

## Ekstrak Kloroform Daun *Arcangelisia flava* Tidak Berpengaruh pada Berat Relatif Limfa Tikus yang Dipejani Doxorubicin (*Chloroform Extracts of Arcangelisia flava Leaves Has No Effect on the Relative Spleen Weight of Doxorubicin-Treated Rats*)

Rizqy Kiromin Baroroh, Endah Puspitasari, dan Evi Umayah Ulfa  
Fakultas Farmasi, Universitas Jember  
Jln. Kalimantan No. 37 Jember 68121  
e-mail korespondensi: e.puspitasari@unej.ac.id

### Abstract

*Doxorubicin is non selective cancer chemotherapy. It affects normal cells as well as cancer cells, resulting in immunosuppression. Natural remedies are expected to have immunomodulator activity. This study aimed to determine the effect of chloroform extracts of Arcangelisia flava leaves (CEAfL) on enhancing the immune system on doxorubicin-treated rats. Wistar male rats were divided into four groups (1) control group; (2) doxorubicin 7,5 mg/kgBW intraperitoneally, 2 times in 11 days (days 1 and 6); (3) doxorubicin + CEAfL 250 mg/kgBW/day orally for 11 days; (4) CEAfL 250 mg/kgBW/day orally for 11 days. Relative spleen weight was evaluated as the markers of immunomodulatory effect. Relative spleen weight remained after treatment of CEAfL on doxorubicin-treated rats. It can be concluded that CEAfL has no effect on the relative spleen weight of doxorubicin-treated rats.*

**Keywords:** *Arcangelisia flava*, chloroform extract, relative spleen weight

### Abstrak

Doxorubicin adalah agen kemoterapi kanker yang tidak selektif. Doxorubicin mempengaruhi sel-sel normal maupun sel kanker sehingga menyebabkan imunosupresi. Obat alami diharapkan memiliki aktivitas imunomodulator. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak kloroform daun *Arcangelisia flava* (EKDAf) pada peningkatan sistem imun tubuh tikus yang diinduksi doxorubicin. Tikus jantan galur Wistar dibagi menjadi empat kelompok (1) kelompok kontrol; (2) doxorubicin 7,5 mg/kgBB secara intraperitoneal, 2 kali dalam 11 hari (hari ke-1 dan 6); (3) doxorubicin + EKDAf 250 mg/kgBB/hari secara oral selama 11 hari; (4) EKDAf 250 mg/kgBB/hari secara oral selama 11 hari. Berat relatif limfa dievaluasi sebagai penanda efek imunomodulator. Berat relatif limfa tetap setelah perlakuan dari EKDAf pada tikus yang dipejani doxorubicin. Dapat disimpulkan bahwa EKDAf tidak mempengaruhi berat relatif limfa tikus yang diinduksi doxorubicin.

**Kata kunci:** *Arcangelisia flava*, ekstrak kloroform, berat relatif limfa

### Pendahuluan

Kemoterapi kanker merupakan pengobatan kanker dengan obat antikanker tunggal (agen kemoterapi kanker) atau kombinasi. Sebagai agen kemoterapi, doxorubicin berfungsi untuk pengobatan kanker sel darah putih (leukemia), payudara dan ovarium, tulang, dan sarkoma kaposi [1]. Doxorubicin menyebabkan apoptosis sel yang berproliferasi cepat seperti sel kanker. Akibat

penggunaan jangka panjang doxorubicin dapat menyebabkan ketoksikan pada jaringan, penekanan sistem imun (imunosupresi), serta peningkatan radikal bebas [2].

Sistem imun pasien kanker rendah akibat imunosupresi yang disebabkan oleh terlepasnya faktor imunosupresor dari sel kanker seperti TGF $\beta$ , IL-10 (interleukin-10), enzim, FasL atau TRAIL [3]. Salah satu indikator terjadinya imunosupresi yang disebabkan oleh doxorubicin adalah penurunan berat

limfa [4]. Penurunan berat limfa mengindikasikan penurunan jumlah limfosit karena limfa merupakan tempat penyimpanan sel limfosit [5]. Sel limfosit merupakan sel yang berperan dalam sistem imun [6]. Oleh karena itu, pasien kanker yang memperoleh terapi doxorubicin akan mengalami immunosupresi.

Imunosupresi pada pasien kanker dapat berakibat fatal karena pasien mudah terkena infeksi yang disebabkan oleh bakteri, virus, jamur atau parasit, memperpanjang masa pengobatan, dan meningkatkan kematian pasien [7]. Senyawa yang memiliki aktivitas immunomodulator diperlukan untuk mengurangi efek immunosupresi dan radikal bebas yang disebabkan doxorubicin. Beberapa senyawa tersebut tergolong dalam agen kemoprevensi kanker. Salah satu tumbuhan yang berpotensi sebagai salah satu agen kemoprevensi kanker adalah akar kuning (*Arcangelisia flava*) [8].

Ekstrak kloroform *A. flava* diketahui memiliki aktivitas antioksidan dan sitotoksik terhadap larva udang dan sel kanker payudara MFC-7 (adenokarsinoma payudara) yang lebih besar dibandingkan ekstrak petroleum eter dan airnya, maupun jika dibandingkan dengan ekstrak *Coscinium blumeinum* dan *Fibraurea tinctoria*. Aktivitas ini diduga disebabkan oleh adanya berberin di dalamnya [8]. Berberin (5,6-dihydro-9,10-dimethoxybenzo[*g*]-1,3-benzodioxolo[5,6*a*]quinolizinium) adalah alkaloid isokuinolon (yang digunakan sebagai antibiotik terhadap beberapa bakteri [9]. Berberin mempunyai aktivitas farmakologi yang luas di antaranya sebagai antihipertensi, antiinflamasi, antioksidan, antidepresan, antikanker, antiadiare, hepatoprotektif, dan antimikroba [10]. Berberin pada tumbuhan *Berberis aquifolium*, *Cissampelos pareira*, dan *Phellodendron chinense* telah terbukti mempunyai aktivitas immunomodulator [11].

Aktivitas ekstrak kloroform *A. flava* sebagai agen kemoprevensi telah diketahui, namun belum diketahui aktivitasnya jika dikombinasikan dengan doxorubicin. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh kombinasi ekstrak kloroform *A. flava* dan doxorubicin pada peningkatan sistem imun yang diwakili berat relatif limfa.

## Metode Penelitian

### Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tumbuhan *A. flava* yang diperoleh dari Taman Nasional Meru Betiri Kabupaten Jember, kloroform p.a. (PT. Smart Lab Indonesia), n-heksana teknis, doxorubicin (PT. Kalbe Farma), CMC Na, tween, dan akuades. Hewan uji yang digunakan yaitu tikus jantan putih galur Wistar usia 8-10 minggu dengan berat badan 110–160 gram. Sedangkan alat yang

digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, *rotary evaporator*, sonde, dan seperangkat alat bedah.

### Prosedur Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *post test only control group design*. Tahap pertama penelitian ini yaitu pembuatan ekstrak kloroform *A. flava*. Serbuk *A. flava* diekstraksi bertingkat secara maserasi dengan n-heksana dan kloroform. Serbuk *A. flava* sebanyak 500 gram direndam dengan 3 liter n-heksana selama 4 hari dan disaring. Ekstraksi dengan n-heksana diulang sebanyak 3 kali. Ampas dari maserasi ini dikeringkan dan direndam lagi dengan 3 liter kloroform selama 4 hari dan disaring. Ekstraksi dengan kloroform diulang sebanyak 4 kali. Setelah didapatkan ekstrak cair lalu dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* suhu 50°C hingga didapatkan ekstrak kental.

Tahap kedua dilakukan pengujian ekstrak kloroform *A. flava* pada hewan uji. Sejumlah 24 ekor tikus putih jantan galur Wistar ditempatkan dalam kandang dengan diberi makanan standar dan minum *ad libitum*. Setelah diadaptasikan, tikus dibagi dalam empat kelompok. Masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor yang terpilih secara acak, kemudian diberi perlakuan sehari sekali selama 11 hari untuk kelompok kontrol dan kelompok perlakuan serta hari ke-1 dan ke-6 untuk kelompok doxorubicin dengan prosedur sebagai berikut:

1. Kelompok 1 (Kontrol) : tikus hanya diberi Tween 0,5% dalam CMC Na 1% p.o setiap hari selama 11 hari
2. Kelompok 2 (Doxorubicin) : tikus hanya diberi doxorubicin 7,5 mg/kgBB i.p pada hari ke-1 dan ke-6
3. Kelompok 3 (Perlakuan 1) : tikus diberi ekstrak kloroform *A. flava* 250 mg/kgBB p.o setiap hari selama 11 hari dan doxorubicin 7,5 mg/kgBB i.p pada hari ke-1 dan ke-6
4. Kelompok 4 (Perlakuan 2) : tikus hanya diberi ekstrak kloroform *A. flava* 250 mg/kgBB p.o setiap hari selama 11 hari.

Berat badan tikus ditimbang setiap hari untuk menyesuaikan dosis yang diberikan. Seluruh tikus dikorbkan pada hari ke-12 dengan menggunakan cairan kloroform sebagai anestesi. Limfa diambil untuk dihitung berat relatifnya.

Perhitungan berat relatif limfa dilakukan dengan cara limfa yang diambil dibersihkan dari lemak, dicuci, dan ditimbang di atas cawan petri. Berat limfa dihitung berat relatifnya terhadap berat badan dengan rumus berikut :

$$\text{Berat relatif limfa} = \frac{\text{Berat limfa}}{\text{Berat tikus}} \times 100\%$$

Berat relatif limfa dianalisis dengan uji One Way Anova yang selanjutnya dilanjutkan dengan uji LSD ( $p < 0,05$ ).

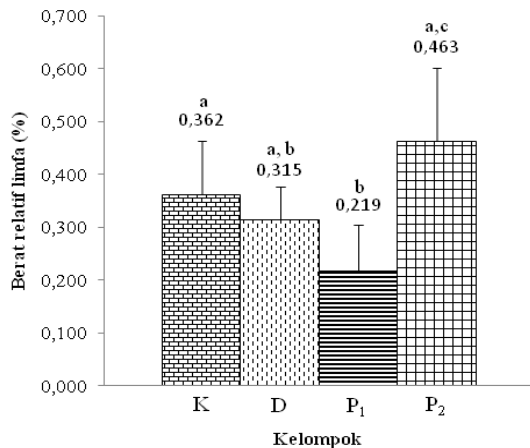
## Hasil Penelitian

### Pembuatan Ekstrak Kloroform *A. flava*

Pada pembuatan ekstrak kloroform *A. flava*, rendemen ekstrak kloroform *A. flava* yang diperoleh sebesar 4,75%.

### Berat Relatif Limfa

Berat relatif limfa erat kaitannya dengan jumlah limfosit karena limfa merupakan salah satu organ yang berfungsi sebagai tempat penyimpanan limfosit. Nilai berta relatif limfa rata-rata dapat dilihat pada Gambar 1. Berdasarkan uji statistik diketahui bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol (K) dan kelompok doxorubicin (D). Antara kelompok doxorubicin dengan ekstrak kloroform *A. flava* dosis 250 mg/kgBB + doxorubicin ( $P_1$ ) juga tidak ada perbedaan yang signifikan. Hasil ini menunjukkan bahwa kombinasi antara ekstrak kloroform *A. flava* dosis 250 mg/kgBB dengan doxorubicin tidak dapat meningkatkan berat relatif limfa hewan uji jika dibandingkan dengan perlakuan doxorubicin saja (D). Nilai berat relatif limfa antara kelompok ekstrak *A. flava* dosis 250 mg/kgBB ( $P_2$ ) dan K sama dimana kedua kelompok tidak berbeda signifikan. Perbedaan yang tidak signifikan antara kelompok  $P_2$  dan K menunjukkan bahwa ekstrak kloroform *A. flava* dosis 250 mg/kgBB tidak mempengaruhi kondisi fisiologis normal.



Gambar 1 Data berat relatif limfa (Data yang disajikan berupa nilai rata-rata (%)  $\pm$  SD. Perbedaan notasi huruf menunjukkan perbedaan yang signifikan,  $p < 0,05$ )

## Pembahasan

Doxorubicin merupakan antibiotik antrasiklin yang banyak digunakan untuk mengobati penyakit kanker [1]. Penggunaan dalam jangka panjang dapat menyebabkan pelemahan sistem imun (imunopresi) [2]. Doxorubicin berefek pada sistem imun dengan cara mengurangi berat relatif limfa. Pemberian doxorubicin dosis 20 mg/kgBB secara intravena menyebabkan penurunan berat limfa pada hari ketiga [4].

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penurunan berat relatif limfa kelompok doxorubicin tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian doxorubicin dosis 7,5 mg/kgBB pada hari ke-1 dan ke-6 perlakuan kurang mampu menurunkan berat relatif limfa. Mekanisme yang menyebabkan tidak adanya perbedaan berat relatif limfa yang signifikan antara kelompok doxorubicin dan kontrol diduga karena limfa hewan uji mengalami regenerasi sel. Hal ini diperkuat dengan penelitian sebelumnya, yaitu 4 hari setelah pemberian doxorubicin dihentikan, secara histologi tidak ada kematian sel atau kerusakan jaringan limfa. Regenerasi sel terjadi karena adanya protein p53 pada sel limfa yang berfungsi ketika terjadi kerusakan sel limfa akibat pemberian doxorubicin. Protein p53 ini akan mengaktifkan protein p21 untuk mencegah kerusakan jaringan yang parah dengan cara menginduksi siklus sel *arrest*. Saat siklus sel *arrest*, terjadi perbaikan DNA yang rusak akibat pemberian doxorubicin [13]. Doxorubicin merusak DNA melalui aktivasi jalur caspase dimana aktivnya caspase 3 menyebabkan kerusakan DNA [1].

Berat relatif limfa kelompok  $P_1$  (ekstrak kloroform *A. flava* dosis 250 mg/kgBB + doxorubicin) terjadi penurunan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol namun tidak berbeda signifikan jika dibandingkan dengan kelompok doxorubicin. Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi antara ekstrak kloroform *A. flava* dosis 250 mg/kgBB dan doxorubicin tidak berpengaruh pada penurunan berat relatif limfa jika dibandingkan dengan pemberian doxorubicin saja.

Berat relatif limfa kelompok  $P_2$  (ekstrak *A. flava* dosis 250 mg/kgBB) tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol. Artinya ekstrak kloroform *A. flava* tidak memberikan efek pada kondisi fisiologis normal. Jadi, pemberian ekstrak kloroform

*A. flava* tidak menyebabkan toksisitas pada hewan sehat.

### Simpulan dan Saran

Ekstrak kloroform *A. flava* tidak mempengaruhi berat relatif limfa tikus jantan putih gaker Wistar yang dipejani doxorubicin. Dalam penelitian ini disarankan isolasi zat aktif yang selanjutnya dikombinasikan dengan doxorubicin dan dilihat pengaruhnya terhadap berat relatif limfa.

### Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dirlitabmas DIKTI yang telah mendanai penelitian ini.

### Daftar Pustaka

- [1] Chids AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, Phillips T, and Leeuwenburgh C. Doxorubicin treatment *in vivo* causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax Ratio. *Cancer Res.* 2002. 62: 4592-4598
- [2] Wattanapitayakul SK, Chularojmontri L, Herunsalee A, Niumsukul S, Charuchongkolwongse S, and Bauer JA. Screening of antioxidants from medicinal plants for cardioprotective effect against doxorubicin toxicity. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 2005. 96: 80-87.
- [3] Whiteside TL. Immune suppression in cancer: Effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. *Seminars in Cancer Biology.* 2006. 16: 3-15.
- [4] Bally MB, Nayar R, Masin D, Cullis PR, and Mayer, LD. Studies on the myelosuppressive activity of doxorubicin entrapped in liposomes. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1990. 27: 13-19.
- [5] De Porto APNA, Lammers AJJ, Bennink RJ, ten Berge IJM, Spreelman P, and Hoekstra JBL. Assesment of splenic function. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010. 29: 1465-1473.
- [6] Raven PH. and Johnson GB. *Biology.* 6th ed. Boston: McGraw-Hill; 2002.
- [7] Cancer Research UK. [Internet]. London: Cancer Research UK; 2013. [cited 15 May 2014] Available from: <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-help/about-cancer/what-is-cancer/body/the-immune-system>.
- [8] Keawpradub N, Dej-adisai A, and Yuenyongsawad S. Antioxidant and cytotoxic activities of thai medicinal plants named khaminkhrua: *Arcangelisia flava*, *Coscinium blumeianum* and *Fibraurea tinctoria*. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 2005. 27(2): 455- 467.
- [9] Yu FS, Yang JS, Lin HJ, Yu CS, Tan TW, Lin YT, Lin CC, Lu HF, and Chung JG. Berberine inhibits WEHI-3 leukemia cells *in vivo*. *in vivo.* 2007. 21: 407-412.
- [10] Signh A, Duggal S, Kaur N, and Signh J. Berberine: alkaloid with wide spectrum of pharmacological activities. *Journal of Natural Products.* 2010. 3: 64-75.
- [11] Dutt R, Brijesh N, and Nishteswar K. Potentialities of berberine containing medicinal plants-A Review. *IJPRR.* 2014. 4(2): 120-126.
- [13] Herfindal L, Myhren L, Gjersen BT, Døskeland SV, and Gausdal G. Functional p53 is required for rapid restoration of daunorubicin-induced lesions of the spleen. *BMC Cancer.* 2013. 13: 341-346.