

## Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) terhadap Jumlah Eritrosit Tikus Wistar yang Diinduksi *Cyclophosphamide*

### *Activity of Cainito Leaves Ethanol Extract (Chrysophyllum cainito L.) on Wistar's Total Erythrocytes Induced Cyclophosphamide*

Heri Puguh Widodo<sup>1</sup>, Ika Rahmawati Sutejo<sup>2</sup>, Rini Riyanti<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Jember

<sup>2</sup>Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Jember

<sup>3</sup>Laboratorium Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Alamat email: ikarahmawati.fk@unej.ac.id

#### ABSTRAK

Salah satu obat kemoterapi yang sering digunakan yaitu *cyclophosphamide*. Namun, penggunaan *cyclophosphamide* dapat memberikan berbagai efek toksik. Efek toksik yang paling umum dari *cyclophosphamide* adalah supresi sumsum tulang dengan anemia sebagai salah satu tandanya. Kandungan antioksidan yang dimiliki daun kenitu berpotensi meningkatkan produksi sel darah terutama eritrosit. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas pemberian ekstrak etanol daun kenitu terhadap hitung eritrosit tikus yang diinduksi *cyclophosphamide* secara *in vivo*. Sampel berjumlah 20 ekor tikus wistar jantan dibagi dalam lima kelompok; kelompok normal, kelompok kontrol negatif, dan tiga kelompok perlakuan ekstrak etanol daun kenitu dengan dosis 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB yang diberikan selama satu minggu diikuti pemberian *cyclophosphamide* secara intraperitoneal dengan dosis 50 mg/kgBB sebanyak satu kali. Hasil Uji *One Way Anova* menunjukkan signifikansi 0,015 ( $p < 0,05$ ). Namun, hasil uji LSD menunjukkan tidak terdapat hasil berbeda signifikan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok perlakuan. Kesimpulannya adalah tidak terdapat perbedaan jumlah eritrosit pada tikus yang hanya diberi *cyclophosphamide* dengan tikus sebelumnya diberikan ekstrak daun kenitu.

**Kata kunci :** Ekstrak etanol daun kenitu, proses pembentukan sel darah, eritrosit, *cyclophosphamide*

#### ABSTRACT

*One of the commonly used chemotherapy drugs is cyclophosphamide. However, the use of cyclophosphamide can provide various toxic effects. The most common toxic effect of cyclophosphamide is bone marrow suppression with anemia as one of its markers. The antioxidant content of cainito leaf potentially increase the production of blood cells, especially erythrocytes. The aims of this study is determining the effectiveness of the cainito leaf ethanol extract against cyclophosphamide induced mouse erythrocyte count in vivo. A sample of 20 male wistar rats was divided into five groups; normal group, negative control group, and three groups of ethanol extract of cainito leaf with dose 100 mg/kgBW, 200 mg/kgBW, and 400 mg/kgBW were administered for one week followed by intraperitoneal cyclophosphamide with dose 50 mg/kgBW as much as one time. One Way Anova Test result showed a significance of 0.015 ( $p < 0.05$ ). However, the LSD test results showed no significant different results between the negative control group and the treatment group. The conclusion was that there was no difference in the amount of erythrocytes in mice given only cyclophosphamide with previous rats given cainito extract.*

**Keywords:** *Cainito leaf ethanolic extract, process of blood cell formation, erythrocyte, cyclophosphamide*

## Pendahuluan

Kanker adalah salah satu penyakit paling penting di dunia dan rumit karena menjadi multifaktorial dalam pandangan epidemiologi. Ada sekitar 14,9 juta kasus baru di dunia pada tahun 2012. Salah satu kanker paling umum yakni kanker payudara dengan tingkat insiden yang tinggi di semua negara. Terdapat 1,7 juta kasus baru kanker payudara per tahun dan merupakan kanker umum kedua dari semua jenis kanker karena dari semua jenis kanker, kanker payudara menyumbang sebesar 25%.

Kebanyakan kasus kanker payudara, kemo (terutama sebagai pengobatan adjuvan atau neoadjuvan) sangat efektif ketika berbagai kombinasi obat digunakan. Salah satu obat kemo yang sering digunakan yaitu *cyclophosphamide*. *Cyclophosphamide* adalah salah satu agen antikanker paling sukses yang pernah disintesis. *Cyclophosphamide* merupakan molekul yang paling efektif diantara 1.000 senyawa yang dipilih dan antibiotik yang diuji terhadap 33 tumor. Namun, penggunaan *cyclophosphamide* dapat memberikan berbagai efek toksik. Efek toksik yang paling umum dari *cyclophosphamide* adalah supresi sumsum tulang dengan anemia sebagai salah satu tandanya.

Antioksidan mampu meningkatkan jumlah sel induk hemopoietik dan sel progenitor dengan mekanisme yang berbeda-beda. Salah satu tanaman yang kaya dengan kandungan antioksidan yakni daun *Chrysophyllum cainito* L. atau yang biasa disebut kenitu oleh masyarakat Indonesia. Daunnya diketahui sebagai sumber terpenoid (seperti asam ursolik, lupeol, beta-sisterol) dan fenolat (asam galat) dengan komposisi sebesar  $4,004 \pm 0,122\%$ . Kandungan terpenoid daun *Chrysophyllum cainito* L. lebih besar dibanding daun *Psidium guava* L. dengan nilai  $4,004 \pm 0,122\%$  dan  $1,000\%$ .

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan jumlah eritrosit antara kelompok tikus yang hanya diberi *cyclophosphamide* dengan tikus yang sebelumnya diberikan ekstrak daun kenitu.

## Metode Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *quasi experimental laboratories* dengan rancangan *post test only control group design*. Penentuan sampel penelitian menggunakan metode *Stratified Random Sampling* dengan jumlah 20 ekor tikus *Rattus norvegicus* galur wistar jantan dengan berat 150-200 gram dan

umur 2-3 bulan. Sampel dibagi menjadi lima kelompok, masing-masing terdiri dari 4 ekor; kelompok normal (KN), kelompok kontrol negatif (K(-)), dan tiga kelompok perlakuan ekstrak daun kenitu Kp1 dosis 100 mg/kgBB, Kp2 200 mg/kgBB, dan Kp3 400 mg/kgBB. Kelompok normal diberi normal saline dan DMSO 10% per sonde begitu pun kelompok negatif namun diikuti pemberian *cyclophosphamide* 50 mg/kgBB intraperitoneal.

Pemeriksaan jumlah eritrosit dilakukan secara manual menggunakan metode pengenceran. Proses ini dilakukan secara *double blinding*. Pemeriksaan dilakukan dalam 24 jam setelah sampel darah diambil.

Data hasil penelitian dianalisis menggunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas *Levene's test*. Apabila data yang didapatkan terdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji komparatif *One-way Anova* dan dilanjutkan dengan *post hoc test* LSD. Apabila data yang diperoleh tidak terdistribusi normal dan homogen, dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis*.

## Hasil Penelitian

Rata-rata jumlah eritrosit semua kelompok dapat dilihat pada tabel 1. Hasil rata-rata dan standar deviasi jumlah eritrosit masing-masing kelompok yakni untuk kelompok normal (KN) sebesar  $7,068 \pm 1,792 \times 10^6/\text{mm}^3$  dan kontrol negatif (K(-)) sebesar  $4,955 \pm 1,047 \times 10^6/\text{mm}^3$ . Hasil rata-rata yang diperoleh dari kelompok perlakuan dengan dosis 100 mg/kgBB (Kp1) sebesar  $4,423 \pm 1,271 \times 10^6/\text{mm}^3$ , dosis 200 mg/kgBB (Kp2) sebesar  $2,899 \pm 1,618 \times 10^6/\text{mm}^3$ , dan dosis 400 mg/kgBB (Kp3) sebesar  $6,069 \pm 1,743 \times 10^6/\text{mm}^3$ .

Tabel 1. Hasil rata-rata jumlah eritrosit

No.	Perlakuan	Rata-rata $\pm$ Standar Deviasi (...x $10^6/\text{mm}^3$ )
1.	Kontrol Normal	$7,068 \pm 1,792$
2.	Kontrol Negatif	$4,955 \pm 1,047$
3.	Kelompok Kp1	$4,423 \pm 1,271$
4.	Kelompok Kp2	$2,899 \pm 1,618$
5.	Kelompok Kp3	$6,069 \pm 1,743$

Hasil rata-rata jumlah eritrosit dianalisis persebaran data dengan menggunakan uji *Saphiro-Wilk* dan homogenitasnya menggunakan uji *Levene's test*. Hasil kedua analisis tersebut menunjukkan  $p > 0,05$ . Hal ini menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dan memiliki varian yang sama. Hasil rata-rata

jumlah eritrosit kemudian dianalisis menggunakan *One Way Anova* untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antar kelompok.

Hasil uji *One Way Anova* didapatkan nilai signifikansi sebesar  $p = 0,015$  ( $p < 0,05$ ) menunjukkan bahwa terdapat minimal dua kelompok yang memiliki rata-rata jumlah eritrosit yang berbeda signifikan. Uji lanjutan *Post Hoc* LSD digunakan untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Hasil uji analisis *Post Hoc* LSD berdasarkan Tabel 2 didapatkan data antar kelompok sebagai berikut.

Tabel 2. Hasil Uji *Post Hoc* LSD

	Normal	K(-)	Kp1	Kp2	Kp3
Normal		NS	(*)	(*)	NS
K(-)	NS		NS	NS	NS
Kp1	(*)	NS		NS	NS
Kp2	(*)	NS	NS		(*)
Kp3	NS	NS	NS	(*)	

## Pembahasan

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas pemberian ekstrak etanol daun kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) terhadap hitung eritrosit tikus wistar yang diinduksi *cyclophosphamide*. Penelitian ini menggunakan kelompok kontrol negatif sebagai pembanding. Menurut Godall (1910) jumlah eritrosit tikus normal berada pada kisaran  $6.000.000/mm^3$  hingga  $10.000.000/mm^3$  dan Simonds (1925) menyebutkan bahwa rentang jumlah eritrosit pada tikus normal berada pada kisaran  $6.000.000/mm^3$  hingga  $8.000.000/mm^3$ . Namun, pada penelitian ini terdapat beberapa hewan coba yang jumlah eritrositnya dibawah batas tersebut. Hal ini menjadi kekurangan dalam penelitian ini yang tidak menggunakan pretest sehingga peneliti tidak mengetahui kondisi hewan coba dari awal penelitian atau memang pemberian ekstrak yang tidak memberikan pengaruh. Selain itu, penggunaan metode perhitungan secara manual juga rentan terhadap berbagai kesalahan yang dapat diakibatkan mulai dari pengambilan sampel, kesalahan pengenceran, kesalahan dalam memasukkan ke kamar hitung, dan kelelahan fokus mata akibat pemeriksaan sampel yang banyak.

Kesalahan perhitungan dengan teknik manual sebesar 15-30% (Math *et al.*, 2016).

Pengambilan sampel, pengenceran, dan pipet yang kurang tepat dapat menyebabkan darah tidak tercampur homogen dengan pelarut sehingga hasil perhitungan menjadi tidak akurat. Kesalahan lain yang sering terjadi berkaitan dengan kamar hitung dan teknik perhitungan. Perhitungan harus sesuai dengan aturan sehingga eritrosit tidak terhitung berulang kali (Kiswari, 2014). Selain itu, ketelitian dan pengalaman teknisi juga menentukan hasil perhitungan (Pandit *et al.*, 2015; Ranjan *et al.*, 2016).

Berdasarkan Tabel 4.2 tidak terdapat perbedaan jumlah eritrosit yang signifikan antara kelompok kontrol negatif dengan ketiga kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak daun kenitu. Hal ini dikarenakan jumlah sampel yang digunakan tidak ideal, dimana penggunaan sampel yang seharusnya berjumlah lima ekor menjadi empat ekor. Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian memiliki peran besar dalam menentukan hasil. Penggunaan sampel yang lebih kecil dari jumlah ideal dapat meningkatkan kesalahan asumsi yang seharusnya benar menjadi salah sehingga merusak validitas penelitian. Begitu pula penggunaan sampel yang lebih besar dapat mengubah perbedaan kecil menjadi perbedaan yang signifikan secara statistik, meskipun hasil sebenarnya tidak ada signifikansi (Faber dan Fonseca, 2014).

Apabila kelompok perlakuan satu (dosis ekstrak 100 mg/kgBB) dan kelompok perlakuan dua (dosis ekstrak 200 mg/kgBB) dibandingkan dengan kelompok normal, ketiganya memiliki penurunan jumlah eritrosit yang bermakna ( $p < 0,05$ ). Hal ini dipicu oleh aktivitas metabolit *cyclophosphamide*. *Cyclophosphamide* merupakan obat kanker yang tidak aktif dalam bentuk induknya. Obat ini baru aktif ketika dimetabolisme oleh CYP-450 di hepar menjadi *4-Hydroxycyclophosphamide* dan diedarkan ke seluruh tubuh melalui sirkulasi. Setelah memasuki sel (terutama sel pluripoten pembentuk eritrosit/CFU-E), *4-Hydroxycyclophosphamide* diuraikan menjadi akrolein dan mustard fosforamid yang keduanya merupakan zat sitotoksik (de Jonge *et al.*, 2005; Katzung *et al.*, 2012). Akrolein merupakan aldehid yang sangat reaktif dan sitotoksik yang bekerja dengan cara menurunkan kadar glutathion seluler melalui konjugasi (de Jonge *et al.*, 2005). Berkurangnya kadar glutathion seluler dapat memicu timbulnya stres oksidatif yang memainkan peran utama dalam proses penuaan,

dan patogenesis berbagai penyakit salah satunya anemia (Wu *et al.*, 2004). Sedangkan mustard fosforamid bertanggung jawab memberikan efek alkilasi DNA dengan membentuk kation aziridium siklik (*ethyleneiminium*) melalui siklisasi intramolekuler yakni eliminasi klorida. Kation ini sangat tidak stabil dan mudah diserang oleh beberapa nukleofil, seperti residu guanin DNA untuk membentuk ikatan kovalen kedua dengan nukleofil lain sehingga mengganggu replikasi DNA dengan membentuk *intrastrand* dan *interstrand DNA crosslinks* (Emadi *et al.*, 2009). Terbentuknya *DNA crosslinks* dapat mencegah proses replikasi, transkripsi, dan penggunaan informasi oleh untai komplementer guna perbaikan sehingga menghambat metabolisme sel tubuh khususnya sel darah dan menimbulkan salah satunya anemia (Grillari *et al.*, 2007).

Namun, pada kelompok perlakuan ketiga dengan dosis ekstrak 400 mg/kgBB tidak memiliki perbedaan signifikan dengan kelompok normal karena jumlah eritrosit yang hampir sama. Kondisi ini diakibatkan oleh kandungan terpenoid dalam ekstrak daun kenitu. Terpenoid adalah zat antioksidan yang terkandung dalam tanaman dan terbentuk dari isoprena, oleh karena itu zat ini juga disebut isoprenoid. Terpenoid telah banyak digunakan dalam berbagai pengobatan diantaranya untuk obat nyeri, flu, bronkitis, dan penyakit gastrointestinal yang melibatkan ROS (Kohlert *et al.*, 2000).

Terpenoid sebagai antioksidan mampu mengikat ROS secara langsung dengan menyumbang atom hidrogen. Karena reaktivitas gugus hidroksilnya yang tinggi, ROS dibuat tidak aktif dengan menetralkan muatannya sehingga kerusakan oksidatif pada konstituen eritrosit dapat dicegah (Korkina dan Afanas'ev, 1997). Mekanisme lain yang mungkin dilakukan oleh terpenoid yakni melalui interaksi antar berbagai enzim antioksidan (Nijveldt *et al.*, 2001). Terpenoid menginduksi *electrophile responsive element* (EpRE) seperti NAD(P)H-*quinone oxidoreductase* dan *glutathione S-transferase* (GST) yang merupakan enzim pertahanan utama terhadap stres oksidatif (Lee-Hilz *et al.*, 2006).

Selain bekerja sebagai antioksidan, terpenoid dapat merangsang produksi eritropoietin (EPO). EPO merupakan hormon yang bertanggung jawab terhadap produksi eritrosit di sumsum tulang. Hormon ini secara umum disekresikan oleh ginjal ketika kadar oksigen dalam darah turun, dan sekitar 10%-15% EPO juga diproduksi oleh hepar. Terpenoid

dapat mempengaruhi produksi EPO melalui dua jalur yang berbeda yakni menstimulasi HIF-1R, dan mengurangi degradasi HIF-1R-OH. Secara umum, regulasi HIF sebagian besar bergantung pada tingkat mRNA HIF-1R. Kadar mRNA HIF-1R dapat diatur melalui tekanan retikulum endoplasma selama hipoksia atau iskemia (Zheng *et al.*, 2011). Kondisi ini menghambat kerja *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) dan merangsang sekresi EPO oleh kapiler peritubuler nefron (Vander *et al.*, 1994).

## Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak daun kenitu tidak berpengaruh terhadap jumlah eritrosit tikus wistar yang diinduksi *cyclophosphamide*. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek ekstrak etanol daun kenitu terhadap sel darah dengan jumlah sampel yang lebih ideal dan menggunakan *hematology analyzer*.

## Daftar Pustaka

- De Jonge, M. E., A. D. R. Huitema, S. Rodenhuis, dan J. H. Beijnen. 2005. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clinical Pharmacokinetics*. 44(11): 1135-1164.
- Emadi, A., R. J. Jones, dan R. A. Brodsky. 2009. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nature Review Clinical Oncology*. 6: 638-647.
- Faber, J., dan L. M. Fonseca. 2014. How sample size influences research outcomes. *Dental Press J. Orthod*. 19(4): 27-29.
- Goodall, A. 1910. The numbers, proportions, and characters of the red and white blood corpuscles in certain animals. *The Journal Of Pathology*. 14(2): 195-199.
- Grillari, J., H. Katinger, dan R. Voglauer. 2007. Contributions of DNA interstrand cross-links to aging of cells and organisms. *Nucleic Acid Res*. 35(22): 7566-7576.
- Katzung, B. G., S. B. Masters, dan A. J. Trevor. 2012. *Basic & Clinical Pharmacology*. 12<sup>th</sup> Edition. California: The McGraw-Hill Companies. Terjemahan oleh B. U. Pendit. 2013. *Farmakologi Dasar & Klinik*. Edisi 12. Jakarta: EGC.

- Kiswari, R. 2014. *Hematologi dan Tranfusi*. Jakarta: Erlangga.
- Kohlert, C., I. van Rensen, R. Marz, G. Schindler, E. U. Graefe, dan M. Veit. 2000. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans. *Planta Med.* 66: 495-505.
- Korkina, L. G., dan I. B. Afanas'ev. 1997. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv Pharmacol.* 38: 151-163.
- Lee-Hilz, Y. Y., A. M. J. F. Boerboom, A. H. Westphal, W. J. H. van Berkel, J. M. M. J. G. Aarts, dan I. M. C. M. Rietjens. 2006. Pro-oxidant activity of flavonoids induces EpRE-mediated gene expression. *Chem. Res. Toxicol.* 19: 1499-1505.
- Math, M. V., Y. R. Kattimani, R. M. Khadkikar, S. M. Patel, V. Santi, dan R. S. Inandar. 2016. Red blood cell count: brief history and new method. *MGM J Med Sci.* 3(3): 116-119.
- Nijveldt, R. J., E. van Nood, D. E. C. van Hoorn, P. G. Boelens, K. van Norren, dan P. A. M. van Leeuwen. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74: 418-425.
- Pandit, A., S. Kolhar, dan P. Patil. 2015. Survey on automatic rbc detection and counting. *International Journal of Advanced Research in Electrical, Electronics and Instrumentation Engineering.* 4(1): 128-131.
- Ranjan, R., R. K. Singh, dan Rigvardhan. 2016. Cost effectiveness and accuracy analysis of manual versus automated methods of estimation of basic haematological parameters in a resource poor setting. *Indian Journal of Basic and Applied Medical Research.* 5(4): 121-127.
- Simonds, J. P. 1925. The blood of normal mice. *The Anatomical Record.* 30(2): 99-106.
- Vander, A. J., J. H. Sherman, dan S. D. Luciano. 1994. *Human Physiology-Mechanism of Body Function*. Sixth Edition. Shenton: McGraw-Hillm.
- Wu, G., Y. Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton, dan N. D. Turner. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* 134: 489-492.
- Zheng, K. Y. Z., R. C. Y. Coy, A. W. H. Cheung, A. J. Y. Guo, C. W. C. Bi, K. Y. Zhu, Q. Fu, Y. Du, W. L. Zhang, J. Y. X. Zhan, R. Duan, D. T. W. Lau, T. T. X. Dong, dan K. W. K. Tsim. 2011. Flavonoids from *Radix astragali* induce the expression of erythropoietin in cultured cells: a signaling mediated via the accumulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Journal Of Agricultural And Food Chemistry.* 59: 1697-1704.