report for *Graviola Annona Muricata*. Herbal secret of the Rain orest.2<sup>nd</sup> Ed.

Tsigos C. 2008. Management of obesity in adults: european clinical practice guidelines. *The European Journal of Obesity* 1 :106-116.

WHO. 2006. Obesity and Overweight. <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/obesity/en/>. Download : April 26, 2012.

O'Sullivan S. 2007. Statins : A review of benefits and risks. *TSMJ Vol. 8 : 52-56*



Article

# Use of an Extract of *Annona Muricata* Linn to Prevent High-Fat Diet Induced Metabolic Disorders in C57BL/6 Mice †

Sandramara Sasso <sup>1</sup>, Priscilla Cristovam Sampaio e Souza <sup>2</sup>, Lidiani Figueiredo Santana <sup>1</sup>,  
Claudia Andréa Lima Cardoso <sup>3</sup>, Flávio Macedo Alves <sup>4</sup>, Luciane Candeloro Portugal <sup>4</sup>,  
Bernardo Bacelar de Faria <sup>5</sup>, Anderson Fernandes da Silva <sup>1</sup>, Ana Rita Coimbra Motta-Castro <sup>6,7</sup>,  
Luana Silva Soares <sup>6</sup>, Larissa Melo Bandeira <sup>6</sup>, Rita de Cássia Avellaneda Guimarães <sup>1</sup>  
and Karine de Cássia Freitas <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Posgraduate Program in Health and Development in the Midwest Region, Medical School, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 79070-900 Mato Grosso do Sul, Brazil

<sup>2</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 79070-900 Mato Grosso do Sul, Brazil

<sup>3</sup> Course of Chemistry, State University of Mato Grosso do Sul, Dourados, 79070-900 Mato Grosso do Sul, Brazil

<sup>4</sup> Institute of Biosciences, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 79070-900 Mato Grosso do Sul, Brazil

<sup>5</sup> Medicina Diagnóstica Laboratory-Scapulatempo, Campo Grande, 79002-170 Mato Grosso do Sul, Brazil

<sup>6</sup> Laboratory of Clinical Immunology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 79070-900 Mato Grosso do Sul, Brazil

<sup>7</sup> Oswaldo Cruz Foundation, Campo Grande, 79074-460 Mato Grosso do Sul, Brazil

\* Correspondence: kcfreitas@gmail.com; Tel.: +55-67-3345-7882

† This paper is an extended version of master's thesis of the former student Sandramara Sasso.

Received: 4 May 2019; Accepted: 30 June 2019; Published: 2 July 2019



**Abstract:** *Annona muricata* Linn, commonly known as graviola, is one of the most popular plants used in Brazil for weight loss. The aim of this study is to evaluate the therapeutic effects of three different doses (50 mg/kg, 100 mg/kg, and 150 mg/kg) of aqueous graviola leaf extract (AGE) supplemented by oral gavage, on obese C57BL/6 mice. Food intake, body weight, an oral glucose tolerance test (OGTT), an insulin sensitivity test, quantification of adipose tissue cytokines, weight of fat pads, and serum biochemical and histological analyses of the liver, pancreas, and epididymal adipose tissue were measured. AGE had an anti-inflammatory effect by increasing IL-10 at doses of 50 and 100 mg/kg. Regarding the cholesterol profile, there was a significant decrease in LDL-cholesterol levels in the AGE 150 group, and VLDL-cholesterol and triglycerides in the AGE 100 and 150 groups. There was an increase in HDL cholesterol in the AGE 150 group. The extract was able to reduce the adipocyte area of the epididymal adipose tissue in the AGE 100 and 150 groups. According to the histological analysis of the liver and pancreas, no significant difference was found among the groups. There were no significant effects of AGE on OGTT and serum fasting glucose concentration. However, the extract was effective in improving glucose tolerance in the AGE 150 group.

**Keywords:** graviola; weight loss; obesity

## 1. Introduction

Obesity is a worldwide public health problem. It increases the risk of metabolic diseases such as hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, insulin resistance, heart disease, type 2 diabetes, atherosclerosis, and cancer [1,2].



The etiology of obesity is complex and multifactorial. Obesity results from the interaction of genetic/epigenetic, environmental, emotional, lifestyle factors and that technically obesity results from a positive energy balance: More energy intake than energy expenditure [3]. Although genetic factors are determinant in the development of obesity, metabolic factors, an unhealthy diet, and a sedentary lifestyle provide conditions for the development of this disorder [4].

Obesity is an increased deposition of white adipose tissue and phenotypic changes in this tissue. It is associated with metabolic changes such as increased production of pro-inflammatory mediators. This leads to organs dysfunction and chronic low-grade inflammation with high levels of proinflammatory cytokines, such as interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and chemokines, such as monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1), which in turn promotes migration of macrophages into the adipose tissue and increases the release of cytokines. In parallel, low levels of interleukin 10 (IL-10) are observed in obese individuals, and worsens their metabolic profile, since IL-10 inhibits the synthesis of pro-inflammatory cytokines [2,5–8].

To control such abnormalities, several methods have been suggested to regulate obesity and weight gain, including agents that could inhibit fat absorption, control biochemical parameters, such as, serum glucose, serum triglyceride, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), and very low-density lipoprotein (VLDL) levels, reduce systemic inflammation, and induce weight loss [9]. Medicinal plants, popularly indicated for the treatment of obesity, have been used in many countries to control weight gain and obesity [10].

For these reasons, anti-obesity agents, including infusions and extracts, are widely used for weight control in obese individuals, in addition to reducing biochemical parameters [11].

Tropical countries have a wide variety of flora and a high number of food and medicinal plants. There is information available on the potential functional properties of several of these plants [12]. The investigation of such properties may be of interest for both the pharmaceutical and the food industry [13].

Among the species of pharmaceutical interest, the leaf of *Annona muricata* Linn (Annonaceae), commonly known as soursop or graviola, is used routinely for weight control. It is used in traditional medicine as an antihypertensive, vasodilator, antidiabetic, and hypolipidemic agent due to the presence of several bioactive compounds, such as acetogenins, flavonoids, tannins, alkaloids, coumarins, and terpenoids [14,15]. Therefore, considering the popular use of tea from graviola leaves to prevent obesity and its complications, it is important to verify whether treatment using an aqueous extract of *Annona muricata* Linn could also be beneficial for the treatment of obesity. Thus, the objective of this study is to verify the effects of three different doses of aqueous extract of *Annona muricata* on obese C57BL/6 mice induced by a high-fat diet.

## 2. Materials and Methods

### *Extraction of Plant Material*

Leaves of *Annona muricata* Linn were collected in June 2015 from an adult specimen that produces flowers and fruits, in the municipality of Campo Grande, Mato Grosso do Sul state, Brazil. The tree was properly identified. The geographical coordinates defined by manual GPS were 22°29'42.6" S and 054°37'1.6" W. A voucher specimen (number 53,928) was deposited at the Herbarium CGMS of the Federal University of Mato Grosso do Sul, Brazil. The extract of leaves of *Annona muricata* Linn was prepared by immersing 1 kg of leaf powder into 3 L of distilled water for 48 h, then lyophilizing this until a dry powder was obtained. Then, the extract was stored at room temperature and protected from light until use [14].

### *Quantification of Total Phenols and Flavonoids*

The total phenols of aqueous graviola leaf extract (AGE) were determined by the Folin-Ciocalteu reagent method [16]. Samples and a standard curve of gallic acid were read at 760 nm. The result was

expressed as mg of gallic acid per g of extract. For the quantification of the flavonoids, the colorimetric method of aluminum chloride was used [17]. The absorbances were read at 415 nm with a UV-Vis spectrophotometer. To calculate the concentration of flavonoids, an analytical curve was prepared using quercetin as standard. The results are expressed as mg quercetin per g of extract.

#### *Quantification of Condensed Tannins*

The extract was dissolved in water at a concentration of  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  using the valinine reaction [18]. The absorbance reading was performed using a spectrophotometer at 510 nm. The quantification was performed using an external calibration curve with catechin as standard. The results are expressed as mg equivalent of catechin per g of extract.

#### *Assay of Antioxidant Activity Using the 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Free Radical (DPPH)*

The sequestering capacity was measured using DPPH solution. The absorbances were read at 517 nm with a spectrophotometer. The percentage of DPPH radical sequestration inhibition was calculated according to the equation:

$$\text{Percent inhibition activity (\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0] 100 \quad (1)$$

where  $A_0$  is the absorbance of the control, and  $A_1$  is the absorbance in the presence of the compound. Subsequently, the mean inhibitory concentration (IC 50) was calculated. It represents the concentration of the sample required to capture 50% of the DPPH [19].

#### *Isolation and Identification of Compounds*

The extract was fractionated by XAD-2 (Supelco, Bellefonte, PA, USA) on column chromatography (30 cm  $\times$  3 cm). The extract (3.16 g) was eluted with 0.5 L of water, followed by 0.5 L of methanol, and again eluted with 0.2 L of ethyl acetate. An aliquot of 0.89 g of the methanolic fraction was dissolved into 50 mL of methanol and fractionated by chromatography using a Sephadex LH-20 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) on column chromatography (70 cm  $\times$  3 cm) at a rate of  $0.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Twenty-five fractions of 2 mL were collected. The fractions were combined according to their chemical behavior on thin layer chromatography (silica gel plates) using ethyl acetate:n-propanol:water (123:7:70 *v/v/v*) as the eluent. The fractions 2–4, 6–8 and 11–14 were purified using polyvinylpyrrolidone (Sigma, St. Louis, MO, USA) on column chromatography (10 cm  $\times$  2 cm) by eluting them with methanol. The result is the identification of compounds. An aliquot of 0.54 g of the ethyl acetate fraction was dissolved into 10 mL of methanol and fractionated by chromatography using a Sephadex LH-20 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) on column chromatography (80 cm  $\times$  2 cm) by eluting it with methanol at a rate of  $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Twenty-eight fractions of 5 mL were collected. The fractions were combined according to their chemical behavior on thin layer chromatography (silica gel plates) using ethyl acetate:methanol (60:40 *v/v*) as the eluent. The fractions 10–13, 18–19 and 22–25 resulted in the isolation of the other compounds. The identification of the compounds was carried out using  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear resonance (Advance 300 MHz, Bruker, Ettlingen, Germany) and mass spectrometry (Shimadzu Corp. Shimadzu, Kyoto). Their chemical structures were confirmed by comparison with literature data [20–22].

#### *Ethics Statement*

All animal experiments were submitted and approved by the Ethics Committee on Animal Use, Federal University of Mato Grosso do Sul (Protocol n<sup>o</sup>. 682/2015).

#### *Acute Oral Toxicity*

The acute toxicity test of the AGE was performed in female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) based on the OECD Guidelines 425 (Organization for Economic Co-operation and Development) [23]. For the

test, the animals were divided into two groups ( $n = 5$ ): A control group that received saline solution, and the treatment group that received the aqueous extract of *Annona muricata* Linn orally (gavage) at a dose of 2000 mg/kg. After treatment, the animals were observed at 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h, and then daily for 14 days.

At the same time, the hippocratic screening test was carried out to quantify the effects of abnormal morphological and behavioral signs of toxicity. Furthermore, changes in body weight, water and food intake, as well as excreta production, were also evaluated [24].

At the end of 14 days, the animals were euthanized (ketamine and xylazine). The organs (heart, lung, liver, spleen, pancreas, and kidneys) were removed, weighed, and analyzed macroscopically to investigate possible changes [25].

#### *Animals and Experimental Design*

C57BL/6 adult male mice ( $n = 55$ , 12 weeks of age) were divided into two groups based on body weight, as follows: SHAM group ( $n = 11$ ), treated with standard diet AIN-93M [26], and HFD group ( $n = 44$ ), treated with a hyperlipidic diet. After 12 weeks, the animals of the HFD group were divided into four homogenous groups according to weight and value of fasting blood glucose and concomitantly supplemented (oral gavage) with aqueous graviola leaf extract in different doses: HFD SALINE group (HFD + saline), AGE 50 mg/kg group (HFD + aqueous graviola leaf extract of 50 mg/kg) ( $n = 11$ ), AGE 100 mg/kg group (HFD + aqueous graviola leaf extract of 100 mg/kg) ( $n = 11$ ), and AGE 150 mg/kg group (HFD + aqueous graviola leaf extract of 150 mg/kg) ( $n = 11$ ). The SHAM group also received saline solution at this stage of the study. Each group had ad libitum access to water and food during the experimental period. The composition of the experimental diets is show in the Table 1 below.

**Table 1.** Composition of experimental diets (g/kg diet).

Experimental Groups	AIN-93M Diet	High-Fat Diet (HFD)
Composition (g/kg)		
Cornstarch	620.69	320.69
Casein	140.00	140.00
Fat	-	320.00
Sucrose	100.00	100.00
Soybean oil	40.00	20.00
Fiber	50.00	50.00
Mineral mix	35.00	35.00
Vitamin mix	10.00	10.00
L-cystine	1.80	1.80
Choline bitartrate	2.50	2.50
Tert-butylhydroquinone	0.008	0.008
Energy (kcal/kg)	3802.8	5302.8
Carbohydrates (%)	75.81	31.73
Protein (%)	14.73	10.56
Lipids (%)	9.47	57.71
Calories/g of diet	3.80	5.30

The mice were anesthetized (Ketamine and xylazine, 75 and 10 mg/kg, respectively), and euthanized by cardiac puncture when they reached 35 weeks of age. The blood and the organs were collected for subsequent analyses.

#### *Body Weight and Diet Intake*

The mice were weighed weekly to observe weight changes until the end of the study. Food intake was measured three times per week.

The energy intake was calculated by multiplying the amount of diet ingested (g/day/animal) by the energy density of each diet, expressed in kcal/day per animal. In addition, the calculation of the feed efficiency index (FEI) was performed using the following equation:

$$\text{Free efficiency index} = \frac{(FW - IW)}{TF} \quad (2)$$

where *FW* is the final body weight in grams, *IW* is the initial body weight in grams, and *TF* is the total amount of food ingested in grams [27].

#### *Biochemical Analysis*

Serum glucose, serum triglyceride, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), and very low-density lipoprotein (VLDL) levels were analyzed by the enzymatic colorimetric test, according to the manufacturer's instructions (Labtest<sup>®</sup>, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil). The atherogenic index was determined by the ratio between total cholesterol and HDL cholesterol [14].

#### *Oral Glucose Tolerance Test*

The oral glucose tolerance test (OGTT) was performed one day prior to initiating treatment with the AGE or saline solution, and three days prior to the euthanasia of animals after six hours of fasting. Fasting glucose was verified via flow rate (time 0) using a G-Tech<sup>®</sup> glucometer (G-TECH Free, Infopia Co., Ltd. South Korea). Then, the animals received a D-glucose solution (Sigma Aldrich, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil), at 2 g/kg of body weight, by gavage. A blood glucose reading was performed 15, 30, 60 and 120 min after glucose application. The area under the curve (AUC) was calculated for each mouse, and the mean was calculated for each experimental group [28].

#### *Insulin Sensitivity Test*

The insulin sensitivity test was performed five days before euthanasia. Glycemia was verified with the animals in a fed state (time 0). Then, 0.75 units of insulin (NovoRapid<sup>®</sup>, 100 U/mL, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) per kg of animal weight was injected intraperitoneally. The blood glucose reading was performed at 15, 30 and 60 min using a G-Tech<sup>®</sup> glucometer (G-TECH Free, Korea). The area under the curve (AUC) was calculated for each animal, and the mean was calculated for each experimental group [28].

#### *Quantification of Cytokines in the Adipose Tissue*

Epididymal adipose tissue was collected, weighed (100 mg) and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . For protein extraction, the epididymal adipose tissue was thawed on ice and homogenized in 1 mL of RIPA (RIPA Lysis Buffer $\times$ 10, Cat. n<sup>o</sup>. 20-188, MERCK, Darmstadt, Germany). A cocktail of protease inhibitors was added (Protease Inhibitor Cocktail Set Calbiochem, Cat. n<sup>o</sup>. 539131, MERCK, Darmstadt, Germany).

The supernatant was collected after centrifugation at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  and stored again at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until cytokine analysis, according to the recommendations of the manufacturer (MILLIPLEX MAP/Mouse Cytokine/Chemokine and Adipocyte Magnetic Bead panel) (Millipore, Billerica, MA, USA). The concentrations of the following cytokines were analyzed: IL-10, IL-6, MCP-1, and TNF- $\alpha$  using the MCYTOMAG-70K kit, and adiponectin using the MADCYMAG-72K kit. The concentration of the cytokines IL-10, IL-6, MCP-1, and TNF- $\alpha$  in the adipose tissue was expressed as cytokine picograms in relation to protein content (mg of protein). For adiponectin, the values were expressed as nanograms of cytokines in relation to protein content (mg of protein). Protein quantification was based on the bicinchoninic acid assay (BCA) following the manufacturer's recommendations (BCA Protein Assay kit) (MERCK, Darmstadt, Germany) [29,30].

### *Assessment of Body Fat and Liver Weight*

After euthanasia, the liver and fat pads of white adipose tissue (omental, epididymal, perirenal, retroperitoneal, and mesenteric) were dissected and weighed. The adiposity index was calculated as the total sum of visceral white adipose tissue (g) divided by the final body weight of the animal  $\times 100$  and expressed as percentage of adiposity [31].

### *Histopathological Analysis*

Samples of the liver, pancreas, and epididymal adipose tissue were fixed with 10% formalin solution. After fixation, the specimens were dehydrated, embedded in paraffin, cut in a microtome to a thickness of 5  $\mu\text{m}$  each, and stained with hematoxylin-eosin. An expert pathologist performed the histological analysis of the liver and pancreas. For the analysis of treatment effects on the hepatocytes, a scoring system was used [32]. In the evaluation of the architecture of the pancreas, there were changes in the Islets of Langerhans and pancreatic acini, and inflammation was observed [33,34]. For the analysis of the adipocyte area of the epididymal adipose tissue, the images were initially taken using a LEICA DFC 495 digital camera system (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) integrated into a LEICA DM 5500B microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), with a magnification of 20X. The images were analyzed using the LEICA Application Suite software, version 4.0 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), and the mean area of 100 adipocytes per sample was determined [35].

### *Statistical Analyses*

The results were expressed as mean  $\pm$  MSE (mean standard error). For multiple comparisons of parametric results, an ANOVA followed by a Tukey post-test were performed. The Student t-test was performed for comparison between two groups. The chi-square test was used to evaluate associations in histological analyses. A significance level of  $p < 0.05$  was adopted. Statistical analysis was performed using the software Jandel Sigma Stat, version 3.5 (Systat software, Inc., San Jose, CA, USA), and Sigma Plot, version 12.5 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

## **3. Results**

### *Chemical Composition*

The content of phenols, flavonoids, and tannins in AGE was  $156.37 \pm 1.2$  mg/g,  $92.07 \pm 1.8$  mg/g and  $42.99 \pm 0.6$  mg/g, respectively. The antioxidant activity of  $\text{IC}_{50}$  was  $12 \pm 0.1$   $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . In addition, six compounds were isolated and identified in the extract: kaempferol-3-O-a-l-rhamnopyranoside, quercetin 3-O-rutinoside, kaempferol 3-O-rutinoside, luteolin, quercetin, and sitosterol-3-O- $\beta$ -d-glucopyranoside.

### *Acute Oral Toxicity*

The results showed no signs of systemic toxicity. There are no changes in body weight, water consumption, food intake, and excretion of urine and feces. In addition, no changes in the Hippocratic screening test were observed, such as motor and/or sensory and neurological changes, as no animals died. The weight of the liver, spleen, pancreas, lungs, heart, and kidneys did not show significant differences among groups. Macroscopic changes in the organs of the animals were not visualized (Supplementary Material Figure S1).

### *Effects of AGE on Body Weight and Food Intake*

At the beginning of the experiment, the animals in the HFD group did not present significant differences in body weight when compared to animals in the SHAM group ( $p = 0.971$ ) (Table 2).

**Table 2.** Initial and final weight, weight gain and food intake assessment during obesity induction between the first and the 12th week.

Parameter	Experimental Group	
	SHAM (n = 11)	HFD (n = 44)
Initial weight (g)	26.55 ± 0.55	26.52 ± 0.28
Final weight (g)	32.91 ± 0.99	37.87 ± 0.60 ***
Weight gain (g)	6.36 ± 0.95	11.34 ± 0.68 **
Food intake (g/day)	3.47 ± 0.05	2.73 ± 0.03 ***
Food intake (kcal/day)	13.18 ± 0.19	14.54 ± 0.16 ***
Feed efficiency index	0.0216 ± 0.0031	0.0501 ± 0.0033 ***

SHAM: Standard diet. HFD: Hyperlipidic diet. Values represent the mean ± mean standard error; \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$  vs. SHAM SALINE. Student *t* test.

However, with the HFD, the weight evolution evidenced a greater gain of body weight in the HFD group, with maintenance of a significant difference from the fourth week up to the 12th week ( $p = 0.005$ ) compared to the control group ( $p \leq 0.001$ ) (Figure 1A).

Then, the animals of groups receiving a hyperlipidic diet began treatments with different doses of the extract or saline solution. At the 12th week, there was a significant difference in body weight in relation to the SHAM SALINE group (Table 3). However, this difference was not stable throughout the treatment. At the end of the 24th week, this group had a statistically similar body weight compared to the other groups (Figure 1B).

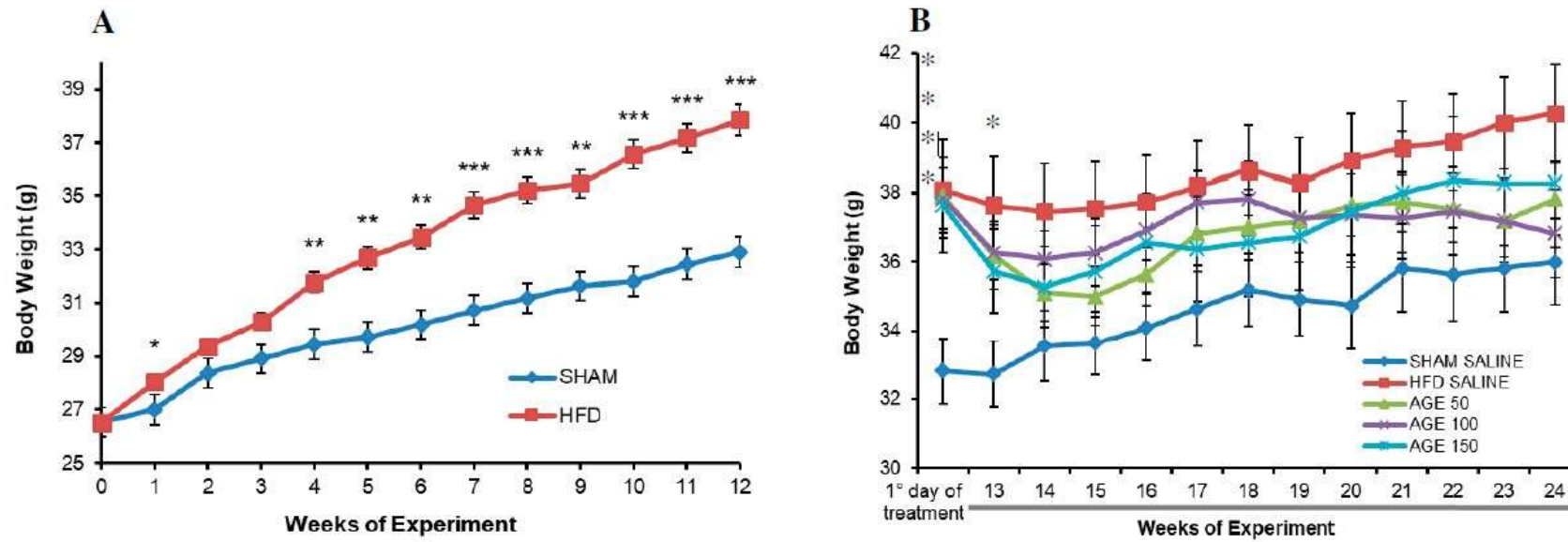
**Table 3.** Initial and final weight, weight gain, and food intake of control animals and animals treated with AGE between the 13th and the 24th week.

Parameter	Experimental Group				
	SHAM SALINE	HFD SALINE	AGE 50	AGE 100	AGE 150
Initial weight (g)	32.89 ± 0.94	38.09 ± 1.42 *	37.91 ± 1.09 *	37.82 ± 0.91 *	37.64 ± 1.43 *
Final weight (g)	35.91 ± 1.26	40.27 ± 1.42	37.82 ± 1.05	36.82 ± 1.33	38.27 ± 1.94
Weight gain (g)	3.09 ± 0.60	2.18 ± 0.26	−0.09 ± 0.53 *	−1.00 ± 1.14 **§	0.64 ± 0.92
Food intake (g/day)	3.40 ± 0.43	2.62 ± 0.62 ***	2.76 ± 0.05 ***	2.70 ± 0.98 ***	2.83 ± 0.07 ***
Food intake (kcal/day)	12.89 ± 0.16	13.89 ± 0.33	14.65 ± 0.25 **	14.30 ± 0.52 *	14.99 ± 0.37 ***
Feed efficiency index	0.0109 ± 0.0021	0.010 ± 0.00128	−0.0006 ± 0.0023	−0.0036 ± 0.0050 *§	0.0031 ± 0.0040

SHAM SALINE: standard diet + saline solution. HFD SALINE: hyperlipidic diet + saline solution. AGE 50: hyperlipidic diet + 50 mg/kg of aqueous graviola leaf extract. AGE 100: hyperlipidic diet + 100 mg/kg of aqueous graviola leaf extract. AGE 150: hyperlipidic diet + 150 mg/kg of aqueous graviola leaf extract. Values represent the mean ± mean standard error. In the same line, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$  vs. SHAM SALINE; §  $p \leq 0.05$  vs. HFD SALINE; ANOVA followed by post Tukey test.

At the end of the treatment with the extract, the groups AGE 50 mg/kg and AGE 100 mg/kg presented a lower weight gain in comparison to the other groups (Table 3). The group AGE 50 mg/kg presented a statistical difference in relation to the SHAM SALINE group ( $p = 0.034$ ). The group AGE 100 mg/kg had a significant body weight loss compared to the SHAM SALINE ( $p = 0.003$ ) and HFD SALINE ( $p = 0.034$ ) groups.

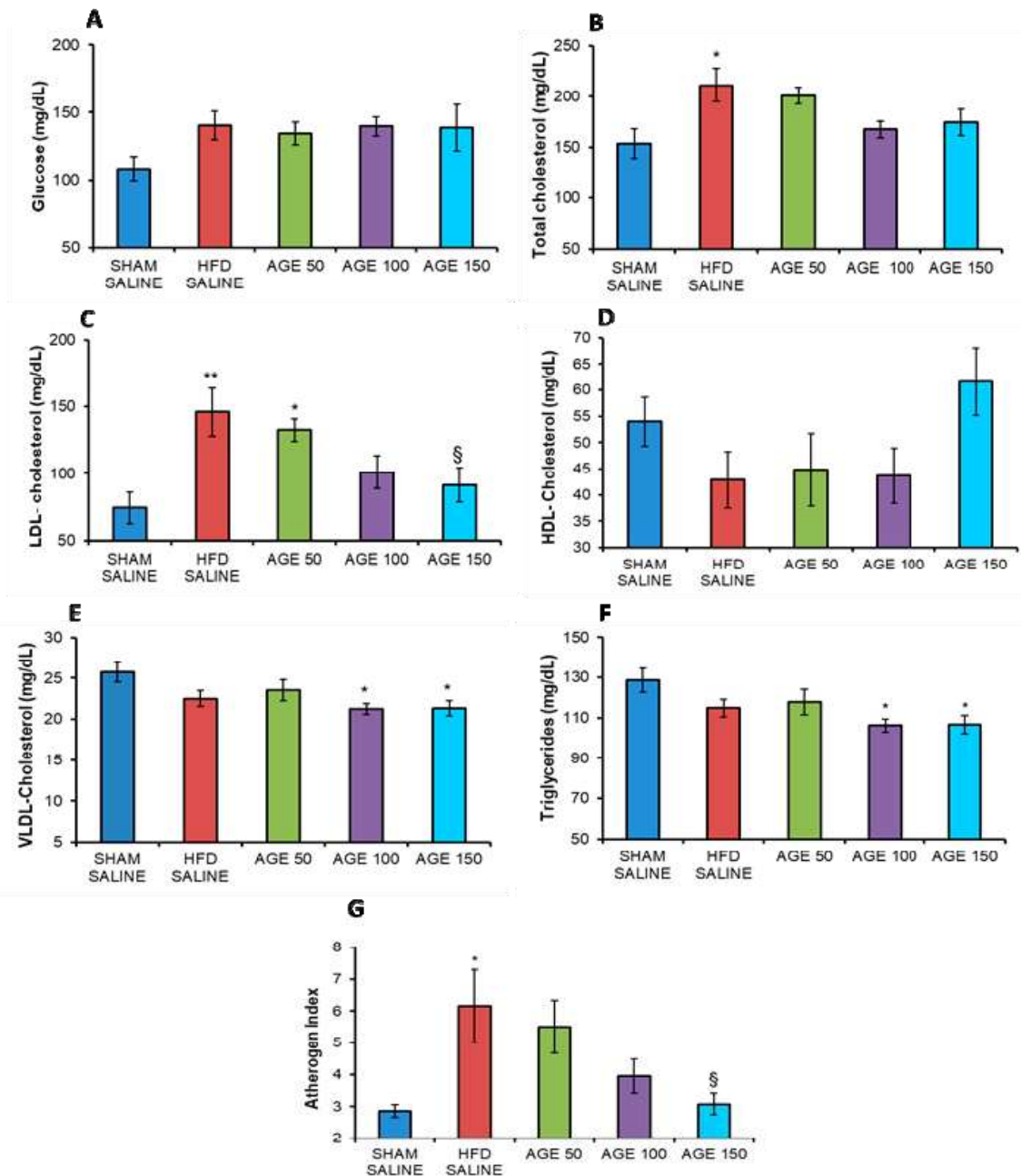
Food intake during the induction period was significantly higher in the SHAM group than in the HFD group ( $p \leq 0.001$ ). However, the caloric intake and the FEI were significantly higher in the HFD group than in the SHAM group ( $p \leq 0.001$ ) (Table 2). During the treatment period with the extract, similar results were observed for food intake, but daily caloric intake was significantly higher in the groups AGE 50 mg/kg ( $p = 0.007$ ), AGE 100 mg/kg ( $p = 0.048$ ) and AGE 150 mg/kg ( $p \leq 0.001$ ), compared to the SHAM SALINE group. However, the FEI was significantly lower in the group AGE 100 mg/kg when compared to the SHAM SALINE group ( $p = 0.021$ ) and the HFD SALINE ( $p = 0.035$ ) group (Table 3). That is, there was a lower feed conversion capacity into body mass in the group AGE 100 mg/kg.



**Figure 1.** Effects of a hyperlipidic diet and AGE on weight gain. **(A)** Body weight of animals fed on the standard diet (SHAM) and on the hyperlipidic diet (HFD) during obesity induction for 12 consecutive weeks (0: initial weight). **(B)** Weight of control animals (SHAM SALINE: standard diet + saline solution. HFD SALINE: hyperlipidic diet + saline solution) and of animals treated with aqueous graviola leaf extract (AGE) (AGE 50: hyperlipidic diet + 50 mg/kg AGE. AGE 100: hyperlipidic diet + 100 mg/kg AGE. AGE 150: hyperlipidic diet + 150 mg/kg AGE) (depicted on the graph from the first day of treatment up to the 24th week). Values represent mean  $\pm$  mean standard error. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  and \*\*\*  $p \leq 0.001$  vs. SHAM SALINE. Student t-test (Figure 1A) and ANOVA followed by post Tukey test (Figure 1B).

### Effects of AGE on Serum Biochemical Parameters

In this experimental model, the AGE was not able to decrease serum fasting glucose concentrations at the end of the study ( $p = 0.242$ ) (Figure 2A).



**Figure 2.** Evaluation of serum parameters. (A) Blood glucose (mg/dL), (B) total cholesterol (mg/dL), (C) LDL-cholesterol (mg/dL), (D) HDL-cholesterol (mg/dL), (E) VLDL-cholesterol (mg/dL), (F) triglycerides (mg/dL), and (G) atherogenic index of control animals (SHAM SALINE: standard diet + saline solution, HFD SALINE: hyperlipidic diet + saline solution), and of animals treated with aqueous graviola leaf extract (AGE) at 50, 100, and 150 mg/kg + hyperlipidic diet between the 13th and the 24th week of study. Values represent mean  $\pm$  mean standard error. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. SHAM SALINE; §  $p < 0.05$  vs. HFD SALINE. ANOVA followed by post Tukey test.

The AGE was also not able to significantly change the total serum cholesterol and HDL concentration (Figure 2B,D). However, serum HDL-cholesterol levels showed a 30.35% increase

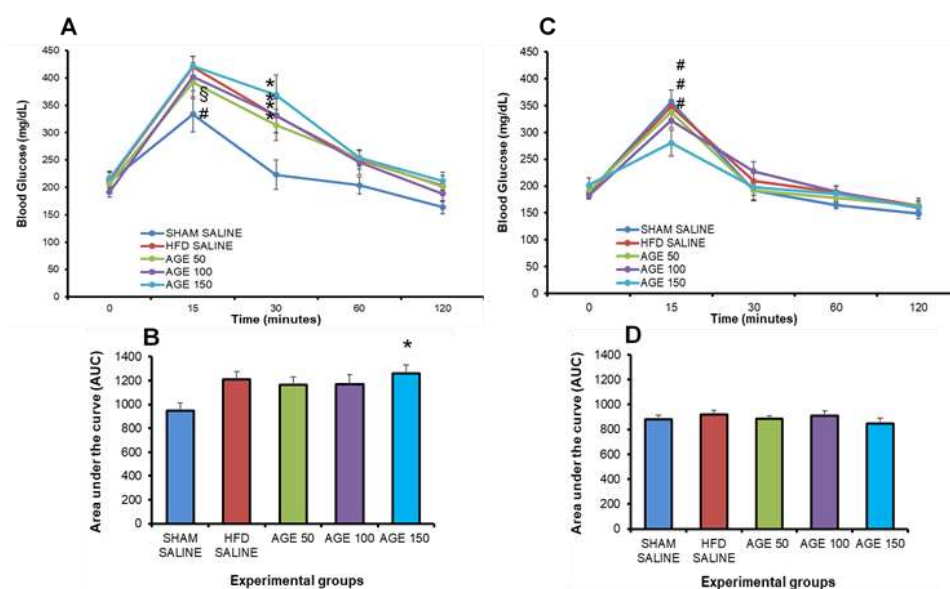


in concentration in the group treated with AGE 150 mg/kg ( $61.57 \pm 6.47$  mg/dL), compared to the HFD SALINE group ( $42.88 \pm 5.40$  mg/dL) (Figure 2D). For total serum cholesterol, the percentage decrease in AGE-treated groups was 4.92% for AGE 50 mg/kg ( $200.84 \pm 8.30$  mg/dL), 20.54% for AGE 100 mg/kg ( $167.85 \pm 8.22$  mg/dL), and 17.49% for AGE 150 mg/kg ( $174.30 \pm 13.10$  mg/dL) compared to the HFD SALINE group ( $211.24 \pm 16.33$  mg/dL) (Figure 2B).

In this study, the decrease in LDL-cholesterol concentration in the AGE-treated groups seems to be directly associated with the dose given. That is, the higher the AGE dose, the greater the decrease. There was a significant difference ( $p = 0.038$ ) between AGE 150 mg/kg in relation to the HFD SALINE group (Figure 2C). In addition, AGE was able to significantly decrease triglyceride concentrations in the treated groups at doses of 100 mg/kg ( $p = 0.026$ ) and 150 mg/kg ( $p = 0.025$ ) compared to the SHAM SALINE group (Figure 2F). There was also a decrease in VLDL cholesterol using AGE 100 mg/kg and 150 mg/kg ( $p = 0.030$ ) compared to the SHAM SALINE group (Figure 2E). Regarding the atherogenic index, which evaluates the risk of developing cardiovascular diseases, the group AGE 150 mg/kg presented a significantly lower mean value ( $p = 0.025$ ) than the HFD SALINE group. In addition, the HFD SALINE group presented a significantly higher value in relation to the SHAM SALINE group (Figure 2G).

#### Effects of AGE on Insulin Sensitivity and Glucose Tolerance

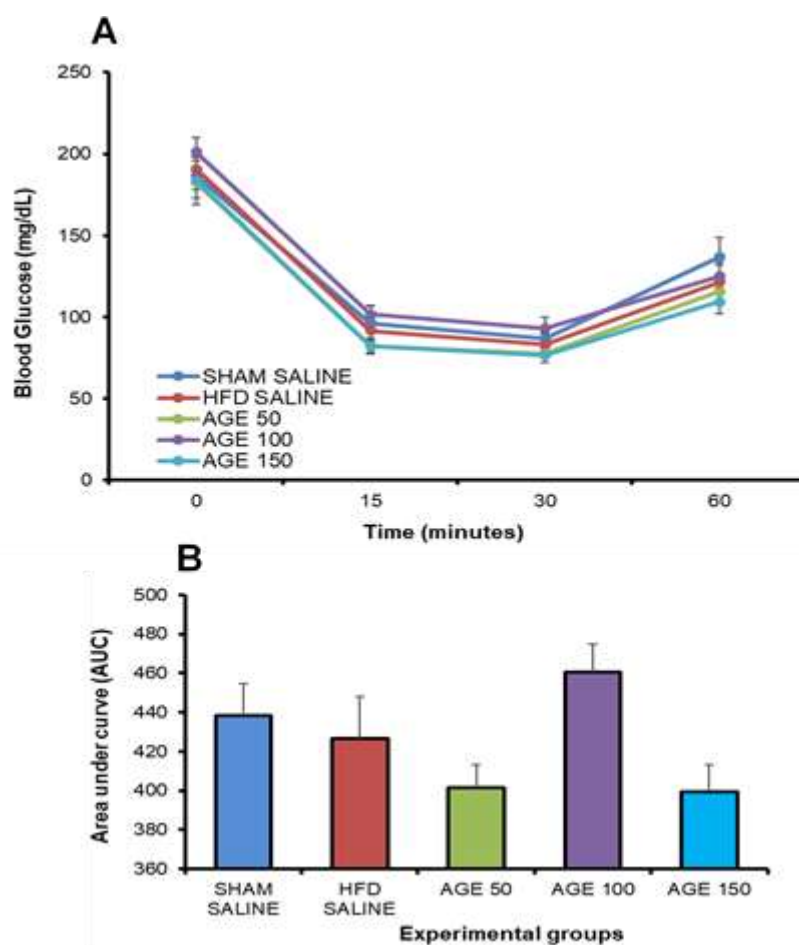
The OGTT was performed prior to the beginning of the AGE treatment. No significant increases in fasting glycemia were observed between the hyperlipidic and the normolipidic diet groups. However, there was a significant increase ( $p \leq 0.05$ ) in the glycemia of animals at 15 min in the groups HFD SALINE and AGE 150 mg/kg, in relation to the group fed on a normolipidic diet (SHAM SALINE). At 30 min, all groups fed on a hyperlipidic diet had a significant increase in glycemia in relation to the SHAM SALINE group (Figure 3A).



**Figure 3.** Evaluation of the glycemic profile before and at the end of the treatment with AGE. (A) Oral glucose tolerance test prior to the beginning of treatment (12th week). (B) Area under the curve (AUC) of blood glucose of animals evaluated prior to the beginning of treatment (12th week). (C) Oral glucose tolerance test at the end of treatment (24th week). (D) Area under the curve (AUC) of glycemia of animals evaluated at the end of treatment (24th week). SHAM SALINE: standard diet + saline solution. HFD SALINE: hyperlipidic diet + saline solution. AGE 50: hyperlipidic diet + 50 mg/kg of aqueous graviola leaf extract. AGE 100: hyperlipidic diet + 100 mg/kg of aqueous graviola leaf extract. AGE 150: hyperlipidic diet + 150 mg/kg of aqueous graviola leaf extract. Values represent mean  $\pm$  mean standard error. \*  $p < 0.05$  vs. SHAM SALINE, §  $p < 0.05$  vs. HFD SALINE, #  $p < 0.05$  vs. AGE 150. ANOVA followed by post Tukey test.

The OGTT performed at the end of the experiment indicated that the AGE 150 mg/kg dose was able to significantly reduce blood glucose ( $p \leq 0.05$ ) at 15 min, in relation to the groups SHAM SALINE, HFD SALINE and AGE 50 mg/kg. However, there was no significant difference between AGE 100 mg/kg and AGE 150 mg/kg. The area under the curve did not indicate a significant difference for the comparison among groups (Figure 3B).

The insulin sensitivity test performed at the end of the treatment with AGE or saline solution did not present a statistical difference in glycemia at the times analyzed after administration of insulin. This result is confirmed by observing the total area under the curve among the groups that received AGE or SALINE during the experimental period (Figure 4A,B).

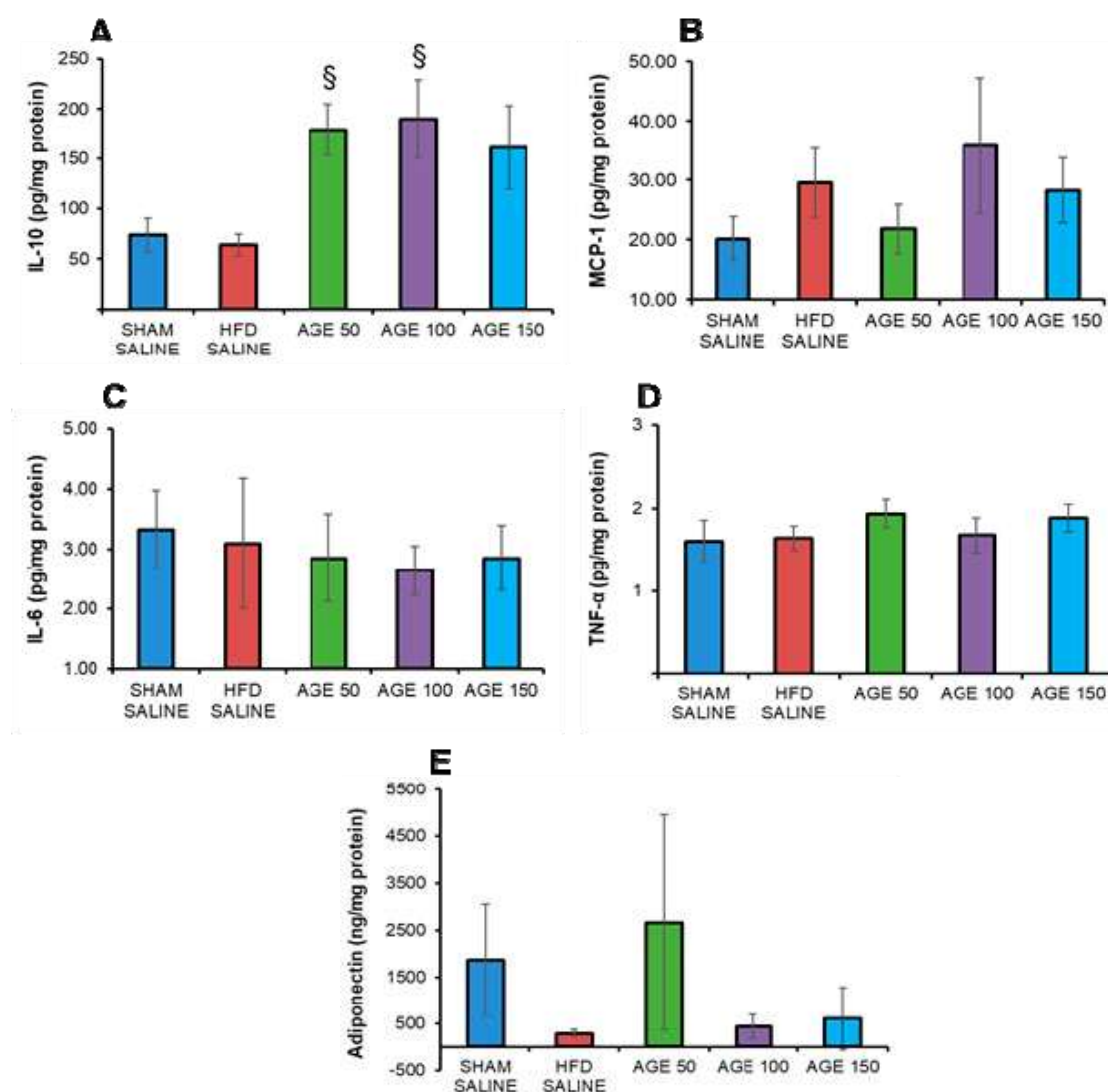


**Figure 4.** Evaluation of the glycemic profile at the end of the treatment with AGE. (A) Insulin sensitivity test performed at the end of treatment. (B) Area under the curve (AUC) of the insulin sensitivity test at the end of treatment. SHAM SALINE: standard diet + saline solution. HFD SALINE: hyperlipidic diet + saline solution. AGE 50: hyperlipidic diet + 50 mg/kg of aqueous graviola leaf extract. AGE 100: hyperlipidic diet + 100 mg/kg of aqueous graviola leaf extract. AGE 150: hyperlipidic diet + 150 mg/kg of aqueous graviola leaf extract. Each column represents the mean, and the bar represents the mean standard error. ANOVA.

#### *Effects of AGE on Anti- and Pro-inflammatory Cytokines, Chemokines and Adiponectin*

The animals treated with AGE showed an increase in IL-10 concentration, with a significant difference for the groups AGE 100 mg/kg ( $p = 0.021$ ) and AGE 50 mg/kg ( $p = 0.042$ ) when compared to the HFD SALINE group (Figure 5A). In analyzing MCP-1, no significant changes were observed between the groups studied ( $p = 0.840$ ) (Figure 5B). As shown in Figure 5C,D, the levels of proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  ( $p = 0.640$ ) and IL-6 ( $p = 0.768$ ) also did not differ between study groups. Furthermore,

there was no significant difference ( $p = 0.244$ ) in the levels of adiponectin in the adipose tissue of mice (Figure 5D).



**Figure 5.** Effects of AGE on anti- and pro-inflammatory cytokines, chemokines and adiponectin. (A) Interleukin-10 (pg/mg protein). (B) Interleukin-6 (pg/mg protein). (C) Monocyte-1 chemotactic protein (pg/mg protein). (D) Tumor necrosis factor alpha (pg/mg protein). (E) Adiponectin (ng/mg protein) of control animals (SHAM SALINE: standard diet + saline solution. HFD SALINE: hyperlipidic diet + saline solution) and of animals treated with aqueous graviola leaf extract (AGE) at 50, 100 and 150 mg/kg + hyperlipidic diet between the 13th and the 24th week of study. The cytokines are measured in adipose tissue. Values represent mean  $\pm$  mean standard error. <sup>§</sup>  $p < 0.05$  vs. HFD SALINE. ANOVA/Tukey. Kruskal-Wallis test.

#### Effects of AGE on Fat Pads, Adiposity Index and Liver Weight

The AGE at the doses studied was not able to reduce the rate of adiposity of the animals. However, there was a decrease, although not significant, in the weight of fat pads of groups treated with aqueous graviola leaf extract: AGE 50 mg/kg: omental (22.22%), mesenteric (6.79%), retroperitoneal (8.79%), perirenal (9.41%); AGE 100 mg/kg: omental (11.11%), epididymal (14.34%), mesenteric (21.36%), retroperitoneal (31.04%); and AGE 150 mg/kg: omental (33.33%), epididymal (6.17%), mesenteric (6.08%), retroperitoneal (3.16%), and perirenal (2.35%), all compared to the HFD SALINE group (Table 4).

**Table 4.** Effects of AGE on fat pads, adiposity index, and liver weight.

Parameter	Experimental Group				
	SHAM SALINE	HFD SALINE	AGE 50	AGE 100	AGE 150
Omental weight (g)	0.028 ± 0.009	0.018 ± 0.005	0.014 ± 0.004	0.016 ± 0.004	0.012 ± 0.004
Epididymal weight (g)	1.068 ± 0.127	1.506 ± 0.112	1.543 ± 0.783	1.290 ± 0.149	1.413 ± 0.169
Mesenteric weight (g)	0.496 ± 0.634	0.707 ± 0.092	0.659 ± 0.049	0.556 ± 0.122	0.664 ± 0.136
Retroperitoneal weight (g)	0.360 ± 0.053	0.728 ± 0.087 *	0.664 ± 0.053	0.502 ± 0.090	0.705 ± 0.125
Perirenal weight (g)	0.198 ± 0.039	0.255 ± 0.039	0.231 ± 0.026	0.275 ± 0.061	0.198 ± 0.036
Adiposity index (%)	6.080 ± 0.514	10.893 ± 0.481 ***	11.620 ± 0.387 ***	10.212 ± 0.797 ***	10.713 ± 0.779 ***
Liver (g)	1.225 ± 0.066	1.236 ± 0.056	1.213 ± 0.030	1.200 ± 0.058	1.185 ± 0.047

Values represent mean ± mean standard error. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$  vs. SHAM SALINE; ANOVA followed by post Tukey test.

#### Effects of AGE on Liver, Pancreas, and Epididymal Adipose Tissue

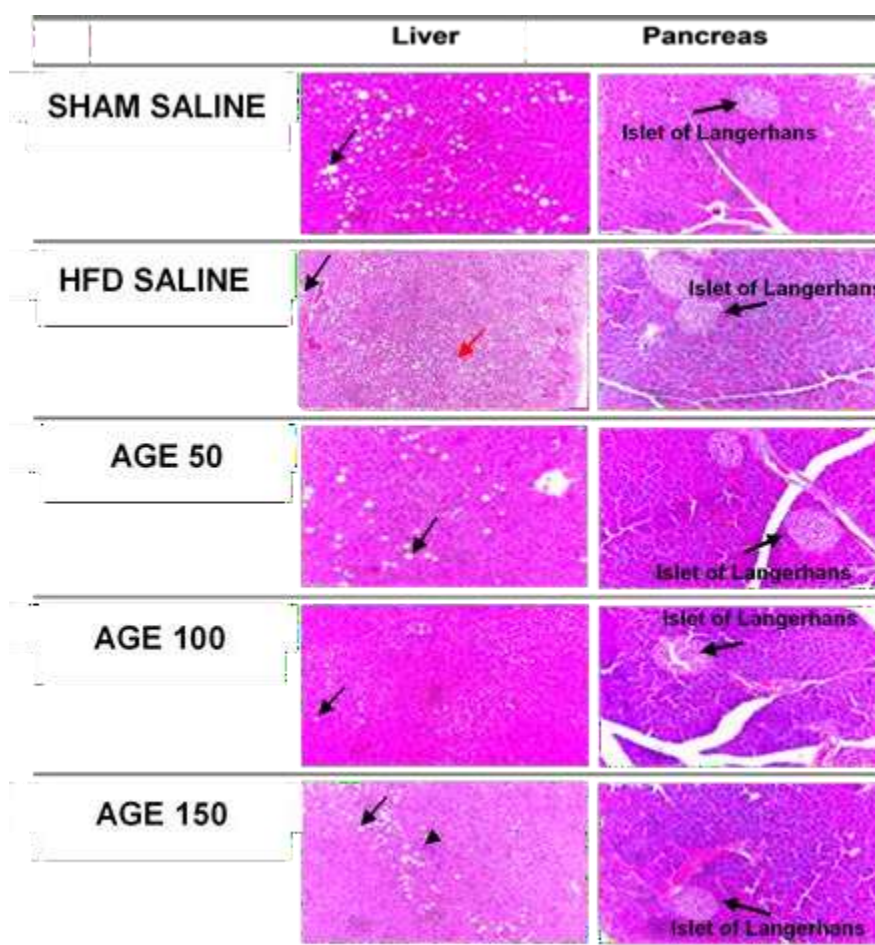
The histological analysis of the pancreas showed no statistical differences among groups regarding pancreatic acini ( $p = 0.400$ ), Islet of Langerhans ( $p = 0.291$ ), and inflammation ( $p = 0.458$ ) (Table 5, Figure 6). However, the atrophy/necrosis was less frequent in the pancreas of animals treated with AGE, especially in the AGE 100 mg/kg group (Table 5).

**Table 5.** Results for changes observed in the pancreas of the animals in each experimental group.

Variable	Experimental Group				
	SHAM SALINE	HFD SALINE	AGE 50	AGE 100	AGE 150
Changes in the pancreas					
Islet of Langerhans ( $p = 0.291$ )					
No change	36.4 (4)	45.5 (5)	72.7 (8)	80.0 (8)	54.5 (6)
Discrete atrophy	9.1 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	9.1 (1)
Atrophy	18.2 (2)	36.4 (4)	9.1 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)
Discrete hypertrophy	18.2 (2)	9.1 (1)	0.0 (0)	20.0 (2)	27.3 (3)
Hypertrophy	18.2 (2)	9.1 (1)	18.2 (2)	0.0 (0)	9.1 (1)
Pancreatic acini ( $p = 0.400$ )					
No change	81.8 (9)	72.7 (8)	90.9 (10)	100.0 (10)	90.9 (10)
Necrosis/Atrophy	18.2 (2)	27.3 (3)	9.1 (1)	0.0 (0)	9.1 (1)
Inflammatory cells ( $p = 0.458$ )					
No change	90.9 (10)	81.8 (9)	90.9 (10)	100.0 (10)	100.0 (11)
Insulinitis	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Perinsulinitis	9.1 (1)	18.2 (2)	9.1 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)

Data presented as relative frequency (absolute frequency). Value of  $p$  in the chi-square test.

Similarly, the liver histological analysis also showed that the treatment with AGE did not change the quantification of steatosis ( $p = 0.881$ ), microvesicular steatosis ( $p = 0.501$ ), lobular inflammation ( $p = 0.501$ ), ballooning ( $p = 0.192$ ), Mallory's Hyaline ( $p = 0.408$ ), apoptosis ( $p = 1.00$ ), and glycogenate nucleus ( $p = 0.408$ ) (Table 5, Figure 6). However, ballooning was more frequent in the HFD SALINE group compared to the groups that received AGE at different concentrations when fed on a hyperlipidic diet. Furthermore, hepatic steatosis was also frequent in the experimental groups that received a hyperlipidic diet or a normolipidic diet. However, the carbohydrate content in normolipidic diet was high, which may have contributed to this result (Table 6).



**Figure 6.** Histological analysis of the liver (Black arrows indicate hepatic steatosis, arrow head lobular inflammation and red arrows indicate ballooning) and pancreas of each experimental group. 20× magnification. Bar scale: 100 μm.

**Table 6.** Results for changes observed in the liver of animals in each experimental group.

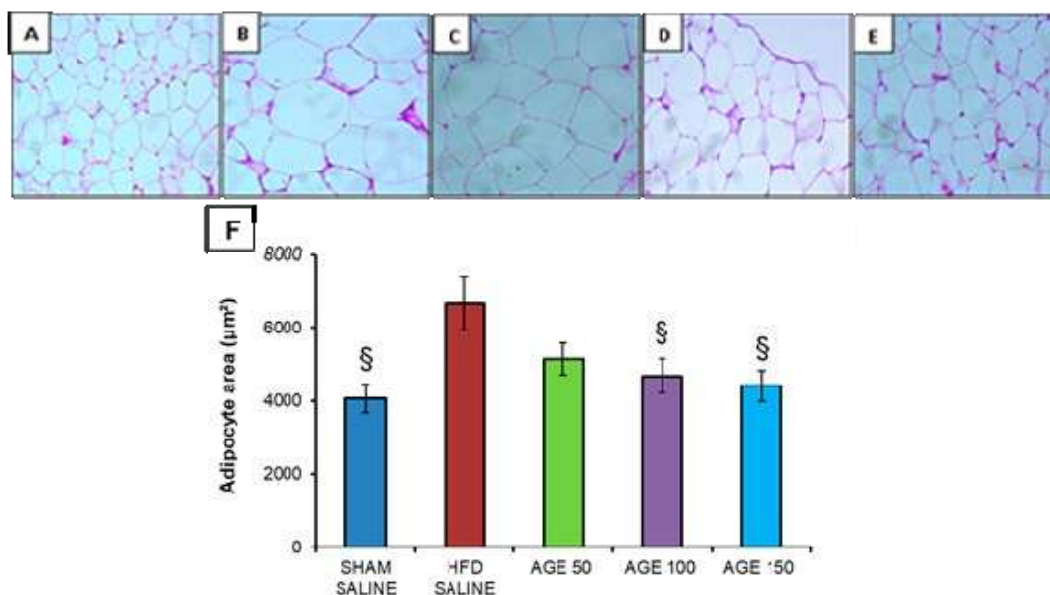
Variable	Experimental Group				
	SHAM SALINE	HFD SALINE	AGE 50	AGE 100	AGE 150
<b>Liver Changes</b>					
Steatosis ( $p = 0.881$ )					
< 5%	54.5 (5)	36.4 (4)	54.5 (6)	60.0 (6)	54.5 (6)
5 to 33%	36.4 (4)	36.4 (4)	36.4 (4)	10.0 (1)	36.4 (4)
34 to 66%	9.1 (1)	18.2 (2)	9.1 (1)	20.0 (2)	9.1 (1)
>66%	0.0 (0)	9.1 (1)	0.0 (0)	10.0 (1)	0.0 (0)
Microvesicular steatosis ( $p = 0.501$ )					
Absent	45.5 (5)	18.2 (2)	54.5 (6)	40.0 (4)	36.4 (4)
Present	54.5 (6)	81.8 (9)	45.5 (5)	60.0 (6)	63.6 (7)

Table 6. Cont.

Variable	Experimental Group				
	SHAM SALINE	HFD SALINE	AGE 50	AGE 100	AGE 150
<b>Liver Changes</b>					
Lobular inflammation ( $p = 0.919$ )					
Absent	63.6 (7)	72.7 (8)	81.8 (9)	70.7 (7)	72.7 (8)
<1 focus/field	36.4 (4)	27.3 (3)	18.2 (2)	30.0 (3)	27.3 (3)
2–4 focuses/field	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
> 4 focuses/field	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Ballooning ( $p = 0.91$ )					
Absent	72.7 (8)	36.4 (4)	81.8 (9)	70.7 (7)	72.7 (8)
Few cells	27.3 (3)	63.6 (7)	18.2 (2)	30.0 (3)	27.3 (3)
Many cells	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Mallory's hyaline ( $p = 0.91$ )					
Absent	100.0 (11)	100.0 (11)	100.0 (11)	100.0 (10)	90.9 (10)
Present	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	9.1 (1)
Apoptosis					
Absent	100.0 (11)	100.0 (11)	100.0 (11)	100.0 (10)	100.0 (11)
Present	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Glycogenate nucleus ( $p = 0.408$ )					
None/rare	100.0 (11)	100.0 (11)	100.0 (11)	100.0 (10)	90.9 (10)
Some	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	9.1 (1)

Data presented as relative frequency (absolute frequency). Value of  $p$  in the chi-square test.

Regarding adipocytes, AGE at the dose of 100 mg/kg ( $4682.52 \pm 476.91 \mu\text{m}^2$ ) and at the dose of 150 mg/kg ( $4410.54 \pm 426.73 \mu\text{m}^2$ ) was able to significantly reduce the adipocyte area of the epididymal adipose tissue compared to the HFD SALINE group ( $6675.10 \pm 736.87 \mu\text{m}^2$ ) (Figure 7).



**Figure 7.** Histological analysis of the epididymal adipose tissue of each experimental group. (A) SHAM SALINE group. (B) HFD SALINE group. (C) AGE 50 mg/kg group. (D) AGE 100 mg/kg group. (E) AGE 150 mg/kg group. 20× magnification. Bar scale: 100 μm. (F) Adipocyte area ( $\mu\text{m}^2$ ) of the groups studied. Values represent mean  $\pm$  mean standard error. §  $p < 0.05$  vs. HFD SALINE. ANOVA followed by *post* Tukey test.

#### 4. Discussion

The choice of *Annona muricata* Linn for this study is because this plant is used for the treatment of obesity and its comorbidities. However, more scientific evidence is needed to support the notion that this plant extract can be used for treating obese patients [36].

Plants interact with the environment to survive and are influenced by many factors, such as pathogen attacks, temperature, circadian rhythm, water availability, nutrients, pollutants, and pesticides, all of which can cause stress. In response, plants produce secondary metabolites such as flavonoids, coumarins, saponins, alkaloids, tannins, and glucosinolates, among others. Thus, plants of the same species grown in different environments may present different concentrations of a certain secondary metabolic compound [37]. In a previous study, a high concentration of tannins and a medium concentration of flavonoids and saponins were identified in the methanolic and aqueous leaf extracts of *A. muricata* [38]. These substances were absent from the aqueous graviola leaf extract produced in this study. However, another study identified a low concentration of flavonoids and a high concentration of tannins, alkaloids, phenols, saponins, and phytosterols in AGE [39]. Thus, the different concentrations of the chemical composition of *Annona muricata* Linn leaves found in the literature and in our study may be related to the mentioned factors.

Studies have indicated that two hundred and twelve bioactive compounds have already been identified in *Annona muricata* Linn. Phenolic compounds are the major phytochemicals responsible for the antioxidant activity of *Annona muricata* Linn [36,40–42].

Acute toxicity tests using AGE found in the literature corroborate the results presented here. In the literature, the administration of a single dose of 2000 mg/kg and 5000 mg/kg of AGE to mice was not able to induce changes in animal behavior or mortality, or visible macroscopic changes in organs after euthanasia on the 14th day of the experiment [14].

Experimental models with modified diets can simulate pathophysiological changes in rodents that are similar to what occurs in humans. Such experiments allow understanding of the specific mechanisms of obesity and its metabolic changes. However, the feed composition and duration of experimental period have not been consistently established in the literature. In general, high-fat diets and physical inactivity are used in these models and are also the main risk factors for humans [40,43].

In experimental models with a high-fat diet, the increase in body weight is significant after two weeks of treatment, and after four weeks of induction this model shows different obesity phenotypes. However, long-term induction leads to obesity-related comorbidities such as moderate hyperglycemia and glucose intolerance [43]. Furthermore, in another model using C57BL/6J mice fed on a high-fat diet and 10% fructose after 16 weeks of treatment, the animals developed central obesity, dyslipidemia, arterial hypertension, insulin resistance, systemic oxidative stress, inflammation, and steatohepatitis. These are the main characteristics of metabolic syndrome [44].

In our study, we exposed mice to a 58% lipid diet for 12 weeks to induce obesity. After this period, our results indicated a significant increase in the weight of the HFD group compared to the SHAM group. The weight gain in the HFD group is consistent with the higher caloric intake evidenced by the FEI. Furthermore, at the end of the experimental period, we verified a significant increase in total and LDL cholesterol, and in the atherogenic index, of the HFD group in relation to the control group, which indicates that the model allowed the desired changes.

Among the various medicinal plants used for weight reduction, *Annona muricata* Linn is the second most used by the Brazilian population [16]. In our study, AGE at the doses 50 mg/kg and 100 mg/kg represented the popularly understood relationship between graviola and weight loss. Despite an observed decrease in body weight, no reduction in caloric intake was observed in the groups treated with AGE during the experimental period. Thus, weight reduction in this study is probably not related to a lower caloric intake.

Effective medicinal plants for weight loss have phenolic compounds among their chemical constituents, such as flavonoids, which modulate lipid metabolism and increase the rate of basal

metabolism [45]. Quercetin and kaempferol stand out among flavonoids with an antiobesity effect. These were identified in AGE in the literature. We also found them in our study [42,46].

In the current study, regarding the cholesterol profile, no significant effects of the aqueous extract were observed on total cholesterol and HDL in two of the groups that received AGE. However, a significant increase in HDL cholesterol was observed in the group treated with AGE 150 mg/kg compared to the HFD SALINE group. We also observed a significant ( $p = 0.038$ ) decrease in LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol ( $p = 0.030$ ), and triglyceride ( $p = 0.026$ ) concentrations. In a study with streptozotocin-induced diabetic rats, AGE was able to significantly reduce plasma lipid concentrations. However, no difference was observed in relation to the diabetic group treated with 10 IU/kg of insulin [14].

The mechanisms of action of the aqueous extract of graviola on metabolism are not fully understood. However, several studies have reported isolated chemical compounds such as tannins, flavonoids, saponins, and coumarins, among other constituents, as being responsible for hypoglycemic, hypolipidemic, hypotensive, anti-inflammatory, and hepatic tissue changes, among other properties [47].

In our study, we observed a decrease in the atherogenic index after treatment with AGE, mainly in the group treated with 150 mg/kg. This decrease is directly related to the decrease in the development of cardiovascular diseases. This was associated with a decrease in triglycerides and LDL-cholesterol, and an increase in HDL-cholesterol, mainly in the 150 mg/kg group. Previous studies have shown that the antioxidant capacity of some substances can modify lipid metabolism and reduce inflammation, suggesting positive effects on cardiovascular diseases mainly by modulating oxidative stress. Furthermore, the high plasma level of the atherogenic index is related to small LDL-cholesterol particles. This is a predictor of conditions such as obesity, insulin resistance and inflammation, and consequently coronary artery disease, diabetes mellitus, and metabolic syndrome [48,49].

In our study, there were no significant effects of aqueous graviola leaf extract on capillary fasting glycemia evaluated in the oral glucose tolerance test performed at the end of treatment, and in the serum concentration of fasting glucose. When we calculated the area under the curve at the end of the experiment, we did not observe a significant difference in the comparison between the groups. However, there was a reduction in blood glucose levels at 15 min according to the oral glucose tolerance test in group 150 mg/kg. Some studies have demonstrated a significant decrease in plasma glucose concentrations after treatment with graviola extract in diabetic animals induced by streptozotocin or monohydrate aloxane [14,47,50,51].

Thus, the results found in our study do not indicate the effectiveness of aqueous graviola leaf extract on insulin resistance and diabetes mellitus type 2, in relation to the intake of a high calorie diet, high in saturated fat and simple carbohydrates and low in dietary fiber associated with sedentary lifestyle. However, further studies with AGE concentrations above 150 mg/kg may prove effective in reducing blood glucose, and therefore should be conducted.

Evidence shows that a greater fluctuation of glycemia induces endothelial dysfunction in diabetic or non-diabetic individuals, through oxidative stress resulting from an increase in free radicals [52,53].

Pro-inflammatory cytokines and chemokines, such as TNF- $\alpha$ , IL-6 and MCP-1, are required to initiate an inflammatory response. TNF- $\alpha$  is a cytokine that initiates the inflammatory response since it triggers the production of other cytokines, such as IL-6. On the other hand, anti-inflammatory cytokines, such as IL-10, are required to inhibit the synthesis of proinflammatory cytokines [54].

Previous studies have demonstrated that secondary metabolites present in plants, such as triterpenes, flavonoids and steroids, can modulate the inflammation and metabolic dysfunctions associated with obesity [55]. In our study, AGE did not change the levels of the inflammatory markers TNF- $\alpha$ , IL-6 and MCP-1 in adipose tissue. On the other hand, the AGE showed an anti-inflammatory effect due to a significant increase in IL-10 levels at the AGE doses of 50 and 100 mg/kg. In this study, the increased doses of AGE did not significantly interfere with TNF- $\alpha$ , IL-6 and MCP-1 levels. However, recent studies have demonstrated that IL-10 can exert anti-inflammatory effects via Janus



kinase (JAK) signal transducer of activation 3 (JAK-STAT3), by binding IL-10 to the receptor on the target of the cell membrane—tyrosine kinase 2—leading to activation of the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). However, further studies are needed to evaluate the possible effects of AGE on this pathway [56].

Adiponectin is a protein secreted by adipocytes. It exerts anti-diabetic, anti-atherogenic and anti-inflammatory effects directly. An increased expression may prevent and/or assist in the treatment of metabolic diseases related to obesity [57]. In our study, no significant effects of AGE were observed on adiponectin in adipose tissue. However, an increase of this protein was noticed in the group treated with AGE 50 mg/kg in relation to the other groups treated with AGE. Furthermore, the HFD SALINE group presented the lowest levels of adiponectin among the groups in our study.

Although the aqueous graviola leaf extract is able to induce a significant reduction in body weight according to the experimental model studied, and although there was a decrease in the weight percentage of all fat pads evaluated without significant differences in the comparison among groups, no decrease of visceral adiposity was observed at the end of the experiment when analyzing the weight of fat pads and the adiposity index. It is also possible to observe a significant decrease in the epididymal adipocyte area in the animals treated with AGE. Therefore, AGE attenuates the accumulation of lipids in mice, as was reported by another study after administration of blueberry and mulberry juice to C57BL/6 mice fed on a hyperlipidic diet for 12 weeks [58]. It should be noted that epididymal adipose tissue in mice is one of the major deposit areas of visceral fat [44].

In our experimental model, aqueous graviola leaf extract at the doses studied is not sufficient to prevent accumulation of liver fat and lesions to hepatocytes, as well as lesions to the pancreas. However, the ballooning of hepatocytes is less frequent in animals receiving treatment with the extract, as well as necrosis/atrophy of pancreatic acini. Thus, treatment with AGE is not able to avoid hepatic changes. However, it seems to protect the hepatocytes from morphological changes.

This may be related to a decrease in oxidative stress. In yet another study, the aqueous graviola leaf extract of *Annona muricata* Linn was able to protect pancreatic  $\beta$ -cells, and hence improve glucose metabolism, which was not visualized in our results [14].

## 5. Conclusions

In conclusion, no neurotoxic, behavioral, or mortality effects are produced by AGE in the acute toxicity test immediately after or during the post-treatment period. In addition, this study confirms the popular knowledge that graviola leaf tea reduces body weight and may also reduce cardiovascular risks, due to its beneficial effects in reducing plasma concentrations of LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol, triglycerides, and the atherogenic index, while also attenuating the accumulation of body fat. In addition, in our experimental model, the results found do not indicate the effectiveness of aqueous graviola leaf extract on insulin resistance and diabetes mellitus type 2. However, the extract was effective in improving glucose tolerance in the higher concentration of the AGE. Furthermore, AGE has anti-inflammatory activity due to the increase in IL-10. However, it does not inhibit the expression of TNF- $\alpha$ , IL-6 and MCP-1. These data support the utility of conducting further studies aimed at identifying the active compounds of the aqueous extract of the aqueous graviola leaf extract, and at clarifying its mechanism of action.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6643/11/7/1509/s1>, Figure S1: Body weight, weight of organs, food intake and water intake of animals in the control group and animals treated with AGE during the acute toxicity test.

**Author Contributions:** Conceptualization: S.S., K.d.C.F.; methodology: S.S., P.C.S.e.S., L.F.S., C.A.L.C., L.C.P., B.B.d.F., L.S.S., L.M.B., A.R.C.M.-C., A.F.d.S.; F.M.A.; R.d.C.A.G., K.d.C.F.; validation: S.S., RCAG KCF; formal analysis: S.S., P.C.S.e.S., L.F.S., C.A.L.C., L.C.P., R.d.C.A.G., K.d.C.F.; writing—review and editing: S.S., L.F.S., C.A.L.C., F.M.A.; L.C.P., B.B.d.F., A.F.d.S.; A.R.C.M.-C., R.d.C.A.G., K.d.C.F.; data curation: S.S., R.d.C.A.G., KCF; project administration: S.S., R.d.C.A.G., K.d.C.F.; software: KCF R.d.C.A.G.; visualization: S.S., R.d.C.A.G., KCF; supervision: S.S., L.F.S., C.A.L.C., R.d.C.A.G., K.d.C.F.

**Funding:** This research received no external funding.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank CAPES for the scholarship awarded.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Maki, C.; Funakoshi-Tago, M.; Aoyagi, R.; Ueda, F.; Kimura, M.; Kobata, K.; Tago, K.; Tamura, H. Coffee extract inhibits adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes by interrupting insulin signaling through the downregulation of IRS1. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0173264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Sung, Y.Y.; Kim, D.S.; Kim, S.H.; Kim, H.K. Anti-obesity activity, acute toxicity, and chemical constituents of aqueous and ethanol *Viola mandshurica* extracts. *BMC Complement. Altern. Med.* **2017**, *17*, 297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Han, T.S.; Lean, M.E. A clinical perspective of obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *JRSM Cardiovasc. Dis.* **2016**, *5*, 2048004016633371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Vucenik, I.; Stains, J.P. Obesity and cancer risk: Evidence, mechanisms, and recommendations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2012**, *1271*, 37–43. [[CrossRef](#)]
5. Hoving, L.R.; van der Zande, H.J.P.; Pronk, A.; Guigas, B.; Willems van Dijk, K.; van Harmelen, V. Dietary yeast-derived mannan oligosaccharides have immune-modulatory properties but do not improve high fat diet-induced obesity and glucose intolerance. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0196165. [[CrossRef](#)]
6. Li, S.; Tan, H.Y.; Wang, N.; Zhang, Z.J.; Lao, L.; Wong, C.W.; Feng, Y. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 26087–26124. [[CrossRef](#)]
7. Showalter, M.R.; Nonnecke, E.B.; Linderholm, A.L.; Cajka, T.; Sa, M.R.; Lonnerdal, B.; Kenyon, N.J.; Fiehn, O. Obesogenic diets alter metabolism in mice. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0190632. [[CrossRef](#)]
8. Zhang, C.; Ward, J.; Dauch, J.R.; Tanzi, R.E.; Cheng, H.T. Cytokine-mediated inflammation mediates painful neuropathy from metabolic syndrome. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0192333. [[CrossRef](#)]
9. Gu, M.; Zhang, Y.; Fan, S.; Ding, X.; Ji, G.; Huang, C. Extracts of *Rhizoma polygonati odorati* prevent high-fat diet-induced metabolic disorders in C57BL/6 mice. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e81724. [[CrossRef](#)]
10. Tan, S.; Li, M.; Ding, X.; Fan, S.; Guo, L.; Gu, M.; Zhang, Y.; Feng, L.; Jiang, D.; Li, Y.; et al. Effects of *Fortunella margarita* fruit extract on metabolic disorders in high-fat diet-induced obese C57BL/6 mice. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e93510. [[CrossRef](#)]
11. Donado-Pestana, C.M.; Dos Santos-Donado, P.R.; Daza, L.D.; Belchior, T.; Festuccia, W.T.; Genovese, M.I. Cagaita fruit (*Eugenia dysenterica* DC.) and obesity: Role of polyphenols on already established obesity. *Food Res. Int.* **2018**, *103*, 40–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Costa, A.G.V.; Garcia-Diaz, D.F.; Jimenez, P.; Silva, P.I. Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red-black berries. *J. Funct. Foods* **2013**, *5*, 539–549. [[CrossRef](#)]
13. Khan, W.; Parveen, R.; Chester, K.; Parveen, S.; Ahmad, S. Hypoglycemic Potential of Aqueous Extract of *Moringa oleifera* Leaf and In Vivo GC-MS Metabolomics. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Florence, N.T.; Benoit, M.Z.; Jonas, K.; Alexandra, T.; Desire, D.D.; Pierre, K.; Theophile, D. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *151*, 784–790. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Justino, A.B.; Miranda, N.C.; Franco, R.R.; Martins, M.M.; Silva, N.M.D.; Espindola, F.S. *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against alpha-amylase, alpha-glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *100*, 83–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Djeridane, A.; Yousfi, M.; Nadjemi, B.; Boutassouna, D.; Stocker, P.; Vidal, N. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* **2006**, *97*, 654–660. [[CrossRef](#)]
17. Lin, J.-Y.; Tang, C.-Y. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chem.* **2007**, *101*, 140–147. [[CrossRef](#)]
18. Broadhurst, R.B.; Jones, W.T. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J. Sci. Food Agric.* **1978**, *29*, 788–794. [[CrossRef](#)]

19. Kumaran, A.; Karunakaran, R.J. Nitric oxide radical scavenging active components from *Phyllanthus emblica* L. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2006**, *61*, 1–5. [[CrossRef](#)]
20. Berrondo, L.F.; Gabriel, F.T.; Fernandes, S.B.d.O.; Menezes, F.d.S.; Moreira, D.d.L. Dirhamnosyl flavonoid and other constituents from *Brillantaisia palisatii*. *Química Nova* **2003**, *26*, 922–923. [[CrossRef](#)]
21. Harborne, J.B. The Flavonoids: Advances in Research Since 1986 (Harborne, J.B.). *J. Chem. Educ.* **1995**, *72*, 73.
22. Agrawal, P.K. *Carbon-13 NMR of Flavonoids*, 1st ed.; Agrawal, P.K., Ed.; Elsevier Science: Amsterdam, The Netherlands, 1989; Volume 39, pp. 283–364.
23. OECD. *Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure*; OECD Publishing: Paris, France, 2008. [[CrossRef](#)]
24. Malone, M.H.; Robichaud, R.C. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia* **1962**, *25*, 320–322.
25. Da Silva, E.R.; Salmazzo, G.R.; da Silva Arrigo, J.; Oliveira, R.J.; Kassuya, C.A.; Cardoso, C.A. Anti-inflammatory Evaluation and Toxicological Analysis of *Campomanesia xanthocarpa* Berg. *Inflammation* **2016**, *39*, 1462–1468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C., Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* **1993**, *123*, 1939–1951. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Hargrove, R.E.; Alford, J.A. Growth Rate and Feed Efficiency of Rats Fed Yogurt and Other Fermented Milks. *J. Dairy Sci.* **1978**, *61*, 11–19. [[CrossRef](#)]
28. Santos, S.H.; Fernandes, L.R.; Mario, E.G.; Ferreira, A.V.; Porto, L.C.; Alvarez-Leite, J.I.; Botion, L.M.; Bader, M.; Alenina, N.; Santos, R.A. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes* **2008**, *57*, 340–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Donatto, F.F.; Neves, R.X.; Rosa, F.O.; Camargo, R.G.; Ribeiro, H.; Matos-Neto, E.M.; Seelaender, M. Resistance exercise modulates lipid plasma profile and cytokine content in the adipose tissue of tumour-bearing rats. *Cytokine* **2013**, *61*, 426–432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Lira, F.S.; Rosa, J.C.; Pimentel, G.D.; Tarini, V.A.; Arida, R.M.; Faloppa, F.; Alves, E.S.; do Nascimento, C.O.; Oyama, L.M.; Seelaender, M.; et al. Inflammation and adipose tissue: Effects of progressive load training in rats. *Lipids Health Dis.* **2010**, *9*, 109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. White, P.A.; Cercato, L.M.; Batista, V.S.; Camargo, E.A.; De Lucca, W.; Oliveira, A.S.; Silva, F.T.; Goes, T.C.; Oliveira, E.R.; Moraes, V.R.; et al. Aqueous extract of *Chrysobalanus icaco* leaves, in lower doses, prevent fat gain in obese high-fat fed mice. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *179*, 92–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Kleiner, D.E.; Brunt, E.M.; Van Natta, M.; Behling, C.; Contos, M.J.; Cummings, O.W.; Ferrell, L.D.; Liu, Y.C.; Torbenson, M.S.; Unalp-Arida, A.; et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **2005**, *41*, 1313–1321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Chandran, R.; Parimelazhagan, T.; Shanmugam, S.; Thankarajan, S. Antidiabetic activity of *Syzygium calophyllifolium* in Streptozotocin-Nicotinamide induced Type-2 diabetic rats. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *82*, 547–554. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Wang, H.; Xue, Y.; Wang, B.; Zhao, J.; Yan, X.; Huang, Y.; Du, M.; Zhu, M.J. Maternal obesity exacerbates insulinitis and type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Reproduction* **2014**, *148*, 73–79. [[PubMed](#)]
35. Pereira, S.S.; Teixeira, L.G.; Aguilar, E.C.; Matoso, R.O.; Soares, F.L.; Ferreira, A.V.; Alvarez-Leite, J.I. Differences in adipose tissue inflammation and oxidative status in C57BL/6 and ApoE<sup>-/-</sup> mice fed high fat diet. *Anim. Sci. J.* **2012**, *83*, 549–555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Cercato, L.M.; White, P.A.; Nampo, F.K.; Santos, M.R.; Camargo, E.A. A systematic review of medicinal plants used for weight loss in Brazil: Is there potential for obesity treatment? *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *176*, 286–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Verma, N.; Shukla, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* **2015**, *2*, 105–113. [[CrossRef](#)]
38. George, V.C.; Kumar, D.R.; Suresh, P.K.; Kumar, R.A. Antioxidant, DNA protective efficacy and HPLC analysis of *Annona muricata* (soursop) extracts. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 2328–2335.
39. Gavamukulya, Y.; Abou-Ellella, F.; Wamunyokoli, F.; AEl-Shemy, H. Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2014**, *7*, S355–S363. [[CrossRef](#)]

40. Coria-Téllez, A.V.; Montalvo-González, E.; Yahia, E.M.; Obledo-Vázquez, E.N. Annona muricata: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arab. J. Chem.* **2018**, *11*, 662–691. [[CrossRef](#)]
41. Moghadamtousi, S.Z.; Fadaeinasab, M.; Nikzad, S.; Mohan, G.; Ali, H.M.; Kadir, H.A. Annona muricata (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 15625–15658. [[CrossRef](#)]
42. Nawwar, M.; Ayoub, N.; Hussein, S.; Hashim, A.; El-Sharawy, R.; Wende, K.; Harms, M.; Lindequist, U. A flavonol triglycoside and investigation of the antioxidant and cell stimulating activities of Annona muricata Linn. *Arch. Pharm. Res.* **2012**, *35*, 761–767. [[CrossRef](#)]
43. Panchal, S.K.; Brown, L. Rodent models for metabolic syndrome research. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, *2011*, 351982. [[PubMed](#)]
44. Della Vedova, M.C.; Muñoz, M.D.; Santillan, L.D.; Plateo-Pignatari, M.G.; Germanó, M.J.; Tosi, M.E.R.; Garcia, S.; Gomez, N.N.; Fornes, M.W.; Mejiba, S.E.G.; et al. A Mouse Model of Diet-Induced Obesity Resembling Most Features of Human Metabolic Syndrome. *Nutr. Metab. Insights* **2016**, *9*, NMLS32907.
45. Rupasinghe, H.P.; Sekhon-Loodu, S.; Mantso, T.; Panayiotidis, M.I. Phytochemicals in regulating fatty acid beta-oxidation: Potential underlying mechanisms and their involvement in obesity and weight loss. *Pharmacol. Ther.* **2016**, *165*, 153–163. [[PubMed](#)]
46. Boadi, W.Y.; Lo, A. Effects of Quercetin, Kaempferol, and Exogenous Glutathione on Phospho- and Total-AKT in 3T3-L1 Preadipocytes. *J. Diet Suppl.* **2018**, *15*, 814–826. [[PubMed](#)]
47. Adewole, S.O.; Ojewole, J.A. Protective effects of Annona muricata Linn. (Annonaceae) leaf aqueous extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of streptozotocin-treated diabetic rats. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **2008**, *6*, 30–41.
48. Chernukha, I.M.; Fedulova, L.V.; Kotenkova, E.A.; Takeda, S.; Sakata, R. Hypolipidemic and anti-inflammatory effects of aorta and heart tissues of cattle and pigs in the atherosclerosis rat model. *Anim. Sci. J.* **2018**, *89*, 784–793. [[PubMed](#)]
49. Mazaherioun, M.; Djalali, M.; Koohdani, F.; Javanbakht, M.H.; Zarei, M.; Beigy, M.; Ansari, S.; Rezvan, N.; Saedisomeolia, A. Beneficial Effects of n-3 Fatty Acids on Cardiometabolic and Inflammatory Markers in Type 2 Diabetes Mellitus: A Clinical Trial. *Med. Princ. Pract.* **2017**, *26*, 535–541.
50. Adeyemi, D.O.; Komolafe, O.A.; Adewole, O.S.; Obuotor, E.M.; Adenowo, T.K. Anti hyperglycemic activities of Annona muricata (Linn). *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **2008**, *6*, 62–69.
51. Ahalya, B.; Shankar, K.R.; Kiranmayi, G.V.N. Exploration of anti-hyperglycemic and hypolipidemic activities of ethanolic extract of Annona muricata bark in alloxan induced diabetic rats. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2014**, *25*, 21–27.
52. Cavalot, F. Do data in the literature indicate that glycaemic variability is a clinical problem? Glycaemic variability and vascular complications of diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* **2013**, *15* (Suppl. 2), 3–8. [[CrossRef](#)]
53. Ceriello, A.; Esposito, K.; Piconi, L.; Ihnat, M.; Thorpe, J.; Testa, R.; Bonfigli, A.R.; Giugliano, D. Glucose “peak” and glucose “spike”: Impact on endothelial function and oxidative stress. *Diabetes Re. Clin. Pract.* **2008**, *82*, 262–267.
54. Galan, A.; Mayer, I.; Rafaj, R.B.; Bendelja, K.; Susic, V.; Ceron, J.J.; Mrljak, V. MCP-1, KC-like and IL-8 as critical mediators of pathogenesis caused by Babesia canis. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0190474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Veloso, C.C.; Oliveira, M.C.; Rodrigues, V.G.; Oliveira, C.C.; Duarte, L.P.; Teixeira, M.M.; Ferreira, A.V.M.; Perez, A.C. Evaluation of the effects of extracts of Maytenus imbricata (Celastraceae) on the treatment of inflammatory and metabolic dysfunction induced by high-refined carbohydrate diet. *Inflammopharmacology* **2018**, *27*, 539–548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Liu, Y.; Xu, D.; Yin, C.; Wang, S.; Wang, M.; Xiao, Y. IL-10/STAT3 is reduced in childhood obesity with hypertriglyceridemia and is related to triglyceride level in diet-induced obese rats. *BMC Endocr. Disord.* **2018**, *18*, 39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

57. Scoditti, E.; Massaro, M.; Carluccio, M.A.; Pellegrino, M.; Wabitsch, M.; Calabriso, N.; Storelli, C.; De Caterina, R. Additive regulation of adiponectin expression by the mediterranean diet olive oil components oleic Acid and hydroxytyrosol in human adipocytes. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0128218.
58. Wu, T.; Tang, Q.; Gao, Z.; Yu, Z.; Song, H.; Zheng, X.; Chen, W. Blueberry and mulberry juice prevent obesity development in C57BL/6 mice. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e77585.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).