

Efek Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kenitu (*Chrysophyllum Cainito* L.) terhadap Tikus Wistar yang Diinduksi *Cyclophosphamid*

Antioxidant Effect of Kenitu leaf Etanol Extract (Chrysophyllum Cainito L.) on Wistar Rat Induced Cyclophosphamid

Ekvan Danang Setya Pramudito¹, Erfan Efendi², M. Ali Shodikin³

¹Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Jember

²Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Jember

³Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Alamat email korespondensi edoiyou1@gmail.com

ABSTRAK

Saat ini kanker menempati peringkat kedua tertinggi penyebab kematian secara global dengan perhitungan kematian total 8,8 juta jiwa di tahun 2015. Terapi kanker ada banyak salah satunya dengan kemoterapi *cyclophosphamid*, tetapi regimen ini memiliki efek samping yaitu depresi sumsum tulang melalui metabolit aktifnya yaitu 4 *hidroxy cyclophosphamid* dan meningkatkan ROS yang nantinya berpengaruh pada peningkatan MDA serum. Peningkatan MDA serum dapat dicegah dengan pemberian antioksidan dan tumbuhan yang memiliki antioksidan yang bervariasi yaitu daun kenitu. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh antioksidan pemberian ekstrak daun kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) terhadap kadar MDA serum tikus Wistar yang diinduksi *cyclophosphamid*. Penelitian ini menggunakan metode *quasi experimental* dengan rancangan *post test only controlled grup design* dengan 1 kelompok kontrol normal, 1 kelompok kontrol negatif (*cyclophosphamid*), dan 5 kelompok perlakuan (dosis ekstrak 50mg/kgBB; 100mg/kgBB; 200mg/kgBB; 400mg/kgBB; dan 800mg/kgBB) terhadap tikus wistar. Hasil penelitian kelompok perlakuan dosis 100mg/kgBB didapatkan rata rata kadar MDA serum 1,94 µg/mL yang merupakan penurunan tertinggi pada penelitian ini. Hasil uji korelasi Kendall Tau didapatkan pengaruh ekstrak daun kenitu terhadap kadar MDA serum dengan $p=0,013$ serta koefisien korelasi 0,431.

Kata kunci : ekstrak etanol daun kenitu, *cyclophosphamid*, MDA serum

ABSTRACT

Recently, cancer is globally the second highest cause of death with a total death about 8.8 million in 2015. There are some therapy of cancer, one of them by using *cyclophosphamid* chemotherapy, but this regimen has side effects of bone marrow depression through its active metabolite of 4 *hydroxy cyclophosphamid* and increase ROS which will effect on serum MDA elevation. Increased MDA serum can be prevented by giving an antioxidant or plants that have various antioxidants, such as kenitu leaves. The aim of this study was to determine the effect of antioxidants in kenitu leaves (*Chrysophyllum cainito* L.) extract to MDA serum levels of *cyclophosphamid*-induced mice. This study used *quasi experimental* method with *post test only controlled group design* by using 1 normal control group, 1 negative control group (*cyclophosphamid*), and 5 treatment groups (dose of extract 50mg/kgBW; 100mg/kgBW; 200mg/kgBW; 400mg/kgBB; and 800mg / kgBW). The results of the treatment group dose 100mg/kgBB showed the average of MDA serum levels was 1.94 µg/mL which is the highest decrease in this study. The result of Kendall Tau correlation test showed the effect of kenitu leaves extract to MDA serum level had $p = 0.013$ and correlation coefficient = 0.431.

Keywords: kenitu leaf etanol extract, *cyclophosphamid*, MDA serum

Pendahuluan

Kanker merupakan salah satu penyakit genetika primer ketika terjadi mutasi pada beberapa gen sehingga sel yang normal berubah menjadi sel tumor (Carpenters, 2010). Di Indonesia angka mortalitas yang diakibatkan oleh kanker sebesar 10,2 % dan terus meningkat setiap tahunnya bahkan diperkirakan pada tahun 2030 akan mencapai lebih dari 13,2 juta orang menderita kanker (Panigoro, 2014). Menurut data Kemenkes tahun 2013 mengenai jumlah penderita kanker pada semua umur, Jawa Timur menempati posisi kedua provinsi dengan kasus kanker tertinggi yaitu 61.230 kasus.

Kemoterapi merupakan bentuk pengobatan kanker secara sistemik dengan obat-obatan atau bahan kimia yang bertujuan untuk menghentikan, menghambat dan menghancurkan inti sel yang sedang membelah. Salah satu regimen kemoterapi yang banyak digunakan yaitu cyclophosphamid. Obat ini termasuk dalam golongan Alkylating agent yang bersifat sitotoksik dengan mekanisme kerja merusak sintesis DNA dan pembelahan sel (Brunton, 2012). Cyclophosphamid secara luas digunakan pada banyak kasus kanker seperti tumor solid dan limfoma (Sinanoglu, 2012), efek samping obat ini antara lain penekanan sumsum tulang, gangguan jantung, emetik, dan perdarahan kandung kemih. Ketika obat ini bekerja terdapat derivat hidroperoksida Cyclophosphamid (4-OOH-CY) yang memproduksi reaktif oksigen spesies (ROS) sehingga terjadi gangguan desintegrasi mitokondria khususnya pada sel hemopoetik dan stromal sumsum tulang (Strauss et al., 2008).

Kadar MDA yang tinggi dapat dikurangi dengan pemberian senyawa antioksidan (Kheradmand et al., 2009). Daun kenitu mengandung antioksidan alkaloid (Koffi et al., 2009) dan golongan triterpene meliputi β amirin asetat dan asam gentistik (Ningsih et al., 2016). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh antioksidan pemberian ekstrak daun kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) terhadap kadar MDA serum tikus Wistar yang diinduksi cyclophosphamid.

Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode *quasi experimental* dengan rancangan *post test only controlled group design*. Sampel yang digunakan pada penelitian ini berjumlah 28 ekor tikus wistar yang dibagi menjadi 7 kelompok, masing-masing 4

ekor. Sampel diseleksi menurut kriteria inklusi dan eksklusi agar didapatkan sampel yang homogen. Kriteria inklusi sampel penelitian adalah tikus dengan jenis kelamin jantan, berat badan 150-240 gram, usia 2-3 bulan, keadaan sehat dan bergerak aktif. Kriteria eksklusi pada penelitian ini adalah tikus sakit dan mati sebelum perlakuan.

Awalnya tikus diadaptasikan selama 7 hari dengan tempat tinggal tikus dikondisikan agar tenang serta diberi pakan berupa turbo sediaan pelet dan air minum secara *ad libitum*. Setelah itu, tikus dibagi menjadi 7 kelompok yaitu satu kelompok kontrol normal (K_N), satu kelompok kontrol negative (K_-), dan lima kelompok perlakuan (KP). Kelompok K_N diberi normal saline+DMSO 2% per sonde selama 10 hari dan tidak diinduksi *cyclophosphamid*. Kelompok K_- diberi DMSO 2% per sonde selama 10 hari dan diinduksi *cyclophosphamid* pada hari ke-7. Kelompok perlakuan diberi ekstrak daun kenitu selama 10 hari dan diinduksi *cyclophosphamid* 50mg/KgBB pada hari ke-7. Ekstrak daun kenitu diberikan dengan 5 dosis yang berbeda pada masing-masing kelompok KP yaitu KP1 = 50mg/KgBB; KP2 = 100mg/KgBB, KP3 = 200mg/KgBB, KP4 = 400mg/KgBB, dan KP5 = 800mg/KgBB.

Setelah perlakuan dilakukan pengukuran kadar MDA serum. Kadar MDA serum diukur dari darah hewan coba yang diambil dari jantung. Darah diambil sebanyak 4 ml, lalu dimasukkan ke dalam tabung di tunggu selama 30 menit kemudian di sentrifuge pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit, serum darah diambil sebanyak 100 mikroliter dicampur dengan TCA 20% 200 mikroliter kemudian didinginkan di dalam freezer selama 5 menit. Campuran tersebut kemudian di sentrifuge pada kecepatan 14000 rpm selama 5 menit kemudian diambil supernatan sebanyak 200 mikroliter, lalu ditambahkan TBA 0,67% 200 mikroliter dihomogenkan dan dipanaskan dengan air mendidih selama 60 menit, lalu didinginkan. Setelah dingin diperiksa dengan spektrofotometri dilakukan dengan panjang gelombang 532 nm, kadar MDA dihitung dengan kurva baku. Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan uji *kendalls tau* karena diketahui data terdistribusi tidak homogen.

Hasil Penelitian

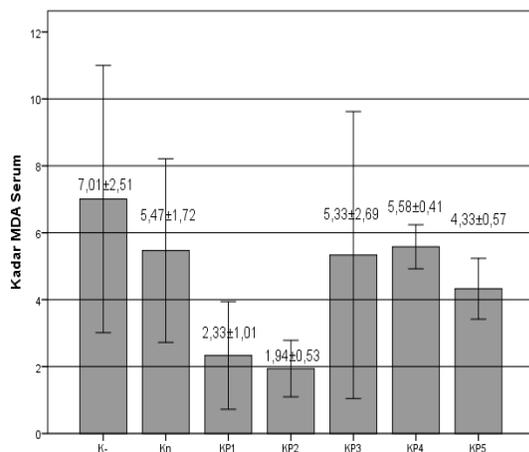
Penelitian ini menggunakan 28 ekor tikus sebagai sampel penelitian yang telah diadaptasikan selama 7 hari serta dibagi menjadi tujuh kelompok dengan

tiap kelompok terdiri dari empat ekor tikus. Kelompok Kn diberikan normal saline dan DMSO 2% sesuai dengan berat badan selama 10 hari, sedangkan kelompok K(-) juga diberi normal saline dan DMSO 2% kemudian pada hari ke 14 diinduksi cyclophosphamid secara intraperitoneal. Kelompok KP1-5 di berikan ekstrak etanol daun kenitu dengan dosis 50mg/kgBB, 100mg/kgBB, 200mg/kgBB, 400mg/kgBB dan 800mg/kgBB selama 10 hari kemudian pada hari ke 14 diinduksi cyclophosphamid. Pada hari ke-17 dilakukan pemeriksaan MDA serum dengan metode TBARS dan didapatkan absorbansi yang diukur menggunakan spektrofotometri, kemudian absorbansi tersebut dimasukkan ke dalam persamaan kurva standar MDA. Rata-rata kadar MDA serum tikus berdasarkan data tersebut dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 Rata-rata kadar MDA serum

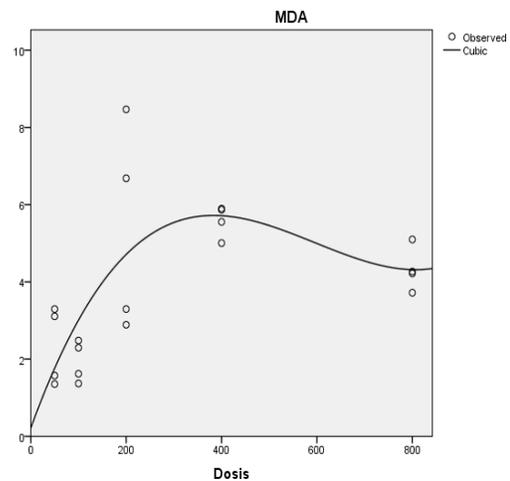
Kelompok Perlakuan	Rata-rata Kadar MDA Serum ($\mu\text{g/mL}$ \pm SD)
K(-)	7,01 \pm 2,51
Kn	5,47 \pm 1,72
KP1	2,33 \pm 1,01
KP2	1,94 \pm 0,53
KP3	5,33 \pm 2,69
KP4	5,58 \pm 0,41
KP5	4,33 \pm 0,57

Berdasarkan data rata-rata kadar MDA serum tersebut dapat digambarkan secara histogram yang ditunjukkan pada Gambar 4.1.



Gambar 1 Histogram rata-rata kadar MDA serum ($\mu\text{g/mL}$) \pm Standar deviasi

Data tersebut diuji normalitas dengan uji shapiro wilk didapatkan $p=0,216$ dan diuji homogenitas dengan uji lavene didapatkan $p=0,004$, sehingga dilakukan uji korelasi Kendalls Tau untuk mengetahui hubungan antar kelompok pemberian dosis dan seberapa kuat hubungan pemberian dosis terhadap kadar MDA serum. Hasil uji korelasi Kendalls Tau ini yaitu 0,013 yang artinya terdapat hubungan antara pemberian dosis dengan kadar MDA serum dengan koefisien korelasi 0,431. Penelitian ini menggunakan uji statistik regresi untuk mengetahui dosis efektif. Hasil uji regresi linear dapat dilihat pada Gambar 2.. Kurva yang cocok untuk data penelitian ini adalah jenis kurva kubik dengan R square sebesar 522 dengan signifikansi sebesar 0,007.



Gambar 2. Hasil persamaan uji regresi

Pembahasan

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek antioksidan ekstrak daun kenitu terhadap kadar MDA serum. Berdasarkan hasil penelitian, kelompok Kn memiliki rata rata kadar MDA serum 5,47 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan kelompok K(-) memiliki rata rata kadar MDA lebih tinggi yaitu 7,01 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini menunjukkan pada kelompok Kn proteksi terhadap radikal bebas yang dilakukan oleh antioksidan endogen berlangsung secara normal, sedangkan pada kelompok K(-) yang diinduksi oleh cyclophosphamid radikal bebas yang terbentuk bertambah banyak sehingga MDA yang terbentuk menjadi meningkat (Cuce et al., 2015).

Pada kelompok KP1 dengan rata rata kadar MDA serum 2,33 $\mu\text{g/mL}$ terjadi penurunan kadar MDA

serum. Hal ini berkaitan dengan Asam ursolat, yaitu asam triterpenoid pentasiklik dengan rumus molekul $C_{30}H_{48}O_3$ yang memiliki efek berupa pengikatan radikal hidroksil. Pengikatan radikal hidroksil oleh asam ursolat berkaitan dengan kemampuan mendonorkan atom hidrogen. Pada penelitian farmakosognitik menyebutkan bahwa daun kenitu memiliki beberapa senyawa meliputi asam ursolic, β sosterol, dan lupeol (Shailahan, 2014) Pada penelitian asam ursolik yang digunakan sebagai antioksidan untuk mencegah peroksidase lipid dan kerusakan DNA sel limfosit manusia menunjukkan bahwa senyawa ini dapat menurunkan kematian sel dan meningkatkan viabilitas sel ketika terapi awal sel yang di beri radiasi ultraviolet B. Pada penelitian tersebut juga menyatakan bahwa asam ursolat dapat mengurangi lipid peroksidase pada mikrosom (Ramachandran dan Prasad, 2008).

Pada kelompok KP3 dengan rata rata kadar MDA serum $5,33 \mu\text{g/mL}$ terjadi peningkatan MDA serum. Hal ini bisa disebabkan oleh zat aktif yang dimiliki daun kenitu yaitu kuersetin dan saponin (Zuhro et al., 2016). Saponin merupakan senyawa berbentuk glikosida yang memiliki aglikon berupa steroid dan triterpen. Saponin steroid tersusun atas inti steroid (C 27) dengan molekul karbohidrat. Steroid saponin dihidrolisis menghasilkan suatu aglikon yang dikenal sebagai saraponin. Efek saponin pada sel darah merah dapat menyebabkan hemolisis hal ini dikarenakan sel darah merah yang berikatan dengan saponin akan kehilangan bentuk bikonkafnya dan berubah menjadi sferik dan proses ini tidak dapat dikembalikan oleh adanya adenosin triphospat (Lorent, 2014).

Penurunan kadar MDA serum paling tinggi pada kelompok KP2 dengan dosis 100 mg/kgBB yaitu sebesar $1,94 \mu\text{g/mL}$, sedangkan penurunan kadar MDA serum paling rendah terjadi pada kelompok KP4 dengan dosis 400 mg/kgBB yaitu sebesar $5,58 \mu\text{g/mL}$. Hal ini disebabkan oleh perbedaan jumlah zat aktif yang terkandung didalam ekstrak daun kenitu. Total senyawa fenolik yang ada di dalam ekstrak daun kenitu sebesar $150,073 \pm 0,335 \text{ mg/AE g}$ sedangkan kandungan flavonoid sebesar $14,039 \pm 0,03 \text{ mg/AE}$. Salah satu senyawa fenol yang tinggi pada daun kenitu yaitu asam gentistik (Ningsih et al., 2016). Senyawa fenol lain yang dikandung oleh daun kenitu yaitu β amyryin asetat yang memiliki struktur $C_{32}H_{52}O_2$ potensi sebagai antiinflamasi dan dapat menghambat agregasi platelet yang diinduksi oleh kolagen, adenosin difosfat dan asam arakidonat (Fabiyyi et al., 2012). Pada penelitian lain juga

menyebutkan bahwa β amyryin asetat memiliki efek antihiperlipidemia dan hypolipidemia pada tikus yang diinduksi STZ dengan mekanisme yang belum diketahui tetapi diduga senyawa ini memiliki efek menghambat hidrolisis 2-arachidonoylglycerol (2-AG) dan meningkatkan endocannabinoid. Pada penelitian in vivo menyebutkan bahwa sistem endocannabinoid dan cannabinoid 1 (CB1) reseptor di hipotalamus dan system limbik yang dimediasi efek orexigenic. β amyryin asetat memiliki bioavailabilitas yang rendah tetapi waktu eliminasinya panjang pada tikus normal dengan pemberian melalui oral. Senyawa ini juga memiliki potensi yang baik secara oral pada penelitian hewan model inflamasi, nociceptive, gastroprotektor, dan hepatoprotektor (Santos et al., 2012).

Pada kelompok perlakuan KP5 dengan dosis 800 mg/kgBB terjadi penurunan kadar MDA serum. Hal ini disebabkan perbandingan antara senyawa kuersetin dan β amyryin asetat yang semakin meningkat sedangkan bioavailabilitas β amyryin asetat yang rendah ketika diberikan secara oral menyebabkan senyawa ini pada dosis yang rendah tidak memiliki efek yang banyak. Pada dosis 800 mg/kgBB diduga memiliki senyawa β amyryin asetat yang tinggi sehingga meskipun bioavailabilitasnya rendah senyawa yang masuk ke dalam tubuh juga banyak dan memiliki efek protektif (Santos et al., 2012).

Kelompok perlakuan KP1, KP2, KP3, dan KP4 memiliki hubungan positif dengan kekuatan korelasi sedang terhadap pemberian dosis ekstrak daun kenitu menurut statistik. Hal ini menunjukkan bahwa seiring meningkatnya dosis ekstrak etanol daun kenitu yaitu dosis 50 mg/kgBB , 100 mg/kgBB , 200 mg/kgBB , dan 400 mg/kgBB akan terjadi peningkatan kadar MDA serum. Zat aktif yang terkandung di daun kenitu akan meningkat seiring dengan meningkatnya dosis. Salah satu zat aktif yang dimiliki daun kenitu yaitu kuersetin, setelah kuersetin bekerja sebagai antioksidan senyawa ini berubah dan berpotensi menjadi produk oksidan yang berbahaya. Hasil degradasi kuersetin berupa ortho quinone dan ROS (Chen et al., 2014).

Kesimpulan

Kesimpulan dari hasil penelitian ini adalah sebagai berikut. Terdapat pengaruh pemberian ekstrak etanol daun kenitu terhadap kadar MDA serum tikus yang diinduksi cyclophosphamid. Penurunan kadar

MDA serum tertinggi pada penelitian ini terdapat pada dosis 100mg/kgBB.

Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh maka diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai daun kenitu yang diekstrak sampai mendapat zat aktif yang spesifik, efek antioksidan ekstrak daun kenitu terhadap kadar GSH dan katalase yang merupakan antioksidan alami pada tubuh serta pemanfaatan potensi proteksi ekstrak daun kenitu terhadap organ lain.

Ucapan Terimakasih

Pada kesempatan ini peneliti mengucapkan terimakasih kepada dr. Erfan Efendi, Sp.An dan dr. M. Ali Shodikin, M.Kes., Sp.A. atas bimbingan yang diberikan hingga tersusunnya artikel ini.

Daftar Pustaka

- Brunton, L. 2012. *Antineoplastik Agents in Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics 12th Ed.* San Fransisco: McGraw-Hill.
- Carpenters, A. D. 2010. *Cecil essentials of Medicine.* Philadelphia: Elsevier.
- Chen, R., J. Lin, J. Hong, D. Han, A. D. Zhang, R. Lan, L. Fu, Z. Wu, J. Lin, W. Zhang, Z. Wang, W. Chen, C. Chen, dan H. Zhang. 2014 .Potential toxicity of quercetin: The repression of mitochondrial copy number via decreased POLG expression and excessive TFAM expression in irradiated murine bone marrow. *Toxicology Reports.* pp. 450–458.
- Cuce, G., S. Çetinkaya, T. Koc, H. H. Esen, C. Limandal, T. Balci, S. Kalkan, dan M. Akoz. 2015. Chemoprotective effect of vitamin E in cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in rats. *Chemico-Biological Interactions.* Elsevier Ireland Ltd, 232, pp. 7–11.
- Fabiyi, O. A., O. Atolani, O. S. Adeyemi, dan G. A. Olatunji. 2012. Antioxidant and Cytotoxicity of β -Amyrin acetate fraction from *Bridelia ferruginea* Leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 2(2 SUPPL.) pp. 981–984.
- Kheradmand, M. Alirezaei, P. Asadian, E. R. Alavi, dan S. Joorabi. 2009. Antioxidant enzyme activity and MDA level in the rat testis following chronic administration of ghrelin. *Andrologia.*
- Koffi, N., A. K Ernest, T. M. Solange, K. Beugré, dan Z. G Noël. 2009. Effect of Aqueous Extract of *Chrysophyllum cainito* Leaves on the Glycaemia of Diabetic Rabbits. *Afr.J. Pharm.Pharmacol,* pp. 501-506.
- Lorent, J. H., J. Quetin-Leclercq, dan M. Mingeot-Leclercq. 2014. The amphiphilic nature of saponins and their effects on artificial and biological membranes and potential consequences for red blood and cancer cells. *Royal Society of Chemistry.* pp. 8803–8822.
- Ningsih, I. Y., S. Zulaikhah, M. A. Hidayat, dan B. Kuswandi. 2016. Antioxidant Activity of Various Kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) Leaves Extracts from Jember, Indonesia. *Elsevier.* pp. 378–385.
- Panigoro, S. S., 2014. Rencana Strategi Pengembangan Pusat Kanker Nasional Indonesia, Sebuah Studi Kasus. *ARSI.*
- Ramachandran, S. dan N. R. Prasad. 2008. Effect of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, on ultraviolet-B radiation-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and DNA damage in human lymphocytes. *Chemico-Biological Interactions.* pp. 99–107.
- Santos, F. A., J. T. Frota, B. R. Arruda, T. S. de Melo, A. A. C. A. da Silva, G. A. C. Brito, M. H. Chaves, dan V. S. Rao. 2012. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α,β -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. *Lipids in Health and Disease.* pp. 1–8.
- Shailahan, S. dan D. Gurjar. 2014. Pharmacognostic and Phytochemical evaluation of *Chrysophyllum cainito* L. Leaves. *International Journal of Pharmaceututical Science Review and Researc,* pp. 26 (10) : 106-111.
- Sinanoglu, O., A. N. Yener, S. Ekici, A. Midi, dan F. B. Aksungar. 2012. The protective effects of spirulina in cyclophosphamide induced nephrotoxicity and urotoxicity in rats. *Urology.*
- Strauss, G., M-A. Westhoff, P. F-Posovszky, S. Fulda, M. Schanbacher, S.M. Eckhoff, K. Stahnke, N. Vahsen, G. Kroemer, dan K-M Debatin. 2008. 4-

hydroperoxy-cyclophosphamide mediates caspase- independent T-cell apoptosis involving oxidative stress-induced nuclear relocation of mitochondrial apoptogenic factors AIF and EndoG. *Nature publishing group*.

Zuhro, F., E. Puspitasari, S. Muslichah, dan M. A. Hidayat. 2016. Aktivitas Inhibitor α - Glukosidase Ekstrak Etanol Daun Kenitu (*Chrysophyllum cainito* L .). *Pustaka Kesehatan*. pp. 1–7