



**AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN KENITU  
(*Chrysophyllum cainito* L.) TERHADAP JUMLAH ERITROSIT  
TIKUS WISTAR YANG DIINDUKSI *CYCLOPHOSPHAMIDE***

**SKRIPSI**

Oleh:

**Heri Puguh Widodo**

**NIM 142010101020**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**2018**



**AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN KENITU  
(*Chrysophyllum cainito* L.) TERHADAP JUMLAH ERITROSIT  
TIKUS WISTAR YANG DIINDUKSI *CYCLOPHOSPHAMIDE***

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan di Fakultas Kedokteran (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh:

**Heri Puguh Widodo**

**NIM 142010101020**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**2018**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT atas segala pertolongan yang telah diberikan dalam setiap langkah yang saya tempuh;
2. Nabi Muhammad SAW sebagai suri tauladan;
3. Kedua orangtua tercinta, Tolib dan Siti Aisyah yang selalu memberikan doa, dukungan, dan pengorbanan yang tak terhingga;
4. Guru-guru saya yang telah memberikan ilmu dan mendidik saya dengan penuh kesabaran untuk menjadikan saya sebagai manusia yang berilmu dan bermanfaat;
5. Keluarga besar angkatan 2014 Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
6. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas seluruh kesempatan menimba ilmu yang berharga ini.

**MOTTO**

Dan (ingatlah juga), tatkala Tuhanmu memaklumkan; “Sesungguhnya jika kamu bersyukur, pasti Kami akan menambah (nikmat) kepadamu, dan jika kamu mengingkari (nikmat-Ku), maka sesungguhnya azab-Ku sangat pedih (terjemahan Surat Ibrahim ayat 7)\*.”

---

\*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2006. Al-Qur'an dan Terjemahannya. CV. Pustaka Agung Harapan

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Heri Puguh Widodo

NIM : 142010101020

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah saya yang berjudul “Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) terhadap Jumlah Eritrosit Tikus Wistar yang Diinduksi *Cyclophosphamide*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata pernyataan ini tidak benar.

Jember, 05 April 2018

Yang menyatakan,

Heri Puguh Widodo

NIM 142010101020

**SKRIPSI**

**AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN KENITU  
(*Chrysophyllum cainito* L.) TERHADAP JUMLAH ERITROSIT  
TIKUS WISTAR YANG DIINDUKSI *CYCLOPHOSPHAMIDE***

Oleh

Heri Puguh Widodo

NIM 142010101020

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : dr. Ika Rahmawati Sutejo M.Biotech

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Rini Riyanti, Sp.PK

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) terhadap Jumlah Eritrosit Tikus Wistar yang Diinduksi *Cyclophosphamide*” karya Heri Puguh Widodo telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Kamis, 05 April 2018

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

**Tim Penguji**

Ketua,

dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si  
NIP 19840916 200801 2 003

Anggota II,

dr. Ika Rahmawati Sutejo, M.Biotech  
NIP 19840819 200912 2 003

Anggota I,

dr. Rena Normasari, M.Biomed  
NIP 19830512 200812 2 002

Anggota III,

dr. Rini Riyanti, Sp.PK  
NIP 19720328 199903 2 001

Mengesahkan  
Dekan,

dr. Enny Suswati, M.Kes.  
NIP 197002141999032001

## RINGKASAN

**Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) terhadap Jumlah Eritrosit Tikus Wistar yang Diinduksi *Cyclophosphamide***; Heri Puguh Widodo, 142010101020; 2018: 77 halaman; Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Kanker payudara merupakan penyebab kematian utama wanita di berbagai 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. Tingkat kejadian kanker payudara berkisar 19,4 per 100.000 orang di Afrika Timur hingga 89,7 per 100.000 orang di Eropa Barat. Kemoterapi sebagai pengobatan adjuvan atau neoadjuvan pada kanker payudara sangat efektif ketika berbagai kombinasi obat digunakan. Salah satu obat kemo 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. Anemia dalam hal ini muncul sebagai akibat dari aktivitas metabolit *cyclophosphamide* yakni akrolein dan mustard fosforamid. Akrolein bertanggung jawab dalam penurunan kadar glutathion seluler melalui konjugasi dan memicu berbagai stres oksidatif dan inaktivasi protein penting yang diperlukan dalam sintesis DNA, sedangkan mustard fosforamid berperan dalam alkilasi DNA sel, dalam hal ini sel punca hemopoietik sehingga terjadi kematian sel.

Pemberian antioksidan dapat mencegah kematian sel punca hemopoietik akibat induksi *cyclophosphamide* karena dapat meningkatkan jumlah sel induk hematopoietik dan sel progenitor dengan mekanisme yang berbeda-beda. Salah satu tanaman yang kaya akan kandungan antioksidan yakni daun tanaman *Chrysophyllum cainito* L. atau lebih dikenal dengan kenitu. Daun kenitu diketahui kaya dengan kandungan terpenoid yang selain berperan sebagai antioksidan juga mampu memicu sekresi eritropoietin (EPO). Tujuan penelitian ini adalah untuk

mengetahui aktivitas pemberian ekstrak etanol daun kenitu terhadap jumlah eritrosit tikus yang diinduksi *cyclophosphamide* secara *in vivo*.

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental semu (*quasi experimental*) dengan rancangan *the randomized post test only control group design*. Randomisasi dilakukan dengan cara *stratified random sampling* dengan sampel penelitian ini adalah tikus putih jantan galur wistar. Jumlah sampel penelitian sebanyak 20 ekor yang dibagi menjadi lima kelompok. Kelompok pertama merupakan kelompok normal, kelompok kedua merupakan kelompok kontrol negatif yang diinduksi *cyclophosphamide* dengan dosis 50 mg/kgBB, dan kelompok perlakuan 1 sampai 3 diberikan ekstrak daun kenitu dengan urutan dosis 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB pada hari ke 8. Kemudian pada hari ke 15 diberikan *cyclophosphamide* secara intraperitoneal dengan dosis 50 mg/kgBB sebanyak satu kali pemberian dan pada hari ke 19 dilakukan pengambilan sampel darah beserta pemeriksaan jumlah eritrosit.

Data yang diambil berupa perhitungan jumlah eritrosit. Hasil rata-rata jumlah eritrosit pada kelompok normal sebesar  $7,068 \pm 1,792 \times 10^6/\text{mm}^3$  dan kontrol negatif 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 sebesar  $4,423 \pm 1,271 \times 10^6/\text{mm}^3$ , dosis 200 mg/kgBB sebesar  $2,899 \pm 1,618 \times 10^6/\text{mm}^3$ , dan dosis 400 mg/kgBB sebesar  $6,069 \pm 1,743 \times 10^6/\text{mm}^3$ .

Hasil rata-rata hitung eritrosit dianalisis dengan metode *One Way Anova* dengan nilai signifikansi 0,015 ( $p < 0,05$ ). Namun apabila dibandingkan antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol negatif tidak diperoleh perbedaan yang signifikan. Hal ini dapat diakibatkan oleh dua faktor yakni tingkat ketelitian yang kurang saat proses perhitungan, dan jumlah zat aktif yang berperan sebagai prooksidan lebih banyak daripada yang bekerja sebagai antioksidan. Jadi, kesimpulan yang diperoleh dalam penelitian ini yaitu tidak terdapat pengaruh aktivitas ekstrak etanol daun kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) terhadap jumlah eritrosit tikus wistar yang diinduksi *cyclophosphamide*.

## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul ” Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) terhadap Jumlah Eritrosit Tikus Wistar yang Diinduksi *Cyclophosphamide*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. dr. Enny Suswati, M.Kes. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. dr. Ika Rahmawati Sutejo, M.Biotech selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Rini Riyanti, Sp.PK selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan tenaga dalam proses penyusunan skripsi ini;
3. dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si selaku penguji I dan dr. Rena Normasari, M.Biomed selaku penguji II;
4. Orang tua dan saudara saya tercinta yang selalu memberikan kasih sayang dan do'a tiada henti;
5. Temanku BJ Azmy, Zulfahmi, dan Prajesiaji Praba yang telah mendukung dan memberi motivasi;
6. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
7. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 05 April 2018

Penulis

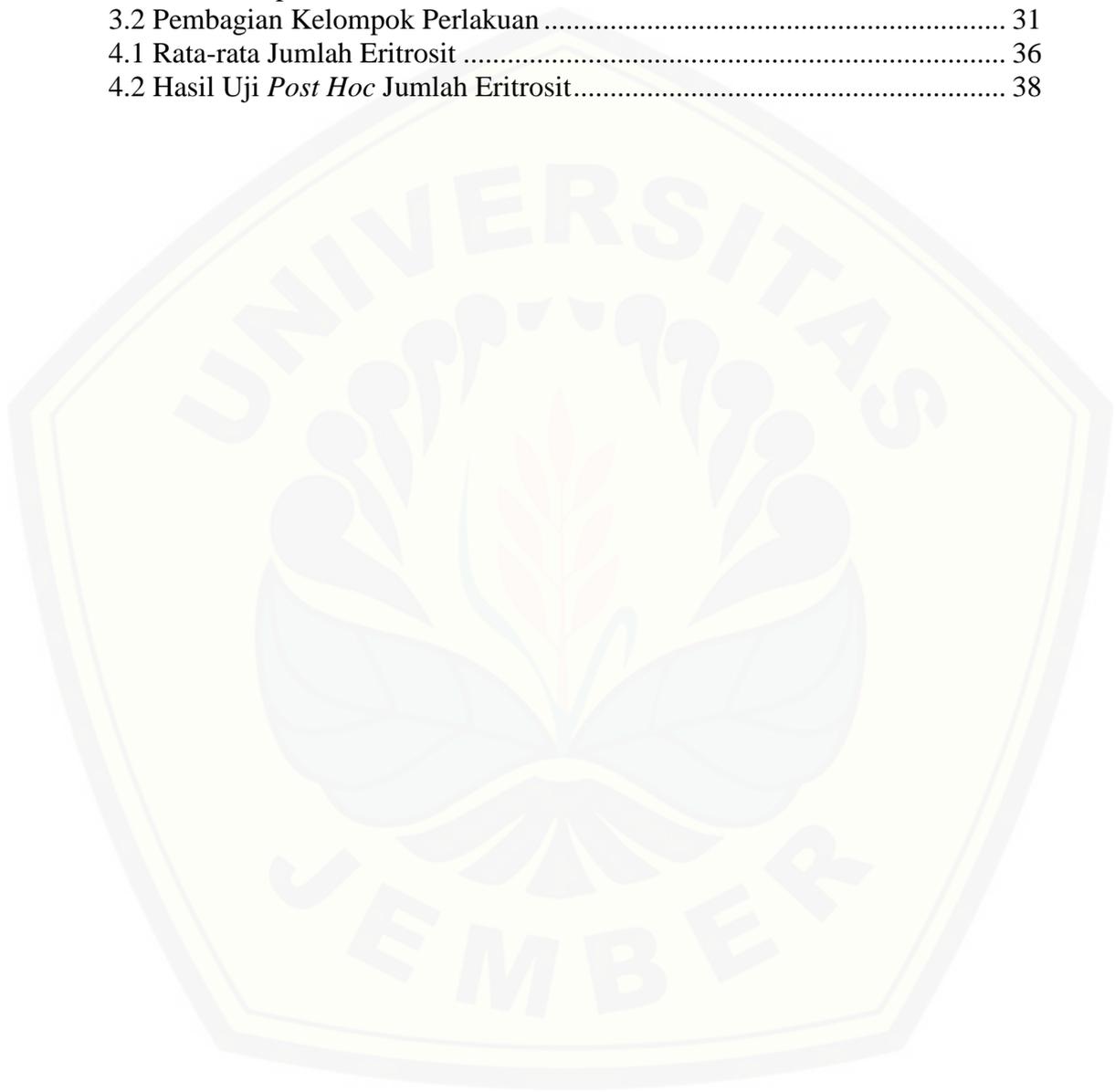
DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	v
<b>HALAMAN LEMBAR BIMBINGAN</b> .....	vi
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>PRAKATA</b> .....	x
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiv
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	3
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	3
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
<b>2.1 Kanker Payudara</b> .....	4
<b>2.2 Cyclophosphamide</b> .....	5
2.2.1 Definisi .....	5
2.2.2 Efek Samping .....	8
<b>2.3 Anemia Akibat Cyclophosphamide</b> .....	9
<b>2.4 Eritrosit</b> .....	11
2.4.1 Definisi .....	11
2.4.2 Pembentukan Sel Darah .....	12
2.4.3 Tahap Diferensiasi Sel Darah Merah .....	13
<b>2.5 Hitung Eritrosit</b> .....	14
<b>2.6 Tanaman Kenitu (<i>Chrysophyllum cainito</i> L.)</b> .....	14
2.6.1 Definisi .....	14
2.6.2 Taksonomi .....	16
2.6.3 Manfaat dan Kandungan Daun Kenitu .....	16
<b>2.7 Radikal bebas</b> .....	17
2.7.1 Konsep Stres Oksidatif .....	18
2.7.2 Kerusakan Oksidatif terhadap Protein dan DNA .....	19
<b>2.8 Antioksidan</b> .....	20
2.8.1 Terpenoid .....	23
<b>2.9 Kerangka Konsep</b> .....	24
<b>2.10 Hipotesis</b> .....	25
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	26
<b>3.1 Jenis Penelitian</b> .....	26

<b>3.2 Rancangan Penelitian</b> .....	26
<b>3.3 Sampel</b> .....	27
3.3.1 Sampel .....	27
3.3.2 Besar Sampel .....	27
<b>3.4 Tempat dan Waktu Penelitian</b> .....	28
<b>3.5 Variabel Penelitian</b> .....	28
3.5.1 Variabel Bebas.....	28
3.5.2 Variabel Terikat.....	28
<b>3.6 Definisi Operasional</b> .....	28
<b>3.7 Alat dan Bahan</b> .....	30
3.7.1 Alat .....	30
3.7.2 Bahan .....	30
<b>3.8 Prosedur Penelitian</b> .....	31
3.8.1 Pemilihan Sampel Tikus Wistar .....	31
3.8.2 Persiapan Sampel Tikus Wistar.....	31
3.8.3 Pembagian Kelompok Perlakuan.....	31
3.8.4 Pembuatan Ekstrak Daun Kenitu.....	32
3.8.5 Penginduksian <i>Cyclophosphamide</i> .....	32
3.8.6 Pengambilan Sampel Darah.....	32
3.8.7 Pengukuran Hitung Eritrosit.....	32
<b>3.9 Analisis Data</b> .....	34
<b>3.10 Uji Kelayakan Etik</b> .....	34
<b>3.11 Alur Penelitian</b> .....	34
3.11.1 Skema Pembuatan Ekstrak Daun Kenitu .....	34
3.11.2 Skema Perlakuan Hewan Coba .....	35
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	36
4.1 Hasil Penelitian .....	36
4.2 Analisis Data.....	37
4.3 Pembahasan.....	38
<b>BAB 5. PENUTUP</b> .....	42
5.1 Kesimpulan .....	42
5.2 Saran .....	42
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	43
<b>LAMPIRAN</b> .....	50

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
2.1 Nilai Fitokimia Daun Kenitu.....	17
3.1 Definisi Operasional.....	29
3.2 Pembagian Kelompok Perlakuan .....	31
4.1 Rata-rata Jumlah Eritrosit .....	36
4.2 Hasil Uji <i>Post Hoc</i> Jumlah Eritrosit.....	38



**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1 Metabolisme <i>Cyclophosphamide</i> .....	6
2.2 Metabolisme Nitrogen Mustard .....	7
2.3 Penampakan Eritrosit dalam Kamar Hitung .....	11
2.4 <i>Pluripotent Hematopoietic Stem Cells</i> .....	12
2.5 Pembentukan dan Karakteristik Eritrosit dalam Berbagai Anemia .....	13
2.6 Penampakan Tanaman Kenitu.....	15
2.7 Ringkasan Jenis dan Sumber Radikal Bebas .....	21
2.8 Reaksi Langsung Vitamin dengan Radial Bebas .....	22
2.9 Kerangka Konsep Penelitian .....	24
3.1 Sistematika Rancangan Penelitian .....	26
3.2 Kamar Hitung <i>Improved Neubauer</i> dan Sistematika Penghitungan .....	33
3.3 Skema Pembuatan Ekstrak Daun Kenitu .....	34
3.4 Skema Perlakuan Hewan Coba .....	35
4.1 Histogram Jumlah Eritrosit .....	36

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

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. Diperkirakan akan terjadi peningkatan hingga mencapai 22 juta kasus baru dalam dua decade (Ferlay *et al.*, 2015). Salah satu kanker paling umum yakni kanker payudara dengan tingkat insiden yang tinggi di semua negara (Clegg *et al.*, 2009). 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% (Ferlay *et al.*, 2015). Tingkat kejadian kanker payudara berkisar 19,4 per 100.000 orang di Afrika Timur hingga 89,7 per 100.000 orang di Eropa Barat (WHO, 2015).

Pada kebanyakan kasus kanker payudara, kemoterapi dapat digunakan sebagai pengobatan adjuvan atau neoadjuvan yang sangat efektif ketika berbagai kombinasi obat digunakan. Salah satu obat kemo yang sering digunakan yaitu *cyclophosphamide* (American Cancer Society, 2017). *Cyclophosphamide* adalah salah satu agen antikanker paling sukses yang pernah disintesis. Hingga hari ini setelah 50 tahun penemuannya, *cyclophosphamide* masih banyak digunakan sebagai agen kemoterapi. *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 sehingga terjadi depleksi masif sel hemopoietik, salah satunya ditandai dengan penurunan jumlah eritrosit yang berujung anemia (Emadi *et al.*, 2009). Oleh karena itu, instrumen penelitian yang digunakan ialah hitung eritrosit sehingga depleksi masif sel hemopoietik dapat dibuktikan.

Anemia sebagai akibat penurunan jumlah eritrosit dapat memberikan berbagai gejala diantaranya sesak napas saat beraktivitas maupun istirahat, *fatigue*, dan tanda hiperdinamik (denyut nadi kuat, jantung berdebar, dan *roaring*

*in the ears*). Pada anemia yang lebih berat, dapat timbul letargi, *confusion*, dan komplikasi yang mengancam jiwa (gagal jantung, angina, aritmia dan/atau infark miokard) (Oehadian, 2012). Anemia dalam hal ini muncul sebagai akibat dari aktivitas metabolit *cyclophosphamide* yakni akrolein dan mustard fosforamid. Akrolein bertanggung jawab dalam penurunan kadar glutathion seluler melalui konjugasi (de Jonge *et al.*, 2005). Berkurangnya kadar glutathion dapat memicu berbagai stres oksidatif dan inaktivasi protein penting yang diperlukan dalam sintesis DNA, transkripsi RNA, serta menjaga keutuhan membran sel (Wu *et al.*, 2004). Sedangkan mustard fosforamid berperan dalam alkilasi DNA sel, khususnya sel punca hemopoietik. Hal ini diakibatkan oleh mustard fosforamid yang dalam kondisi fisiologi mengalami eliminasi klorida untuk membentuk kation tidak stabil yang disebut aziridium siklik. Karena muatannya yang tidak stabil, kation ini mudah diserang oleh beberapa nukleofil seperti residu guanin DNA sehingga terjadi DNA *crosslinks* dan memicu kematian sel (Emadi *et al.*, 2009; Grillari *et al.*, 2007).

Menurut Suryavanshi *et al.* (2015), antioksidan mampu meningkatkan jumlah sel induk hemopoietik dan sel progenitor dengan mekanisme yang berbeda-beda. Salah satu tanaman yang kaya dengan kandungan antioksidan yakni *Chrysophyllum cainito* L. atau yang biasa disebut kenitu oleh masyarakat Indonesia. Bagian-bagian kenitu mengandung berbagai polifenol antioksidan seperti daunnya mengandung alkaloid, flavonoid, fenol, dan sterol. 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  $1,000\%$  (Shailajan dan Gurjar, 2016).

Hingga saat ini telah banyak dilakukan penelitian terhadap daun *Chrysophyllum cainito* L. diantaranya digunakan sebagai terapi penyembuhan luka (Shailajan dan Gurjar, 2016), sebagai antiinflamasi dan antihipersensitif (Meira *et al.*, 2014), sebagai terapi untuk mengurangi nyeri kronik (Meira *et al.*, 2016), serta pengukuran fungsi makrofag untuk mengetahui efek imunosupresi (Arana-Argáez *et al.*, 2017). Sejauh ini belum ada penelitian tentang efek

pemberian ekstrak daun kenitu terhadap hitung eritrosit pada tikus wistar jantan yang diinduksi *cyclophosphamide*. Fraksi terpenoid yang terdapat dalam daun kenitu memiliki berbagai kegunaan yakni sebagai zat mieloproteksi dan memicu sekresi eritropoietin. Oleh sebab itu, peneliti akan menguji aktivitas ekstrak daun kenitu terhadap jumlah eritrosit tikus wistar yang diinduksi *cyclophosphamide*.

### **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang tersebut, rumusan masalah yang diangkat yakni apakah terdapat aktivitas ekstrak etanol daun kenitu terhadap jumlah eritrosit tikus wistar yang diinduksi *cyclophosphamide*?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol daun kenitu terhadap jumlah eritrosit tikus wistar yang diinduksi *cyclophosphamide*.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat antara lain:

- a. Bagi peneliti, penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan tentang aktivitas ekstrak etanol daun kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) terhadap jumlah eritrosit tikus wistar yang diinduksi *cyclophosphamide*.
- b. Bagi institusi pendidikan, penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber informasi mengenai aktivitas ekstrak etanol daun kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) terhadap jumlah eritrosit tikus wistar yang diinduksi *cyclophosphamide* sebagai landasan untuk penelitian selanjutnya terkait efek daun kenitu.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kanker Payudara

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. Diperkirakan akan terjadi peningkatan hingga mencapai 22 juta kasus baru dalam dua dekade (Ferlay *et al.*, 2015). Salah satu kanker paling umum yakni kanker payudara dengan tingkat insiden yang tinggi di semua negara (Clegg *et al.*, 2009). 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% (Ferlay *et al.*, 2015). Tingkat kejadian kanker payudara berkisar 19,4 per 100.000 orang di Afrika Timur hingga 89,7 per 100.000 orang di Eropa Barat (WHO, 2015).

Masalah kanker payudara dinilai penting mengingat angka kejadiannya yang meningkat tiap tahunnya. Kanker payudara merupakan penyebab kematian utama wanita di berbagai negara (Fitzmaurice *et al.*, 2015). Kanker payudara dapat diakibatkan oleh gaya hidup yang tidak sehat (Chlebowski, 2013). Sebanyak 50% kasus terjadi di negara berkembang dengan angka kematian mencapai 38%. Salah satu faktor risiko kanker payudara yakni lamanya masa kesuburan dalam artian rentang *menarche* hingga menopause sangat lama, penggunaan hormon untuk mencegah kehamilan dan tidak memiliki anak. Obesitas setelah menopause, penggunaan terapi penggantian hormon, kurangnya aktivitas fisik, dan konsumsi alkohol juga dilaporkan sebagai faktor risiko. Sebaliknya, wanita yang memiliki anak dan memberikan ASI yang dihasilkan sendiri dapat bertindak sebagai usaha pencegahan kanker payudara (Torre *et al.*, 2015). Pada 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* (American Cancer Society, 2017).

## 2.2 Cyclophosphamide (Cyc)

### 2.2.1 Definisi

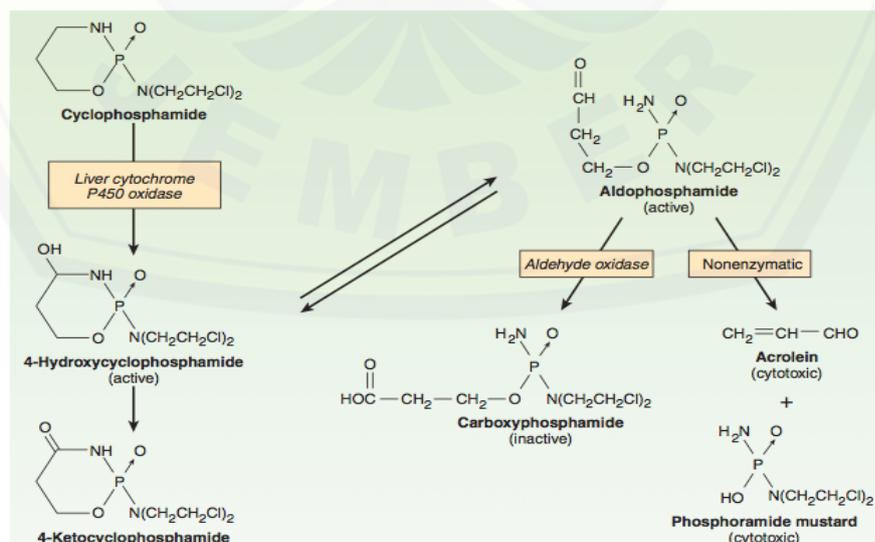
*Cyclophosphamide* adalah salah satu obat antitumor golongan alkilator yang paling luas digunakan untuk mengobati pasien dengan keganasan tingkat lanjut atau berisiko tinggi. Obat ini dapat diberikan secara oral maupun parenteral dengan rentang dosis yang lebar. Penentuan dosis, waktu, dan rute pemberian didasarkan pada kelainan yang mendasarinya. Pengaturan dosis *cyc* untuk terapi keganasan dapat bervariasi mulai dari 2-6 mg/kgBB (dosis rendah) sampai >6000 mg/m<sup>2</sup> luas permukaan tubuh (dosis tinggi). *Cyclophosphamide* umumnya diberikan dalam pengobatan limfoma ganas, leukemia, neuroblastoma, retinoblastoma dan karsinoma ovarium, payudara, endometrium serta paru-paru (de Jonge *et al.*, 2005).

*Cyclophosphamide* adalah salah satu agen antikanker paling sukses yang pernah disintesis. Hingga hari ini setelah 50 tahun penemuannya, *cyclophosphamide* masih banyak digunakan sebagai agen kemoterapi. *Cyclophosphamide* merupakan molekul yang paling efektif diantara 1.000 senyawa yang dipilih dan antibiotik yang diuji terhadap 33 tumor. Meskipun obat ini efektif sebagai terapi tunggal keganasan, namun dalam pelaksanaannya lebih sering dikombinasi dengan agen kemoterapi yang lain seperti *doxorubicin*, dan *fluorouracil* (Emadi *et al.*, 2009).

*Cyclophosphamide* seringkali digunakan untuk terapi kanker payudara derajat IIA, IIB, dan IIIA. Pada kondisi seperti ini regimen kemoterapi yang sering digunakan yakni TAC (*Taxotere*, *Adriamycin*, *Cyclophosphamide*), ACP (*Adriamycin*, *Cyclophosphamide*, *Paclitaxel*), AC (*Adriamycin*, *Cyclophosphamide*), dan TC (*Taxotere*, *Cyclophosphamide*) (Sparano, 2017). *Cyclophosphamide* yang diberikan secara oral umumnya memiliki *range* dosis 100-200 mg/hari. Pada dosis ini, *cyc* berperan sebagai imunosupresan untuk mencegah reaksi penolakan setelah cangkok organ selain untuk pengobatan beberapa gangguan autoimun kronis seperti *rheumatoid arthritis*, penyakit autoimun pada kulit, *multiple sclerosis*, vaskulitis sistemik, dan lupus eritematosus sistemik (de Jonge *et al.*, 2005).

*Cyclophosphamide* yang diberikan secara per oral dapat diserap dengan baik dan mencapai konsentrasi puncak setelah 1 jam pemberian dengan bioavailabilitas 85-100%. Beberapa penelitian telah membandingkan di bawah kurva konsentrasi-waktu (AVC) untuk *cyc* yang diberikan per oral (PO) dengan intravena (IV) dan diketahui rasio  $AVC_{PO}:AVC_{IV}$  berkisar antara 0,87 sampai 0,96. Sekitar 20% *cyc* berikatan dengan protein tanpa bergantung pada perubahan dosis sedangkan metabolitnya terikat lebih kuat tapi tidak lebih dari 67%. Obat ini didistribusikan dengan volume distribusi (Vd) mendekati jumlah total air dalam tubuh yakni 30-50 liter (Moore, 1991; de Jonge *et al.*, 2005).

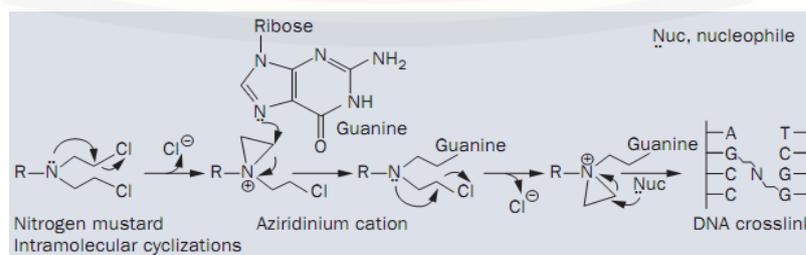
Dalam bentuk induknya, obat ini inaktif dan harus diaktifkan kembali menjadi bentuk sitotoksik oleh enzim mikrosom (CYP-450) di hepar seperti Gambar 2.1. Selain itu, berbagai isoenzim CYP juga terlibat dalam bioaktivasi *cyclophosphamide* pada manusia, termasuk CYP2A6, 2B6, 3A4, 3A5, 2C9, 2C18, dan 2C19, dengan 2B6 yang menunjukkan aktivitas 4-hidroksilase tertinggi. Setelah melalui *first pass* metabolisme di hati *cyc* akan berikatan dengan sitokrom P450 mengubah *cyc* menjadi *4-hydroxycyclophosphamide*, yang berada dalam keseimbangan dengan aldofosfamid. Metabolit-metabolit aktif ini dialirkan ke jaringan tumor dan jaringan normal, dan terjadi penguraian enzimatik aldofosfamid menjadi bentuk-bentuk sitotoksik-fosforamid mustard dan akrolein. (de Jonge *et al.*, 2005; Katzung *et al.*, 2012).



Gambar 2.1 Metabolisme *cyclophosphamide* (Sumber: Katzung *et al.*, 2012)

*4-Hydroxycyclophosphamide* mudah berdifusi ke dalam sel dan tidak bersifat sitotoksik. Zat ini sangat tidak stabil dan mudah diuraikan menjadi mustard fosforamid dan akrolein oleh  $\beta$ -akrolein. Konversi ini sebagian dapat dikatalisis oleh albumin atau protein lainnya. Karena *4-hydroxycyclophosphamide* mudah berdifusi ke dalam sel, senyawa ini berperan sebagai molekul transportasi yang mengantarkan mustard fosforamid ke dalam sel. Konsentrasi sistemik *4-hydroxy-cyclophosphamide* dapat mencerminkan keadaan pengaktifan *cyc* secara intraselular (de Jonge *et al.*, 2005).

Mustard fosforamid adalah agen alkilasi DNA bifungsional dan dianggap sebagai metabolit utama yang bertanggung jawab untuk efek alkilasi *cyclophosphamide*. Namun, mustard fosforamid yang bersirkulasi dalam darah tidak berkontribusi terhadap sitotoksitas karena sebagian besar terionisasi pada pH fisiologis dan tidak dapat masuk ke sel. Dengan kata lain, hanya fraksi mustard fosforamid yang terbentuk intraselular yang dianggap sitotoksik (de Jonge *et al.*, 2005). Mustard fosforamid dalam sel dapat mengikat DNA secara kovalen dan protein melalui reaktivitas kelompok *2-chloroethyl* yang terikat. Dalam kondisi fisiologis, nitrogen mustard mengalami siklus intramolekuler melalui eliminasi klorida untuk membentuk kation aziridinium siklik (*ethyleneiminium*). Kation ini sangat tidak stabil dan mudah diserang pada salah satu atom karbon oleh beberapa nukleofil, seperti residu DNA guanin. Reaksi ini melepaskan nitrogen dari agen alkilasi dan membuatnya tersedia untuk bereaksi dengan kedua rantai 2-kloroetil dan membentuk ikatan kovalen. Hal ini dapat mengganggu replikasi DNA dengan membentuk *intrastrand* dan *interstrand* DNA *cross-links* (Gambar 2.2) yang akhirnya mengakibatkan kerusakan DNA pada sel normal terutama sel punca hematopoietik (Emadi *et al.*, 2009).



Gambar 2.2 Metabolisme Nitrogen Mustard (Sumber: Emadi *et al.*, 2009)

Akrolein, yang dibentuk dari degradasi *4-hydroxycyclophosphamide* adalah aldehid yang sangat reaktif dan dapat meningkatkan kerusakan sel akibat *cyc*, dengan jalan menurunkan kadar *glutathione* seluler melalui konjugasi. Dalam kondisi normal glutathione dapat berfungsi sebagai detoksifikasi reaksi oksidatif, sehingga mampu melindungi sel dengan cara membatasi transformasi *4-hydroxycyclophosphamide* menjadi metabolit aktif. Menurunnya jumlah glutathione seluler memicu akrolein untuk meningkatkan toksisitas *cyc*. Akrolein bertanggung jawab atas terjadinya sistitis hemoragik (de Jonge *et al.*, 2005; Emadi *et al.*, 2009; Patra *et al.*, 2012).

*Cyclophosphamide* dan metabolitnya diekskresikan melalui urin dalam waktu 24 jam setelah dimulainya pengobatan. Metabolit utama yang ditemukan dalam urin adalah karboksifosfamid. Namun, Chan *et al.* (1994) melaporkan bahwa metabolit utama yang ditemukan dalam urin adalah mustard fosforamid. Sebagian kecil zat dieliminasi melalui feses dan udara ekspirasi. Perbedaan metabolit utama yang ditemukan dalam urin antar penelitian mungkin disebabkan oleh reaksi *ex-vivo* yang terjadi selama pemrosesan sampel dalam beberapa penelitian. Ketidakstabilan *carboxyphosphamide* dan mustard fosforamid dalam urin dengan pH asam serta tidak diperhitungkan tingkat degradasi metabolit selama pengambilan sampel, penyimpanan dan *pre-treatment* dapat menghasilkan pengukuran yang tidak akurat (de Jonge *et al.*, 2005).

### 2.2.2 Efek Samping

*Cyclophosphamide* dapat menyebabkan efek samping yang paling banyak yaitu *myelosuppression* serta toksik pada organ yang lainnya (Wong *et al.*, 2017). Obat ini bersifat *cell cycle phase-non-specific drugs* yang berarti obat ini bekerja pada semua fase proliferasi sel kecuali pada fase  $G_0$  (fase istirahat). *Cyclophosphamide* memiliki sifat *dose dependent* sehingga semakin besar dosis maka semakin besar efek merusak sel dan semakin besar pula efek toksiknya (Atalaya *et al.*, 2014). Pemberian dosis rendah sampai menengah cenderung menghasilkan lebih sedikit efek toksik akut. Namun, penggunaan jangka panjang (>6 bulan) dapat menyebabkan toksisitas kronis yang berat misal mengakibatkan

neutropenia, leukopenia, trombositopenia dan anemia. Pemulihan hematologi yang cepat selalu terjadi dalam 2-3 minggu pada pasien dengan cadangan sumsum tulang normal, terlepas dari pemakaiannya (Emadi *et al.*, 2009).

### 2.3 Anemia Akibat *Cyclophosphamide*

Anemia terjadi ketika sel darah merah (SDM), kuantitas hemoglobin, dan volume *packed red blood cells* (hematokrit) mengalami penurunan jumlah per 100 mL darah. Berdasarkan kriteria WHO yang telah direvisi atau kriteria *National Cancer Institute*, seseorang dikatakan anemia jika kadar hemoglobin dibawah 14 g% pada pria dan dibawah 12 g% pada wanita. Karena jumlah efektif SDM berkurang, maka pengiriman O<sub>2</sub> ke jaringan menurun. Apabila hal ini tetap berlanjut dapat mengakibatkan gejala-gejala hipovolemia dan hipoksemia, termasuk kegelisahan, diaforesis (keringat dingin), takikardia, napas pendek, dan berkembang cepat menjadi kolaps sirkulasi atau syok. Anemia dapat dikoreksi dengan mengatasi penyakit yang mendasari atau memberikan perawatan suportif melalui transfusi sel darah merah atau *Packed Red Cells* (PRC) atau pemberian agen perangsang eritropoesis, dengan atau tanpa suplemen besi (Rodger III *et al.*, 2012; Oehadian, 2012; Price dan Wilson, 2002).

Penyebab anemia pada penderita kanker sering multifaktorial dan sering dikaitkan dengan penyakit atau gangguan seperti perdarahan, hemolisis, penyakit herediter, insufisiensi ginjal, kekurangan nutrisi, anemia penyakit kronis, atau kombinasi. Agen obat kemoterapi salah satunya *cyclophosphamide* menyebabkan *bone marrow suppression* yang menginduksi terjadinya anemia melalui kerusakan secara langsung pada sel hematopoietik, termasuk sintesis prekursor SDM di sumsum tulang. Timbulnya anemia akibat *cyc* disebabkan oleh metabolit mustard fosforamid yang mengeliminasi ion Cl<sup>-</sup> sehingga terbentuk kation reaktif yang bernama kation aziridium siklik (*ethyleneiminium*). Kation ini berusaha menjadi stabil dengan cara mengikat DNA sehingga terjadi *intrastrand* dan *interstrand* DNA *cross-links* yang mengakibatkan terganggunya replikasi DNA. Prevalensi anemia akibat kemoterapi berkisar 10-40% dan berbeda dibanding jenis anemia

lainnya. Dibandingkan dengan anemia defisiensi besi, anemia jenis ini cenderung memiliki eritropoietin lebih rendah (Emadi *et al.*, 2009; Rodger III *et al.*, 2012).

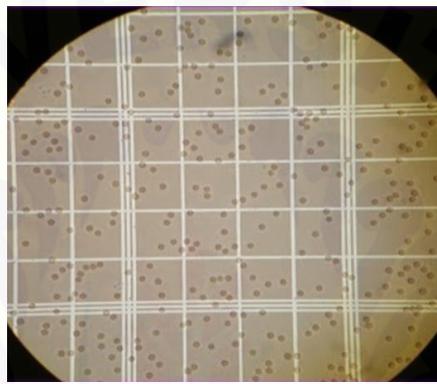
Penilaian risiko pasien dengan anemia akibat kemoterapi diperlukan untuk menentukan rencana intervensi awal (misalnya, jika memang perlu dilakukan transfusi PRC segera untuk meningkatkan kadar Hb secara cepat). Kelebihan utama transfusi dengan PRC adalah peningkatan kadar Hb dan hematokrit yang cepat. Oleh karena itu, transfusi PRC merupakan satu-satunya opsi intervensi untuk pasien *myelosuppressive* yang memerlukan koreksi segera terhadap anemia. Transfusi 1 unit (300 mL) dari PRC diperkirakan menghasilkan peningkatan rata-rata kadar Hb 1 g/dL atau hematokrit sebesar 3% pada orang dewasa ukuran normal yang tidak mengalami kehilangan darah secara simultan. Namun, dibalik keunggulannya PRC memiliki beragam resiko diantaranya reaksi post transfusi, gagal jantung kongestif, kontaminasi bakteri dan infeksi virus, serta kelebihan zat besi. Tujuan keseluruhan transfusi adalah untuk mengobati atau mencegah defisit kapasitas pembawa oksigen dalam darah untuk memperbaiki pengiriman oksigen ke jaringan tubuh. Transfusi jarang ditunjukkan bila kadar Hb lebih besar dari 10 g/dL (Rodger III *et al.*, 2012).

Produksi sel darah merah normalnya dikendalikan oleh eritropoietin, sitokin yang diproduksi di ginjal. *Erythropoiesis Stimulating Agent* adalah eritropoietin manusia rekombinan sintesis yang dapat merangsang eritropoiesis pada pasien dengan kadar RBC rendah. Tidak seperti transfusi yang cepat meningkatkan kadar Hb, ESA dapat memakan waktu berminggu-minggu untuk memulai respons Hb, namun efektif untuk mempertahankan tingkat Hb dengan pemberian berulang. Popularitas ESA mencapai puncaknya pada tahun 2003 sampai 2004, ketika penggunaannya pada pasien dengan kanker menyumbang 17% dari seluruh terapi anemia. Namun, paradigma ini bergeser secara dramatis karena terbukti memberikan efek merugikan seperti tromboemboli, aplasia sel darah merah, dan kejang (Rodger III *et al.*, 2012).

## 2.4 Eritrosit

### 2.4.1 Definisi

Eritrosit adalah sel datar berbentuk piringan yang mencekung di bagian tengah di kedua sisi, seperti donat dengan bagian tengah menggepeng bukan lubang (yaitu, eritrosit adalah piringan bikonkaf dengan garis tengah 8  $\mu\text{m}$ , ketebalan 2  $\mu\text{m}$  di tepi luar, dan ketebalan 1  $\mu\text{m}$  di bagian tengah) (Gambar 2.3). Fungsi utama eritrosit adalah pengangkutan hemoglobin guna mengangkut oksigen dari paru-paru ke jaringan (Guyton dan Hall, 2007; Sherwood, 2007).



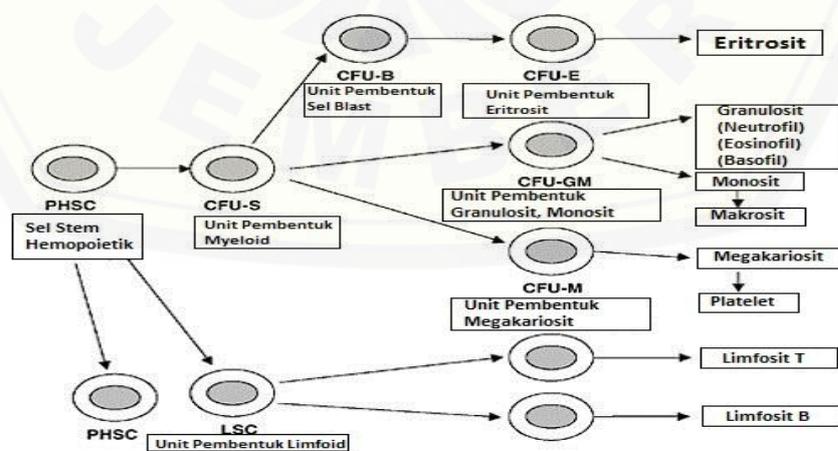
Gambar 2.3 Penampakan eritrosit dalam kamar hitung (Sumber: <https://mbbsstudystuff.com/haemocytometer-improved-neubauers-chamber/>)

Hemoglobin ditemukan hanya di sel darah merah. Molekul hemoglobin memiliki dua bagian: (1) bagian globin, suatu protein yang terbentuk dari empat rantai polipeptida yang sangat berlipat-lipat; dan (2) empat gugus non protein yang mengandung besi yang dikenal sebagai gugus heme, dengan masing-masing terikat ke salah satu polipeptida diatas. Hemoglobin adalah suatu pigmen (yang berwarna secara alami). Karena kandungan besinya maka hemoglobin tampak kemerahan jika berikatan dengan  $\text{O}_2$  dan keunguan jika mengalami deoksigenasi. Selain mengangkut  $\text{O}_2$ , hemoglobin juga dapat berikatan dengan: (1) karbon dioksida, hemoglobin membantu mengangkut gas ini dari sel jaringan kembali ke paru; (2) bagian ion hidrogen asam ( $\text{H}^+$ ) dari asam karbonat terionisasi yang dihasilkan di tingkat jaringan, hemoglobin menyangga asam ini sehingga tidak terjadi perubahan pH darah; (3) CO, normalnya tidak terdapat dalam darah apabila gas ini terhirup maka CO akan cenderung berikatan dengan Hb sehingga terjadi

keracunan; (4) Nitrat Oksida, sebagai vasodilator yang menjamin darah kaya O<sub>2</sub> mengalir dengan lancar dan membantu menstabilkan tekanan darah (Sherwood, 2007).

#### 2.4.2 Pembentukan Sel Darah

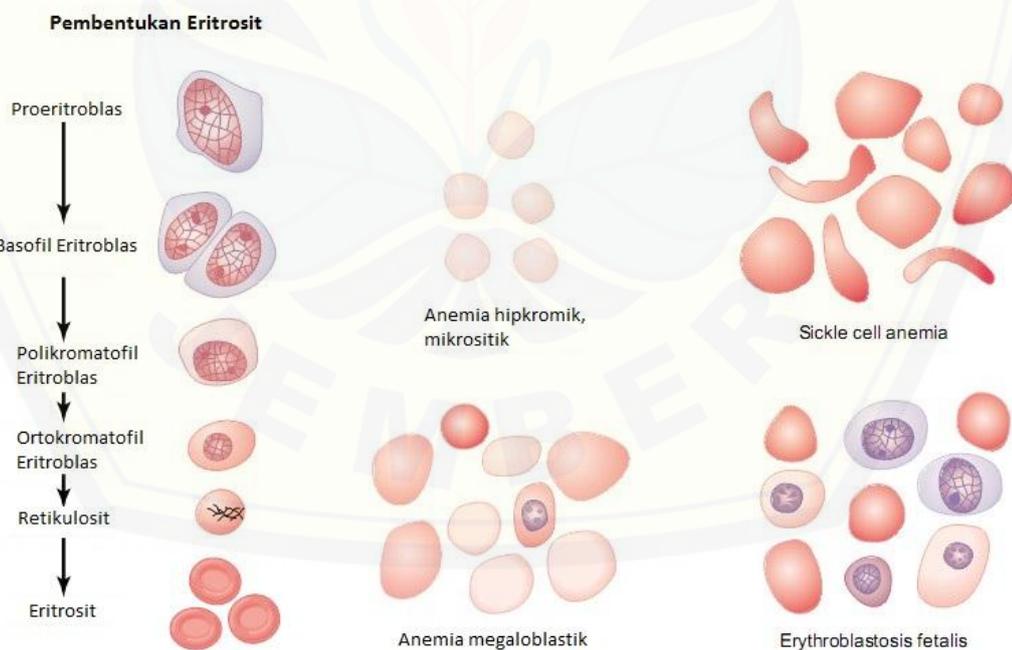
Sel darah memulai kehidupannya di dalam sumsum tulang dari suatu tipe sel yang disebut *sel stem hematopoietik pluripoten*, yang merupakan asal dari semua sel dalam darah sirkulasi. Sewaktu sel-sel darah ini diproduksi, ada sebagian kecil dari sel-sel ini yang bertahan persis seperti sel-sel pluripoten asalnya dan disimpan dalam sumsum tulang guna mempertahankan suplai sel-sel darah tersebut, walaupun jumlahnya berkurang seiring dengan penambahan usia. Sebagian besar sel-sel yang direproduksi akan berdiferensiasi untuk membentuk sel-sel tipe lain (Gambar 2.4). Sel yang berada pada tahap pertengahan sangat mirip dengan sel stem pluripoten, walaupun sel-sel ini telah membentuk suatu jalur khusus pembelahan sel dan disebut *committed stem cells*. Berbagai *committed stem cells*, bila ditumbuhkan dalam biakan akan menghasilkan koloni tipe sel darah yang spesifik. Suatu *committed stem cells* yang menghasilkan eritrosit disebut unit pembentuk koloni eritrosit, dan singkatan CFU-E digunakan untuk menandai jenis sel stem ini. Demikian pula, unit yang membentuk koloni granulosit dan monosit ditandai dengan singkatan CFU-GM, begitu pula yang lain (Guyton dan Hall, 2007).



Gambar 2.4 *Pluripotent Hematopoietic Stem Cells* (Sumber: <https://www.nap.edu/read/11269/chapter/4>)

### 2.4.3 Tahap Diferensiasi Sel Darah Merah

Sel pertama yang dapat dikenali sebagai bagian dari rangkaian sel darah merah adalah proeritroblas (Gambar 2.5). Begitu proeritroblas ini terbentuk, maka ia akan membelah beberapa kali sampai akhirnya membentuk banyak sel darah merah yang matur. Sel-sel generasi pertama ini disebut *basofil eritroblas* sebab dapat dipulas dengan zat warna basa. Sel yang terdapat pada tahap ini mengumpulkan sedikit sekali hemoglobin. Pada generasi berikutnya, sel sudah dipenuhi oleh hemoglobin sampai konsentrasi sekitar 34%, nukleus memadat menjadi kecil, dan sisa akhirnya diabsorpsi atau didorong keluar dari sel. Pada saat yang sama, retikulum endoplasma diabsorpsi. Sel pada tahap ini disebut retikulosit karena masih mengandung sejumlah kecil materi basofilik, yaitu terdiri dari sisa-sisa aparatus Golgi, mitokondria, dan sedikit organel sitoplasma lainnya. Selama tahap *retikulosit* ini, sel-sel berjalan dari sumsum tulang masuk ke dalam kapiler darah dengan cara *diapedesis* (terperas melalui pori-pori membran kapiler) (Guyton dan Hall, 2007).



Gambar 2.5 Pembentukan dan karakteristik eritrosit dalam berbagai anemia (Sumber: Sherwood, 2007)

## 2.5 Hitung Eritrosit

Hitung eritrosit merupakan bagian dari pemeriksaan darah lengkap untuk tujuan diagnostik dan prognostik. Salah satu tekniknya menggunakan hemositometer yang terdiri dari kamar hitung *Neubauer* dan pipet eritrosit. Prinsip metode ini berdasarkan kelarutan darah dengan larutan Hayem kemudian memulai perhitungan eritrosit (Math *et al.*, 2016).

Perhitungan eritrosit diawali dengan mengambil larutan Hayem sebanyak 2000  $\mu\text{L}$  dan dimasukkan ke tabung reaksi. Membuang larutan Hayem dari dalam tabung reaksi sebanyak 10  $\mu\text{L}$ . Kemudian mengambil darah dari tabung EDTA sebanyak 10  $\mu\text{L}$  dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang sudah berisi larutan Hayem diikuti homogenisasi. Homogenisasi larutan Hayem dengan darah dilakukan dengan vortex selama 3-5 menit, pengenceran yang dihasilkan dengan cara ini adalah 200 kali. Setelah itu mengisikan larutan Hayem-darah ke dalam kamar hitung melalui celah antara kamar hitung dengan *cover glass* (Gandasubrata, 1999).

Setelah preparat terbentuk, langkah selanjutnya yakni menghitung jumlah eritrosit. Pertama mengatur fokus terlebih dahulu dengan memakai lensa obyektif kecil (10x), kemudian lensa tersebut diganti dengan lensa objektif besar (40x) sampai garis-garis bagi dalam bidang besar tengah nampak jelas. Kemudian hitung semua eritrosit yang terdapat dalam kolom A, B, C, D, dan E secara sistematis. Sel-sel yang menyinggung garis batas sebelah kiri dan atas dihitung sedangkan sel yang terletak dan menyinggung garis batas sebelah kanan dan bawah tidak dihitung serta proses perhitungan dilakukan secara sistematis (Gandasubrata, 1999; Kiswari, 2014).

## 2.6 Tanaman Kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.)

### 2.6.1 Definisi

Berasal dari keluarga Sapotacea, *star apple* (*Chrysophyllum cainito* L.) yang juga disebut *caimito*, pohon daun emas, *sweetsop* atau anon diyakini berasal dari Kalimantan Tengah, dan Amerika meskipun ada pihak lain yang menganggap berasal dari Hindia Barat. Tanaman ini tersebar secara merata baik di dataran

rendah maupun sedang dari Meksiko Selatan hingga Argentina Utara dan Peru. Di Amerika Serikat, tanaman ini hanya tumbuh baik di daerah bersuhu hangat tepatnya di Florida Selatan. *Star apple* merupakan tanaman berdaun hijau yang tumbuh mencapai 15 m dengan diameter batang pendek mencapai 60 cm seperti terlihat dalam Gambar 2.6. Pohon ini memiliki tajuk yang padat, luas, dan kulit kayu yang memancarkan getah warna putih. Tanaman ini dapat dikembangkan dengan biji tapi juga bisa dilakukan cangkok. Daunnya berbentuk lonjong yang berkilau di bagian atas dan dilapisi dengan rambut halus di bawahnya. Bunganya tumbuh berkelompok dalam tangkai daun dengan warna berkisar hijau-kuning sampai ungu dan putih. Buah tanaman ini seukuran buah apel, biasanya bulat, kadang oval, berbentuk hati atau kerucut dengan kulit halus dan licin. Bentuk bintang muncul di bagian penampangnya. Buah ini ditandai dengan dagingnya yang lembut berwarna hijau kekuningan dan rasa yang manis beserta *pulp* warna putih atau krem yang berkilau dengan benih biji di dalamnya (Yahia, 2011).

Di Indonesia, khususnya kabupaten Jember varietas buah kenitu ada tiga macam yaitu kenitu bulat besar, bulat kecil, ungu dan hijau lonjong (Hidayat *et al.*, 2007). Perbedaan dari ketiga varian tersebut yaitu pada penampakan fisiknya sedangkan daun kenitu tidak memiliki perbedaan yang signifikan dari ke empat varian buah kenitu tersebut.



Gambar 2.6 Penampakan Tanaman Kenitu (Sumber: <http://www.stuart-xchange.org/Caimito.html>)

## 2.6.2 Taksonomi

Klasifikasi kenitu secara sistematis sebagai berikut (USDA, 2017):

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Bangsa	: Ebenales
Suku	: Sapotaceae
Marga	: <i>Chrysophyllum</i>
Jenis	: <i>Chrysophyllum cainito</i> L.

## 2.6.3 Manfaat dan Kandungan Daun Kenitu

Daun kenitu telah diuji secara kimia dan dilaporkan mengandung alkaloid, flavonoid, fenol, sterol, dan terpenoid dengan prosentase sesuai Tabel 2.1. Diantara semua fraksi fitokimia yang dikandung daun *Chrysophyllum cainito* L., alkaloid kuartener dan fraksi N-oksidasi merupakan fraksi terbanyak, sedangkan lemak dan parafin serta alkaloid memiliki jumlah paling sedikit. Daunnya juga diketahui sebagai sumber terpenoid (seperti asam ursolik, lupeol, beta-sisterol) dan fenolat (asam galat). Kandungan fenol, flavonoid, alkaloid, sterol dan terpenoid dalam daun kenitu berguna untuk mengurangi kadar glukosa darah dengan proses antioksidan pada dosis  $\geq 20$  g/kgBB dan akan menimbulkan efek toksik pada dosis 30 g/kgBB. Selain itu, fraksi fenolik memiliki peran penting sebagai antioksidan, anti inflamasi, agen hematopoiesis, hepatoprotektor yang digunakan sebagai terapi pasien kanker. Kandungan terpenoid daun *Chrysophyllum cainito* L. lebih besar dibanding daun *Psidium guava* L. dengan nilai  $4,004 \pm 0,122\%$  dan  $1,000\%$  (Chen *et al.*, 2016; Souri *et al.*, 2008; Koffi *et al.*, 2009; Shailajan dan Gurjar, 2014).

Tabel 2.1 Nilai fitokimia daun kenitu

Fraksi Fitokimia	% Kandungan
Lemak dan paraffin	0,934±0,045
Terpenoid dan fenolik	4,004±0,122
Alkaloid	0,166±0,068
Alkaloid kuartener dan n-oksida	10,678±0,035
Serat	71,122±0,136

(Sumber: Shailajan dan Gurjar, 2014)

Untuk pertama kalinya ekstrak kasar, fraksi dan senyawa murni terpenoid (*3β-Lup-20(29)-en-3-yl acetate* atau *lupeol acetate* dan *Lup-20(29)-en-3β-O-hexanoate*) yang diperoleh dari daun *Chrysophyllum cainito* L. memiliki sifat antihipersensitif disamping antiinflamasi pada tikus. Mekanisme dilalui *Chrysophyllum cainito* L. hingga memberikan efek antihipersensitif masih belum jelas, dan memerlukan penyelidikan lebih lanjut. Namun, hal ini bisa jadi merupakan sesuatu yang baru untuk kepentingan tatalaksana inflamasi persisten dan nyeri neuropatik pada manusia (Meira *et al.*, 2014). Selain itu, berdasarkan penelitian yang dilakukan Chen *et al.*, (2016) didapatkan hasil bahwa terpenoid dapat digunakan sebagai zat *myeloprotective* yang ditandai dengan terjadinya peningkatan jumlah leukosit dan hemoglobin.

Pemberian secara topikal ekstrak etanol daun *Chrysophyllum cainito* L. yang telah distandardisasi memfasilitasi berbagai tahap penyembuhan luka seperti fibroplasia, sintesis kolagen, kontraksi luka, dan epitelisasi. Peningkatan parameter biokimia (hidroksiprolin dan heksosamin) yang signifikan dari jaringan granulasi dari model hewan eksisi luka menunjukkan hiperplasia seluler (Shailajan dan Gurjar, 2016).

## 2.7 Radikal Bebas

Radikal bebas dapat didefinisikan sebagai molekul yang mengandung elektron tak berpasangan dalam orbital atom. Kehadiran elektron tidak berpasangan menghasilkan sifat umum tertentu yang dimiliki oleh sebagian besar radikal yakni tidak stabil dan sangat reaktif. Mereka dapat menyumbangkan atau menerima elektron dari molekul lain sehingga dapat berperan sebagai oksidan

atau reduktan (Cheeseman dan Slater, 1993). Radikal bebas paling penting dan sering menjadi penyebab dari berbagai penyakit diantaranya gugus hidroksil, anion superoksida, hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), oksigen tunggal, hipoklorit, nitrit oksida, dan peroksinitrit. Gugus tersebut merupakan spesies yang sangat reaktif dan mampu memicu kerusakan membran sel serta nukleus melalui molekul-molekul yang berhubungan seperti DNA, protein, karbohidrat, dan lipid (Young dan Woodside, 2001). Radikal bebas menyerang makromolekul penting yang dapat memicu kerusakan sel dan gangguan homeostasis. Target radikal bebas yakni semua jenis molekul dalam tubuh, dengan lipid, asam nukleat, dan protein sebagai target utama (Lobo *et al.*, 2010).

Radikal bebas dan ROS dapat terbentuk dari metabolisme normal dalam tubuh manusia maupun akibat paparan dari luar tubuh seperti sinar X, ozon, asap rokok, polutan udara, dan bahan kimia industri (Bagchi dan Puri, 1998). Pembentukan radikal bebas terjadi secara terus menerus didalam sel sebagai konsekuensi dari reaksi enzimatik dan non enzimatik. Reaksi enzimatik yang menyumbang pembentukan radikal bebas yakni zat-zat yang terlibat dalam proses pernapasan, fagositosis, sintesis prostaglandin, dan sitokrom P450 (Liu *et al.*, 1999). Radikal bebas juga dapat terbentuk dalam reaksi non enzimatik oksigen dengan senyawa organik yang dipicu oleh reaksi ionisasi. Berikut beberapa sumber radikal bebas dari dalam tubuh diantaranya mitokondria, xantin oksidase, peroksisom, inflamasi, fagositosis, olahraga, dan iskemia. Sedangkan asap rokok, polusi lingkungan, radiasi, obat-obatan tertentu, pestisida, pelarut industri, dan ozon termasuk sumber radikal bebas yang berasal dari luar tubuh (Lobo *et al.*, 2010).

### 2.7.1 Konsep Stres Oksidatif

Stres oksidatif merupakan istilah yang digunakan untuk menggambarkan kondisi kerusakan oksidatif yang dihasilkan ketika terjadi krisis keseimbangan antara radikal bebas dengan pertahanan antioksidan (Rock *et al.*, 1996). Stres oksidatif sering dihubungkan dengan kerusakan molekul lipid, protein, dan asam nukleat (Mc Cord, 2000). Stres oksidatif jangka pendek dapat terjadi pada

jaringan yang terluka oleh trauma, infeksi, luka bakar, hipoksia, racun, dan olahraga yang berlebihan. Jaringan yang cedera ini menghasilkan enzim pemicu radikal (misalnya xantin oksidase, lipogenase, siklooksigenase), aktivasi fagosit, pelepasan besi bebas, ion tembaga, atau gangguan rantai transpor elektron pada fosforilasi oksidatif yang memproduksi peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*). Inisiasi, promosi, dan perkembangan kanker, serta efek samping radiasi dan kemoterapi telah dihubungkan dengan ketidakseimbangan antara ROS dan sistem pertahanan antioksidan (Rao *et al.*, 2006).

### 2.7.2 Kerusakan Oksidatif terhadap Protein dan DNA

Protein dapat diubah secara oksidatif melalui tiga cara diantaranya perubahan asam amino spesifik, pembelahan peptida, dan pembentukan protein silang akibat reaksi dengan produk peroksidasi lipid. Protein yang mengandung asam amino seperti metionin, sistein, arginin, dan histidin sangat rentan terhadap oksidasi (Freeman dan Crapo, 1982). Perubahan protein akibat radikal bebas meningkatkan kerentanan terhadap proteolisis enzim. Kerusakan oksidatif pada produk protein dapat mempengaruhi aktivitas enzim, reseptor, dan transpor membran. Produk protein yang rusak secara oksidatif dapat mengandung kelompok yang sangat reaktif yang dapat memicu kerusakan pada membran dan banyak fungsi seluler. Radikal peroksil dianggap sebagai spesies radikal bebas untuk oksidasi protein. ROS dapat merusak protein, memproduksi karbonil, dan mengubah asam amino termasuk pembentukan metionin sulfoksida, dan protein peroksida. Oksidasi protein mempengaruhi perubahan mekanisme transduksi sinyal, aktivitas enzim, stabilitas panas, dan kerentanan proteolisis yang menyebabkan penuaan (Lobo *et al.*, 2010).

Berbagai eksperimen dengan jelas membuktikan bahwa DNA dan RNA rentan terhadap kerusakan oksidatif. Telah dilaporkan bahwa pada proses penuaan dan kanker melibatkan DNA sebagai target utama (Woo *et al.*, 1998). Nukelotida oksidatif seperti glikol, dTG, dan 8-hidroksi-2-deoksiganosin ditemukan meningkat selama kerusakan oksidatif pada DNA dibawah radiasi UV atau akibat

radikal bebas. Oleh karena itu, salah satu penanda terjadinya stres oksidatif yakni meningkatnya kadar 8-hidroksi-2-deoksiguanin (Hattori *et al.*, 1997).

## 2.8 Antioksidan

Antioksidan dapat didefinisikan sebagai molekul yang menghambat reaksi radikal bebas sehingga kerusakan sel dapat dicegah (Young dan Woodside, 2001). Molekul ini memiliki beragam peran fisiologis dalam tubuh meskipun hanya dalam jumlah kecil (Kumar, 2014). Peran fisiologis antioksidan adalah mencegah kerusakan pada berbagai komponen seluler yang timbul sebagai konsekuensi dari reaksi kimia yang melibatkan radikal bebas (Young dan Woodside, 2001).

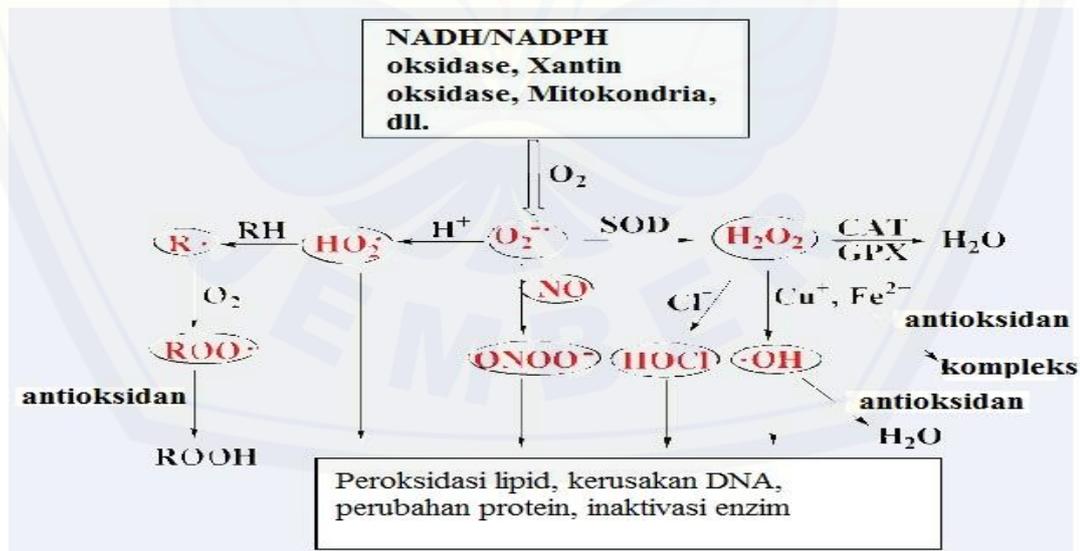
Antioksidan dapat dibagi dalam berbagai kategori. Berdasarkan aktivitasnya, molekul ini dapat dikategorikan sebagai antioksidan enzimatis dan non-enzimatis. Antioksidan enzimatis bekerja dengan memecah dan menghilangkan radikal bebas. Antioksidan enzimatis bekerja dengan mengubah produk oksidatif berbahaya menjadi hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dan kemudian menjadi air dengan bantuan kofaktor seperti tembaga, seng, mangan, dan besi. Antioksidan yang termasuk kategori enzimatis diantaranya superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), dan glutathion peroksidase (GSHPx). Sedangkan antioksidan non-enzimatis bekerja dengan mengganggu reaksi berantai radikal bebas. Beberapa contoh dari antioksidan non-enzimatis adalah vitamin C, vitamin E, polifenol tanaman, karotenoid, dan glutathion (Shahidi dan Zhong, 2010).

Berdasarkan kelarutannya, antioksidan terbagi menjadi antioksidan larut air dan larut lemak. Antioksidan larut air (misalnya vitamin C) hadir dalam cairan seluler seperti sitosol atau matriks sitoplasma. Antioksidan yang larut dalam lemak (misalnya vitamin E, karotenoid, dan asam lipoik) sebagian besar terletak di membran sel (Nimse dan Pal, 2015).

Antioksidan juga bisa dibedakan menurut ukurannya, mulai dari yang bermolekul kecil hingga besar. Antioksidan molekul kecil berperan dalam menetralkan radikal bebas melalui proses pengangkutan dan membawa mereka pergi keluar tubuh. Antioksidan yang termasuk dalam kategori ini yaitu vitamin C, vitamin E, karotenoid, dan glutathion (GSH). Sedangkan contoh dari antioksidan

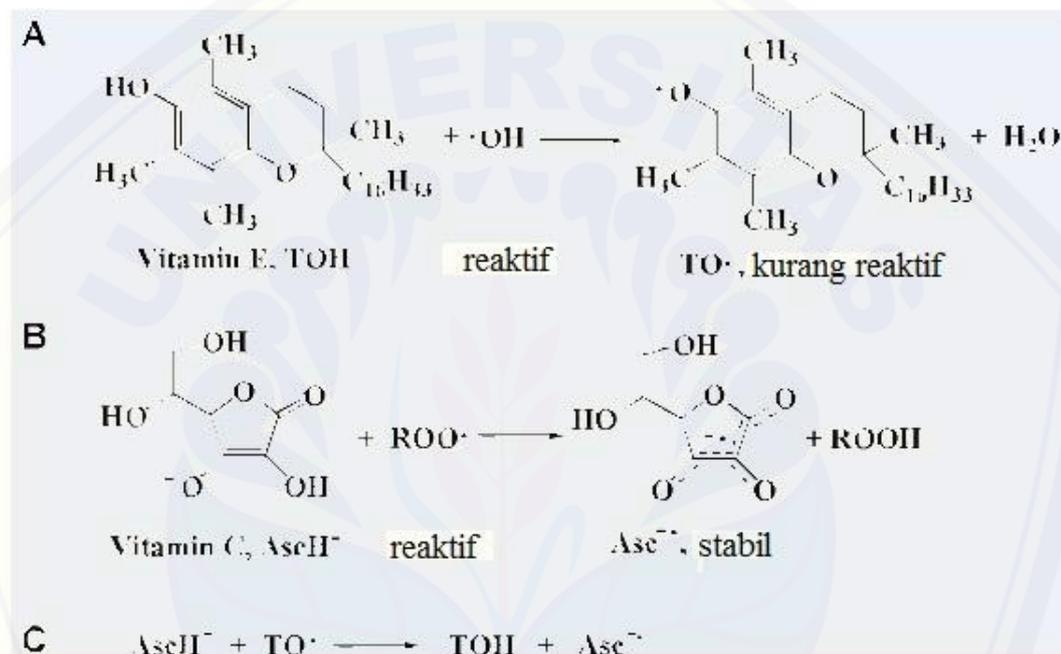
molekul besar yakni albumin, SOD, CAT, dan GSHPx yang bertugas menyerap radikal bebas serta mencegah invasi terhadap protein esensial (Nimse dan Pal, 2015).

Antioksidan dapat menetralkan efek radikal bebas dengan menerima atau menyumbangkan elektron untuk menghilangkan kondisi tidak stabilnya muatan radikal bebas. Molekul antioksidan dapat langsung bereaksi dengan radikal bebas yang reaktif dan memusnahkannya atau mengubahnya menjadi bentuk tidak aktif sehingga tidak berbahaya bagi tubuh. Radikal bebas dapat dinetralkan oleh berbagai antioksidan dengan mekanisme yang berbeda. Misalnya, antioksidan yang memiliki struktur cincin aromatik mampu membatasi jumlah elektron tidak berpasangan (Gambar 2.7). Vitamin C ( $\text{AscH}^\cdot$ ) yang larut dalam air dan vitamin E (TOH) yang larut dalam lemak akan langsung bereaksi guna menetralkan radikal hidroksil, alkoksil, dan lipid peroksil ( $\text{ROO}^\cdot$ ) dengan mengubahnya masing-masing menjadi air ( $\text{H}_2\text{O}$ ), alkohol, dan lipid hidroperoksida. Vitamin E sendiri berubah menjadi radikal fenil dan vitamin C berubah menjadi radikal yang sangat stabil ( $\text{Asc}^\cdot$ ) karena strukturnya yang terdelokalisasi (Gambar 2.8. A dan B) (Lü *et al.*, 2010).



Gambar 2.7 Ringkasan jenis dan sumber radikal bebas (ROS); serta titik aksi antioksidan (Sumber: Lü *et al.*, 2010).

Vitamin C juga dapat menetralkan bentuk radikal dari antioksidan lain seperti radikal glutation dan radikal vitamin E serta meregenerasi antioksidan ini (Gambar 2.8. C). Vitamin C sendiri dapat diregenerasi dari bentuk radikalnya ( $Asc^{\cdot-}$ ) dengan bantuan NADH atau *NADPH-dependent reductase* (Hossain dan Asada, 1985). Berbagai antioksidan dapat langsung bereaksi dengan radikal bebas untuk mengakhiri reaksi berantai sehingga kerusakan akibat radikal bebas dapat dihentikan (DeFeudis *et al.*, 2003).



Gambar 2.8 Reaksi langsung vitamin E (TOH) dengan OH (A); vitamin C ( $AscH^{\cdot-}$ ) dengan ROO (B); regenerasi vitamin E oleh vitamin C (C) (Sumber: Lü *et al.*, 2010).

Fungsi lain yang penting dari antioksidan adalah mengatur enzim yang berhubungan dengan ROS. Antioksidan dapat menurunkan radikal bebas tingkat seluler dengan menghambat aktivitas atau ekspresi enzim pembentuk radikal bebas seperti NAD(P)H oksidase dan xantin oksidase (XO) serta melalui peningkatan aktivitas enzim antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), dan glutathion peroksidase (GPX) (Panchatcharam *et al.*, 2006; Shih *et al.*, 2007). Enzim antioksidan tersebut diproduksi dalam tubuh untuk memberikan pertahanan penting dalam melawan radikal bebas. Sel-sel hewan yang mengandung enzim SOD dapat mengubah dua superoksida ( $O_2^{\cdot-}$ ) menjadi

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan oksigen. Selain itu, enzim CAT dan GPX juga memiliki peran untuk menghilangkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sebelum reaksi Fenton membentuk OH<sup>-</sup> (Lü *et al.*, 2010).

### 2.8.1 Terpenoid

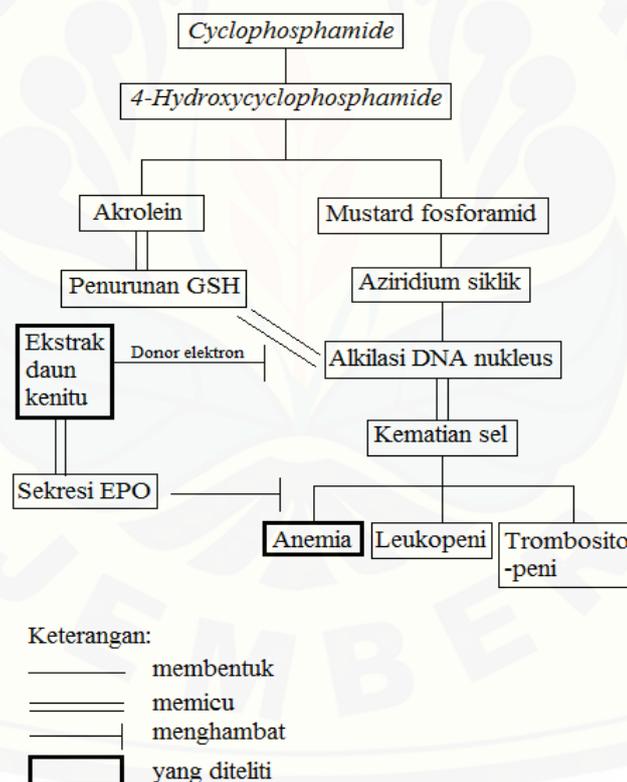
Terpenoid adalah zat antioksidan yang terkandung dalam tanaman dan terbentuk dari isoprena, oleh karena itu zat ini juga disebut isoprenoid. Terdapat bermacam-macam terpenoid tergantung jumlah rantai karbon yang dimiliki. Pembentukan terpenoid dalam tanaman melibatkan beberapa kompartemen subseluler, dan memerlukan pengangkutan zat baik secara intra maupun interseluler (Croteau *et al.*, 2000). Terpenoid memiliki peran ekologis yang penting karena bertindak sebagai agen alelopati (berperan dalam pertumbuhan, daya hidup, perkembangan, dan reproduksi), mengusir atau merangsang interaksi antara tanaman dengan tanaman maupun tanaman dengan patogen yakni hewan herbivora (Harrewijn *et al.*, 2001). Hingga saat ini belum diketahui secara pasti apakah terpenoid memiliki peran antioksidan pada tubuh tanaman sendiri, namun beberapa terpenoid atau prekursor bertindak sebagai sistem pengangkut molekul agresif dalam bentuk gas seperti emisi isoprena yang mencegah kerusakan ozon (Loreto *et al.*, 2001). Disisi lain, 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 (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).

## 2.9 Kerangka Konsep



Gambar 2.9 Kerangka konsep penelitian

*Cyclophosphamide* merupakan obat kemoterapi yang dirubah menjadi metabolit aktif oleh enzim CYP450 di hepar menjadi *4-Hydroxycyclophosphamide*. Zat ini sangat tidak stabil dan mudah diuraikan

menjadi mustard fosforamid dan akrolein oleh  $\beta$ -akrolein. Mustard fosforamid yang terbentuk salah satunya akan menuju sumsum tulang. Mustard fosforamid kemudian mengalami eliminasi klorida untuk membentuk kation aziridinium siklik (*ethyleneiminium*). *Ethyleneiminium* merupakan kation tidak stabil yang akan mengalkilasi atau mengikat nukleus DNA sehingga terjadi *cross linked* dan mengakibatkan kematian sel. Sedangkan akrolein memicu penurunan GSH yang merupakan antioksidan alami dalam tubuh sehingga meningkatkan kerja kation aziridinium siklik. Kematian sel sumsum tulang mengakibatkan terjadinya supresi sumsum tulang dengan salah satu gejalanya anemia. Antioksidan dalam ekstrak daun kenitu dapat mencegah terjadinya ikatan dengan DNA melalui donasi elektron sehingga supresi sumsum tulang yang bisa menimbulkan anemia dapat dicegah. Selain itu, terpenoid dalam ekstrak daun kenitu mampu memicu EPO sehingga anemia dapat dicegah.

### 2.10 Hipotesis

Hipotesis penelitian ini yaitu terdapat aktivitas ekstrak etanol daun kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) terhadap jumlah eritrosit tikus wistar yang diinduksi *cyclophosphamide*.

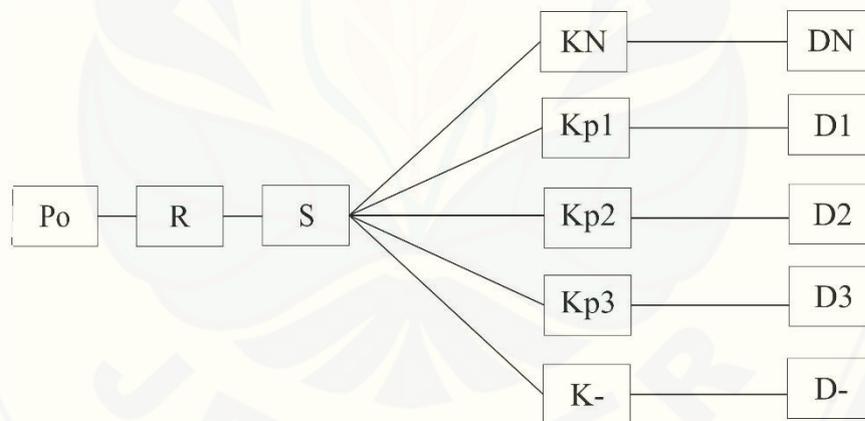
### BAB 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental semu (*quasi experimental*).

#### 3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian *the randomized post test only control group design*. Penilaian hanya dilakukan setelah mendapatkan perlakuan berupa pemberian ekstrak daun kenitu tanpa didahului pengukuran hitung eritrosit sebelum perlakuan. Hasil perlakuan dibandingkan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Penelitian ini dilakukan dalam 1 bulan dengan masa adaptasi selama 1 minggu. Secara sistematis rancangan penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



- Po Populasi tikus jenis *Wistar*.
- R Randomisasi
- S Kelompok sampel
- KN Kelompok kontrol normal yang diberikan normal saline dan DMSO 10% per sonde
- Kp1 Kelompok perlakuan 1 yang diberikan ekstrak etanol daun kenitu per sonde sebanyak 100 mg/kgBB/hari yang dilarutkan DMSO 10% selama 10 hari diikuti satu kali pemberian *cyclophosphamide* intraperitoneal 50 mg/kgBB di hari ke 15
- Kp2 Kelompok perlakuan 2 yang diberikan ekstrak etanol daun kenitu per sonde sebanyak 200 mg/kgBB/hari yang dilarutkan DMSO 10% selama 10 hari diikuti satu kali pemberian *cyclophosphamide* intraperitoneal 50 mg/kgBB di hari ke 15

Kp3	Kelompok perlakuan 3 yang diberikan ekstrak etanol daun kenitu per sonde sebanyak 400 mg/kgBB/hari yang dilarutkan DMSO 10% selama 10 hari diikuti satu kali pemberian <i>cyclophosphamide</i> intraperitoneal 50 mg/kgBB di hari ke 15
K-	Kelompok kontrol negatif yang diberikan per sonde normal saline dan DMSO 10% diikuti induksi <i>cyclophosphamide</i> 50 mg/kgBB intraperitoneal 1 kali pada hari ke 15
DN	Hitung eritrosit KN
D1	Hitung eritrosit Kp1
D2	Hitung eritrosit Kp2
D3	Hitung eritrosit Kp3
D-	Hitung eritrosit K-

Gambar 3.1 Sistematika rancangan penelitian

### 3.3 Sampel

#### 3.3.1 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu tikus wistar dengan kriteria inklusi sebagai berikut:

- Tikus dengan jenis kelamin jantan
- Berat badan 150-200 gram
- Usia 2-3 bulan
- Keadaan sehat (bergerak aktif, dan rambut tidak mudah rontok)

Sedangkan kriteria eksklusi meliputi:

- Tikus mengalami dehidrasi
- Menderita luka kulit

#### 3.3.2 Besar Sampel Penelitian

Jumlah tikus yang digunakan sebagai sampel penelitian ditentukan dengan rumus federer, yaitu  $r$  adalah jumlah sampel penelitian dan  $t$  adalah jumlah kelompok perlakuan pada penelitian maka:

$$\begin{aligned} (r-1)(t-1) &\geq 15 \\ (r-1)(5-1) &\geq 15 \\ (r-1)4 &\geq 15 \\ (r-1) &\geq 15/4 \\ (r-1) &\geq 3,75 \\ r &\geq 4,75 \end{aligned}$$

$$r \approx 4$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, dalam penelitian ini terdapat 5 kelompok perlakuan dengan 4 replikasi pada setiap perlakuan. Jadi peneliti menggunakan 20 ekor tikus yang dibagi menjadi 5 kelompok.

### **3.4 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini akan dilakukan di beberapa tempat di Universitas Jember, yaitu Laboratorium Botani Fakultas Pertanian untuk determinasi tanaman, Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi untuk ekstraksi, Laboratorium Biomedik Dasar Fakultas Kedokteran Gigi untuk perawatan hewan coba, dan Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran untuk pemeriksaan jumlah eritrosit. Penelitian ini dilakukan selama satu bulan.

### **3.5 Variabel Penelitian**

#### **3.5.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak daun kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) pada tikus wistar.

#### **3.5.2 Variabel Terikat**

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah eritrosit.

### **3.6 Definisi Operasional**

Definisi operasional penelitian ini dijelaskan pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Definisi operasional

No	Variabel	Definisi Operasional dan Cara Pengukuran	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Jumlah Eritrosit	Jumlah eritrosit dihitung melalui kamar hitung <i>Improved Neubauer</i> menggunakan darah vena dengan antikoagulansia. Hitung eritrosit tikus dilakukan dengan pembesaran lensa obyektif 40× pada 5 bidang yang masing-masing terdiri dari 16 bidang kecil. Pengamatan dilakukan menggunakan <i>olympus microscope binocular</i> .	Jumlah sel eritrosit	Numerik
2.	Ekstrak Etanol Daun Kenitu ( <i>Chrysophyllum cainito</i> L.)	Ekstrak kental yang diambil dari ekstraksi daun kenitu dengan pelarut etanol 70% dan diencerkan menggunakan DMSO 10%.	Konsentrasi ekstrak etanol daun kenitu ( <i>Chrysophyllum cainito</i> L.) dalam larutan.	Numerik
3.	<i>Cyclophosphamide</i>	Obat kanker yang mampu mengakibatkan terjadinya <i>bone marrow suppression</i> . Diberikan pada kelompok perlakuan masing-masing 50 mg/kgBB intraperitoneal satu kali pada hari ke 15. Satu vial <i>cyclophosphamide</i> 1000 mg dicampur dengan 100 ml NaCl 0,9% sehingga 1 ml mengandung <i>cyclophosphamide</i> 10 mg. <i>Cyclophosphamide</i> yang digunakan bermerk Endoxan yang diproduksi oleh Baxter. Obat diperoleh dengan resep dokter.	Dosis pemberian <i>cyclophosphamide</i>	Numerik

### 3.7 Alat dan Bahan

#### 3.7.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi:

- a. Alat untuk pemeliharaan tikus berupa kandang tikus, tempat makan dan minum, penutup kawat, label;
- b. Alat untuk pembuatan ekstrak daun kenitu timbangan, *blender*, ayakan, toples kaca, kertas saring, *rotatory evaporator*, corong, erlenmeyer, pengaduk;
- c. Alat untuk pemberian ekstrak daun kenitu spuit sonde, *beaker glass*, pengaduk, *handscoon*;
- d. Alat untuk pemberian *cyclophosphamide* berupa spuit, *beaker glass*, alat pengaduk, *handscoon*;
- e. Alat untuk pengambilan darah tikus berupa *handscoon*, spuit, alat fiksasi;
- f. Alat untuk mengukur hitung eritrosit berupa kamar hitung *Improved Neubauer*, mikropipet, *obyek glass*, dan mikroskop.

#### 3.7.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi:

- a. Bahan untuk pemeliharaan tikus seperti makanan pelet dan air;
- b. Bahan untuk ekstrak daun kenitu berupa daun kenitu dan etanol 70% (Hidayat *et al.*, 2007);
- c. Bahan untuk induksi yaitu *cyclophosphamide* vial;
- d. Bahan untuk menyonde yaitu ekstrak daun kenitu, DMSO, aquades, dan normal salin;
- e. Bahan untuk mengukur hitung eritrosit adalah serum darah tikus EDTA, dan larutan Hayem.

### 3.8 Prosedur Penelitian

#### 3.8.1 Pemilihan Sampel Tikus Wistar

Jumlah dari hewan coba ada 20 ekor dan dibagi menjadi 5 kelompok secara randomisasi serta tiap kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. Pemilihan hewan coba yang di gunakan pada penelitian ini harus sesuai dengan kriteria inklusi dan kriteria eksklusi.

#### 3.8.2 Persiapan Sampel Tikus Wistar

Tikus Wistar diadaptasikan terlebih dahulu terhadap lingkungan laboratorium selama 7 hari. Lingkungan tempat tinggal tikus dikondisikan agar tenang serta terhindar dari sinar matahari secara langsung. Proses adaptasi ini bertujuan agar tikus tidak stres ketika mendapat lingkungan yang baru dan tingkah laku yang tidak seperti biasanya serta pemberian makanan dan minuman yang sesuai standart.

#### 3.8.3 Pembagian Kelompok Perlakuan

Jumlah kelompok pada penelitian ini ada 5 kelompok dengan tikus pada tiap kelompok berjumlah 4 ekor. Pembagian kelompok tikus ini dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2 Pembagian kelompok perlakuan

Nama Kelompok	Perlakuan yang diberikan
Kelompok KN	Pemberian normal saline dan DMSO 10% 1 mL per sonde
Kelompok Kp1	Pemberian ekstrak daun kenitu per sonde dengan dosis 100 mg/kgBB/hari yang dilarutkan dalam DMSO 10% diikuti induksi satu kali <i>cyclophosphamide</i> 50 mg/kgBB intraperitoneal
Kelompok Kp2	Pemberian ekstrak daun kenitu per sonde dengan dosis 200 mg/kgBB/hari yang dilarutkan dalam DMSO 10% diikuti induksi satu kali <i>cyclophosphamide</i> 50 mg/kgBB intraperitoneal
Kelompok Kp3	Pemberian ekstrak daun kenitu per sonde dengan dosis 400 mg/kgBB/hari yang dilarutkan dalam DMSO 10% diikuti induksi satu kali <i>cyclophosphamide</i> 50 mg/kgBB intraperitoneal
Kelompok K-	Pemberian per sonde normal saline dan DMSO 10% 1 mL diikuti induksi satu kali <i>cyclophosphamide</i> 50 mg/kgBB intraperitoneal

#### 3.8.4 Pembuatan Ekstrak Daun Kenitu

Daun kenitu dipisahkan dari tangkainya dan diiris secara melintang, kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan tanpa terkena sinar matahari secara langsung. Daun kenitu yang sudah kering dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk kemudian ditimbang. Serbuk daun kenitu dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70% selama 72 jam. Kemudian, ekstrak diletakkan pada tabung erlenmeyer yang disaring terlebih dulu menggunakan kertas saring. Tahap terakhir, ekstrak dipisahkan dengan *rotatory evaporator* pada suhu 60 °C (Daud *et al.*, 2011; Ningsih *et al.*, 2016).

#### 3.8.5 Penginduksian *Cyclophosphamide*

Dosis yang digunakan pada tikus wistar yaitu 50 mg/kgBB intraperitoneal serta diberikan pada hari ke 15 yang diberikan hanya 1 kali (Dewi, 2014).

#### 3.8.6 Pengambilan Sampel Darah

Sampel darah diambil melalui jantung sebanyak 3 mL untuk cadangan ketika pemeriksaan hitung eritrosit terjadi kesalahan yang dilakukan pada hari ke 18. Pengambilan sampel darah dilakukan dari jantung guna efisiensi proses terminasi hewan coba.

#### 3.8.7 Pengukuran Hitung Eritrosit

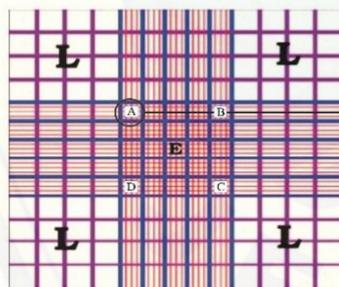
Hitung eritrosit dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Jember pada hari ke 18 dengan menggunakan kamar hitung *improved Neubauer*. Langkah-langkah yang dilakukan adalah sebagai berikut. Diawali dengan mengambil larutan Hayem sebanyak 2000 µL dan dimasukkan ke tabung reaksi. Membuang larutan Hayem dari dalam tabung reaksi sebanyak 10 µL. Kemudian mengambil darah dari tabung EDTA sebanyak 10 µL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang sudah berisi larutan Hayem diikuti homogenisasi. Homogenisasi larutan Hayem dengan darah dilakukan dengan vortex selama 3-5 menit, pengenceran yang dihasilkan dengan cara ini adalah 200

kali. Setelah itu mengisi larutan Hayem-darah ke dalam kamar hitung melalui celah antara kamar hitung dengan *cover glass* (Gandasubrata, 1999).

Setelah preparat terbentuk, langkah selanjutnya yakni menghitung jumlah eritrosit. Proses ini menggunakan metode *double blinding* dimana pemeriksa pertama dan kedua tidak mengetahui secara pasti kelompok apa yang sedang diperiksa. Pemeriksa pertama dan kedua sebelumnya telah mendapatkan arahan oleh laboran terkait cara menghitung eritrosit. Berikut langkah melakukan hitung eritrosit.

Pertama mengatur fokus terlebih dahulu dengan memakai lensa obyektif kecil (10x), kemudian lensa tersebut diganti dengan lensa objektif besar (40x) sampai garis-garis bagi dalam bidang besar tengah nampak jelas. Kemudian hitung semua eritrosit yang terdapat dalam kolom A, B, C, D, dan E secara sistematis (Gambar 3.2). Sel-sel yang menyinggung garis batas sebelah kiri dan atas dihitung sedangkan sel yang terletak dan menyinggung garis batas sebelah kanan dan bawah tidak dihitung serta proses perhitungan dilakukan secara sistematis (Gandasubrata, 1999; Kiswari, 2014).

#### KAMAR HITUNG IMPROVED NEUBAUER



Luas tiap bidang kecil; 0,05 mm x 0,05 mm, tinggi 0,1 mm,  
hitung eritrosit dalam 5 X 16 bidang kecil = 80 bidang kecil



Gambar 3.2 Kamar hitung *Improved Neubauer* dan sistematika penghitungan (Sumber: <https://image.slidesharecdn.com/56742prakt-2170517065419/95/eritro-sit-7-638.jpg?cb=1495004112>; [https://4.bp.blogspot.com/RjCJ5Yq6Xig/VvzG\\_Vf\\_eoI/AAAAAAAAAKeE/SAIkD\\_tmffcWJJO369iXrXXfmo8ZJuQ/s1600/BilikHitungImprovedNeubauer.png](https://4.bp.blogspot.com/RjCJ5Yq6Xig/VvzG_Vf_eoI/AAAAAAAAAKeE/SAIkD_tmffcWJJO369iXrXXfmo8ZJuQ/s1600/BilikHitungImprovedNeubauer.png))

### 3.9 Analisis Data

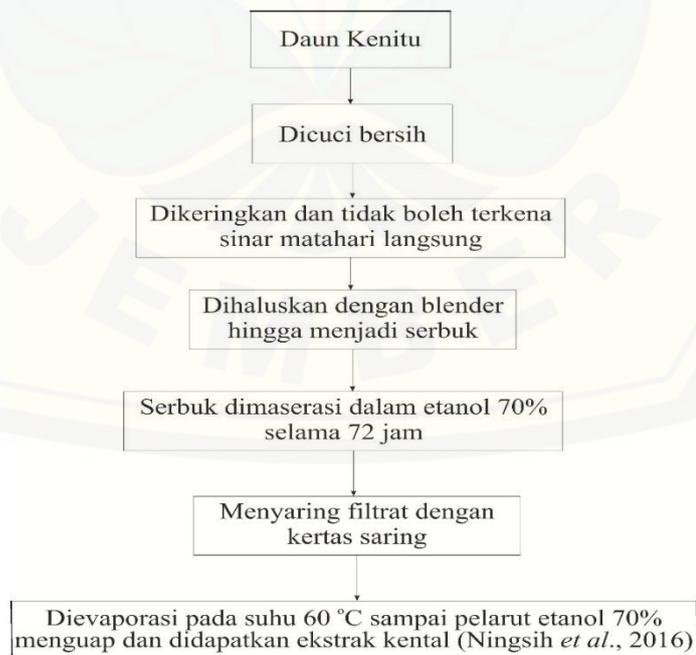
Seluruh data dianalisis dengan komputer dan dibantu perangkat lunak berupa program statistik SPSS. Uji statistik yang digunakan yaitu *One Way Anova* karena bertujuan untuk mengetahui hubungan antara pemberian ekstrak daun kenitu terhadap hitung eritrosit, sebelum dilakukan uji tersebut dilakukan uji normalitas data dengan menggunakan uji *Shapiro Wilk* karena jumlah sampel yang sedikit  $\pm 30$  dan uji *lavene* untuk uji homogenitas. Apabila data yang di dapatkan terdistribusi normal, maka dilakukan uji *One Way Anova*. Apabila data yang didapatkan terdistribusi tidak normal dilakukan tes *Kruskall Wallis*.

### 3.10 Uji Kelayakan Etik

Penelitian ini telah mendapat persetujuan etik dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember dengan nomor etik 1.142/H25.1.11/KE/2018 dan disetujui pada tanggal 22 Januari 2018 (Lampiran 3.1).

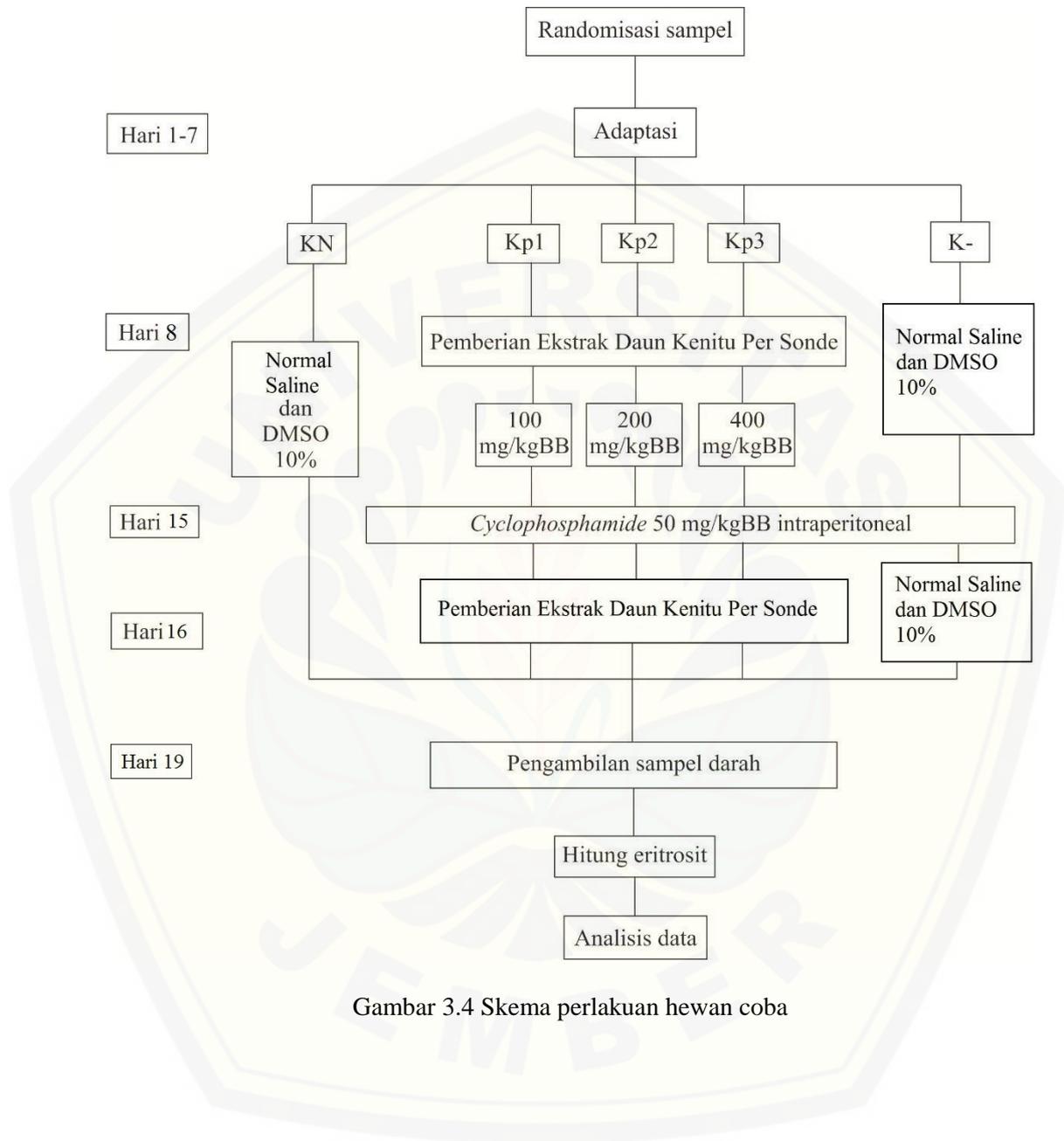
### 3.11 Alur Penelitian

#### 3.11.1 Skema Pembuatan Ekstrak Daun Kenitu



Gambar 3.3 Skema pembuatan ekstrak daun kenitu

## 3.11.2 Skema Perlakuan Hewan Coba



Gambar 3.4 Skema perlakuan hewan coba

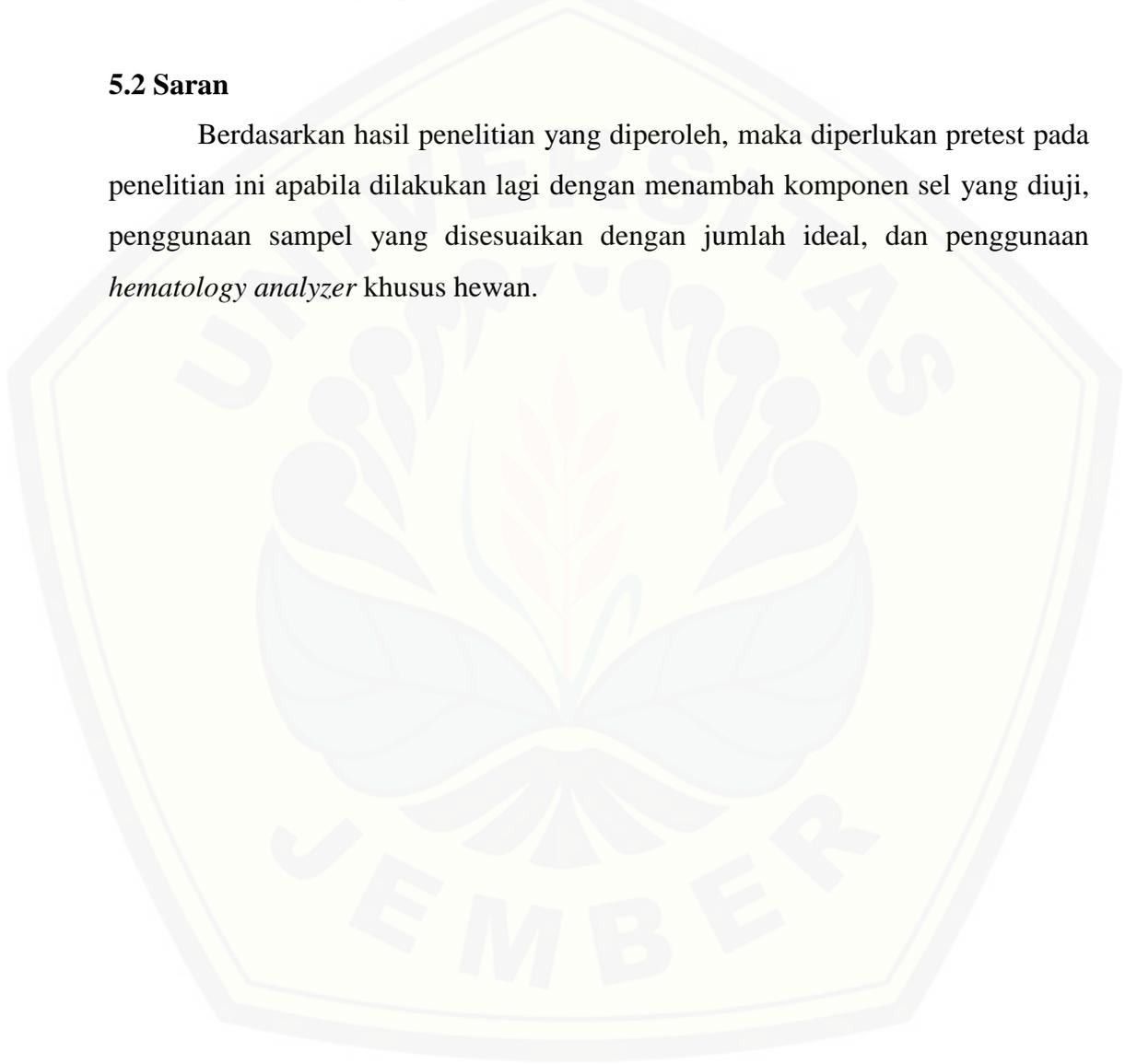
## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Tidak terdapat aktivitas ekstrak etanol daun kenitu terhadap jumlah eritrosit tikus wistar yang diinduksi *cyclophosphamide*.

### 5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, maka diperlukan pretest pada penelitian ini apabila dilakukan lagi dengan menambah komponen sel yang diuji, penggunaan sampel yang disesuaikan dengan jumlah ideal, dan penggunaan *hematology analyzer* khusus hewan.



DAFTAR PUSTAKA

- ACS. 2017. Chemotherapy for Breast Cancer. <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/chemotherapy-for-breast-cancer.html>. [Diakses pada 9 April 2018].
- Atalaya, F., O. Gulmez, dan A. O. Ugurlu. 2014. An unusual presentation of an intraosseous epidermoid cyst of the anterior maxilla: a case report. *Journal of Medical Case Reports*. 8: 252-254.
- Bagchi, K., dan S. Puri. 1998. Free radicals and antioxidants in health and disease. *East Mediterranean Health Jr*. 4: 350-360.
- Chan, K. K., P. S. Hong, K. Tutsch, dan D. L. Trump. 1994. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide and metabolites with and without SR-2508. *Cancer Research*. 54: 6421-6429.
- Cheeseman, K. H., dan T. F. Slater. 1993. An introduction to free radicals chemistry. *Br Med Bull*. 49: 481-493.
- Chen, L. J., Y. Zhang, dan Y. G. Chen. 2016. Chemical constituents of plants from the genus *Ixora*. *Chemical Biodiversity*. 13: 275-283.
- Chlebowski, R. T. 2013. Nutrition and physical activity influence on breast cancer incidence and outcome. *Breast*. 22: 30-37.
- Clegg, L. X., M. E. Reichman, B. A. Miller, B. F. Hankey, G. K. Singh, Y. D. Lin, M. T. Goodman, C. F. Lynch, S. M. Schwartz, V. W. Chen, L. Bernstein, S. L. Gomez, J. J. Graff, C. C. Linn, N. J. Johnson, dan B. K. Edwards. 2009. Impact of socioeconomic status on cancer incidence and stage at diagnosis: selected findings from the surveillance, epidemiology, and end results: national longitudinal mortality study. *Cancer Causes Control*. 20: 417-435.
- Daud, M. F., E. R. Sadiyah, dan E. Rismawati. 2011. Pengaruh perbedaan metode ekstraksi terhadap aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) berdaging buah putih. *Prosiding Seminar Nasional Penelitian dan PKM Sains, Teknologi, dan Kesehatan*. 2(1): 55-62.
- 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.

- Dewi, R. S. 2014. *Spirulina Platensis Mencegah Penurunan Komponen Darah Perifer pada Tikus (Rattus Norvegicus) yang Diberikan Cyclophosphamide*. Tesis. Denpasar: Program Pasca Sarjana Universitas Udayana.
- 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.
- Ferlay, J., I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Robelo, D. M. Parkin, D. Forman, dan F. Bray. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods, and major pattern in globocan 2012. *Int J Cancer*. 136(5): 359-386.
- Fitzmaurice C., D. Dicker, A. Pain, et al. 2015. The global burden of cancer 2013. *JAMA Oncol*. 1: 505-527.
- Freeman, B. A., dan J. D. Crapo. 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest*. 47: 412-426.
- Gandasubrata, R. 1999. *Penuntun Laboratorium Klinik*. Edisi 10. Jakarta: Dian Rakyat.
- 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.
- Guyton, A. C., dan J. E. Hall. 2007. *Textbook of Medical Physiology*. 11<sup>th</sup> Edition. Mississippi: Elsevier. Terjemahan oleh Irawati. 2007. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 11. Jakarta: EGC.
- Harrewijn, P., A. M. Van Ostein, dan P. G. M. Piron. 2001. Natural terpenoids as messengers a multidisciplinary study of their production, biological functions and practical applications. *Kluwer Academic Publishers*.
- Hattori, Y., C. Nishigori, T. Tanaka, K. Ushida, O. Nikaido, dan T. Osawa. 1997. 8 hydroxy-2-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure. *J Invest Dermatol*. 89: 10405-10409.

- Hidayat, A., Umiyah, dan E. U. Ulfa. 2007. Uji aktivitas antioksidan ekstrak air dan ekstrak metanol beberapa varietas buah kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) dari daerah Jember. *Berk. Penel. Hayati*. 13: 45-50.
- 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.
- 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. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 3(10): 501-506.
- 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.
- Kumar, S. 2014. The importance of antioxidant and their role in pharmaceutical science - a review. *Asian Journal of Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences*. 1(1): 27-44.
- 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.
- Liu, T., A. Stern, dan L. J. Roberts. 1999. The isoprostanes: novel prostaglandin-like products of the free radical catalyzed peroxidation of arachidonic acid. *J Biomed Sci*. 6: 226-235.
- Lobo, V., A. Patil, A. Phatak, dan N. Chandra. 2010. Free radicals, antioxidants, and functional foods: impact on human health. *Phcog Rev*. 4(8): 118-127.
- Loreto, F., M. Mannozi, C. Maris, P. Nascetti, F. Ferranti, dan S. Pasqualini. 2001. Ozone quenching properties of isoprene and its antioxidant role in leaves. *Plant Physiol*. 126: 993-1000.
- Lü, J. M., P. H. Lin, Q. Yao, dan C. Chen. 2010. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med*. 14(4): 840-860.

- 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.
- Mc Cord, J. M. 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.* 108: 652-659.
- Meira, N. A., L. C. Klein Jr, L. W. Rocha, Z. M. Quintal, F. D. Monache, V. C. Vilho, dan N. L. M. Quintão. 2014. Anti-inflammatory and anti-hypersensitive effects of the crude extract, fractions, and triterpenes obtained from *Chrysophyllum cainito* leaves in mice. *Journal of Ethnopharmacology.* 151: 975-983.
- Meira, N. A., L. W. Rocha, G. F. da Silva, Z. M. Quintal, F. D. Monache, V. C. Vilho, dan N. L. M. Quintão. 2016. *Chrysophyllum cainito* leaves are effective against pre-clinical chronic pain models: analysis of crude extract, fraction, and isolated compounds in mice. *Journal of Ethnopharmacology.* 184: 30-41.
- Moore, M. J. 1991. Clinical pharmacokinetics of *cyclophosphamide*. *Clinical Pharmacokinetics.* 20(3): 194-208.
- 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.
- Nimse, S. B., dan D. Pal. 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Royal Society of Chemistry.* 5: 27986-28006.
- 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. *Agriculture and Agricultural Science Procedia.* 9: 378-385.
- Oehadian, A. 2012. Pendekatan klinis dan diagnosis anemia. *Continuing Medical Education.* 39(6): 407-412.
- 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.
- Patra, K., S. Bose, S. Sarkar, J. Rakshit, S. Jana, A. Mukherjee, A. Roy, D. P. Mandal, dan S. Bhattacharjee. 2012. Amelioration of *cyclophosphamide* induced myelosuppression and oxidative stress by cinnamic acid. *Chemico-Biological Interactions.* 195: 231-239.

- Price, S.A., dan L. M. Wilson. 2002. *Pathophysiology: Clinical Concepts of Disease Processes*. Sixth Edition. St. Louis: Elsevier. Terjemahan oleh B. U. Pendit. 2005. *Patofisiologi Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Edisi 6. Jakarta: EGC.
- 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.
- Rao, A. L., M. Bharani, dan V. Pallavi. 2006. Role of antioxidants and free radicals in health and disease. *Adv Pharmacol Toxicol*. 7: 29-38.
- Rock, C. L., R. A. Jacob, dan P. E. Bowen. 1996. Update biological characteristics of the antioxidant micronutrients- vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *J Am Diet Assoc*. 96: 693-702.
- Rodgers III, G. M., P. S. Becker, M. Blinder, D. Cella, A. C. Khan, C. Cleeland, P. F. Coccia, B. Djulbegovic, J. A. Gilreath, E. H Kraut, U. A. Matulonis, M. M. Millenson, D. Reinke, J. Rosenthal, R. N. Schwartz, G. Soff, R. S. Stein, G. Vlahovic, dan A. B. Weir III. 2012. Cancer and chemotherapy induced anemia. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 10(5): 628-653.
- Shahidi, F., dan Y. Zhong. 2010. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *Eur J Lipid Sci Technol*. 112: 930-940.
- Shailajan, S., dan D. Gurjar. 2014. Pharmacognostic and phytochemical evaluation of *Chrysophyllum cainito* Linn. leaves. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 26(1): 106-111.
- Shailajan, S., dan D. Gurjar. 2016. Wound healing activity of *Chrysophyllum cainito* L. leaves: evaluation in rats using excision wound model. *J Young Pharm*. 8(2): 96-103.
- Sherwood, L. 2007. *Human Physiology: From Cells to Systems*. Sixth Edition. Shenton: Cengage Learning. Terjemahan oleh B. U. Pendit. 2011. *Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem*. Edisi 6. Jakarta: EGC.
- Simonds, J. P. 1925. The blood of normal mice. *The Anatomical Record*. 30(2): 99-106.
- Souri, E., G. Amin, H. Farsam, dan M. B. Tehrani. 2008. Screening of antioxidant activity and phenolic content of 24 medicinal plant extracts. *Daru Journal of Pharmaceutical Sciences*. 16(2): 83-87.

- Sparano, J. A. 2017. Breast Cancer Treatment Protocols. <https://emedicine.medscape.com/article/2006464-overview>. [Diakses pada 10 Oktober 2017].
- Suryavanshi, S., D. Sharma, R. Checker, M. Thoh, V. Gota, S. K. Sandur, dan K. B. Sainis. 2015. Amelioration of radiation induced hematopoietic syndrome by an antioxidant chlorophyllin through increased stem cell activity and modulation of hematopoiesis. *Free Radical Biology and Medicine*. 85: 56-70.
- Torre, L. A., F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, dan A. Jemal. 2015. Global cancer statistics 2012. *CA Cancer J Clin*. 65(2): 87-108.
- USDA. 2017. *Chrysophyllum cainito* L. Star Apple. <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=chca10>. [Diakses pada 20 Oktober 2017].
- Vander, A. J., J. H. Sherman, dan S. D. Luciano. 1994. *Human Physiology-Mechanism of Body Function*. Sixth Edition. Shenton: McGraw-Hillm.
- WHO. 2015. Breast Cancer: Prevention and Control. <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index1.html#4/1/2015>. [Diakses pada 9 April 2018].
- Wong, C. N., C. N. Wong, dan F. S. Liu. 2017. Continuous oral *cyclophosphamide* as salvage or maintenance therapy in ovarian, primary peritoneal, and fallopian tube cancers: a retrospective, single institute study. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*. 56: 302-305.
- Woo, R. A., K. G. Melure, dan P. W. Lee. 1998. DNA dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature*. 394: 700-704.
- 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.
- Yahia, E.M., 2011. *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits: Mangosteen to White Sapote*. 4<sup>th</sup> ed. Mexico: Woodhead Publishing.
- Young, I. S., dan J. V. Woodside. 2001. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*. 54: 176-186.

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.



*Lampiran-lampiran***Lampiran 3.1 Determinasi Tanaman Kenitu**

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
FAKULTAS PERTANIAN  
Jl. Kalimantan No. 37 Kampus Bumi Tegalboto, Telp (0331) 334054, 339596 Jember 68121  
Fax.: (0331) 338422, e-mail: [admin.faperta@unej.ac.id](mailto:admin.faperta@unej.ac.id)

Nomor : 0001/UN25.1.3/PS.8/2018 02 Desember 2018  
Lampiran : 2 (dua) lembar  
Hal : Hasil Identifikasi Tanaman

Yth. : **Wakil DEKAN I**  
Fakultas Kedokteran  
Universitas Jember

Menindaklanjuti surat saudara Nomor: 2550/UN25.1.11/LT/2017, tanggal 21 Desember 2017 tentang Permohonan Ijin Penelitian untuk identifikasi tanaman, maka bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi morfologis 1 (satu) set contoh tanaman yang terdiri dari organ daun, ranting, buah dan biji (terlampir) dalam rangka penyusunan skripsi, atas nama:

Nama : **Heri Puguh Widodo**  
N.I.M. : **142010101020**

Atas kepercayaannya disampaikan terimakasih.

M. D. O



Wakil Dekan I,

Ir. Kaden Soedradjad, M.T.  
MIP. 195707181984031001

**Tembusan:**

1. Mahasiswa yang bersangkutan

## HASIL IDENTIFIKASI MORFOLOGIS CONTOH TUMBUHAN

1.	<b>MORFOLOGI DAUN</b>	
	a. Bangun Daun	Memanjang ( <i>oblongus</i> ).
	b. Tepi Daun	Rata ( <i>integer</i> ).
	c. Pangkal Daun	Meruncing ( <i>acuminatus</i> ).
	d. Ujung Daun	Runcing ( <i>acutus</i> ).
	e. Tulang Daun	Menyirip ( <i>penninervis</i> ).
	f. Permukaan Atas	Licin ( <i>laevis</i> ) berwarna hijau cerah.
	g. Permukaan Bawah	Berbul halus dan berwarna coklat-keemasan.
	h. Bentuk Tangkai Daun	Bulat Telur.
	i. Duduk Daun	Berseling dan memencar.
	j. Jenis Daun	Tunggal ( <i>folium simplex</i> ).
2.	<b>MORFOLOGI BATANG (dari Foto)</b>	
	a. Bentuk Batang	Silindris.
	b. Permukaan Batang	Kasar berwarna coklat.
	c. Arah Tumbuh	Tegak ke atas.
	d. Percabangan	Monopodial (batang pokok tampak jelas)
3.	<b>MORFOLOGI AKAR</b>	Akar tanaman tidak disertakan sehingga tidak teridentifikasi.
4.	<b>MORFOLOGI BUNGA</b>	Bunga tanaman tidak disertakan sehingga tidak teridentifikasi.
5.	<b>MORFOLOGI BUAH</b>	a. Buah buni ( <i>bacca</i> ). b. Bentuk buah bulat telur sunsang. c. Kulit buah licin berwarna hijau. d. Kulit buah agak liat dan banyak mengandung getah. e. Daging buah berwarna putih dan lembut.
6.	<b>MORFOLOGI BIJI</b>	a. Biji berbentuk pipih agak bulat telur. b. Biji keras dan berwarna agak keunguan.
7.	<b>MODIFIKASI ORGAN</b>	
	a. Jenis Modifikasi	Tidak ada.
	b. Lain-Lain	Tidak ada.

Pemohon Identifikasi: Heri Puguh Widodo (NIM. 142010101020)

**Kesimpulan:**

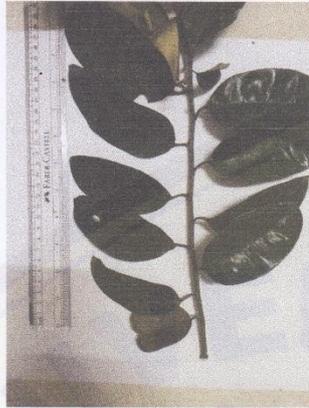
Berdasar ciri morfologis yang ada, khususnya pada karakter organ ranting, daun, buah dan biji, tumbuhan tersebut benar tumbuhan **Kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.)** dari **Famili Sapotaceae** atau dalam bahasa daerah disebut sawo hejo (sunda), sawo manila (Lampung).

Jember, 02 Januari 2018  
Pelaksana Identifikasi  
PLP Laboratorium Agronomi,



Muhammad Sugiono  
NIP. 196712182001121001

Tanaman yang di Identifikasi



Susunan Daun pada Tangkai



Permukaan bagian Bawah (kiri) dan Atas (kanan)

Gambar 1. DAUN TANAMAN



Gambar 2. BATANG



Gambar 3. BUAH DAN BIJI

Jember, 02 Januari 2018  
Pelaksana Identifikasi  
PLP Laboratorium Agronomi,

Muhammad Sugiono  
NIP. 196712182001121001

## Lampiran 3.2 Etik Penelitian



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI

UNIVERSITAS JEMBER

KOMISI ETIK PENELITIAN

Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121 – Email :  
fk\_unej@telkom.net**KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK**  
*ETHICAL APPROVA*

Nomor : 1.142 /H25.1.11/KE/2018

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

*The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :*

**EFEKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL DAUN KENITU (*Chrysophyllum cainito L.*) TERHADAP HITUNG ERITROSIT TIKUS WISTAR YANG DIINDUKSI CYCLOPHOSPHAMIDE**

Nama Peneliti Utama : Heri Puguh Widodo  
*Name of the principal investigator*

NIM : 142010101020

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember  
*Name of institution*

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.  
*And approved the above mentioned proposal.*

Jember, 22 Dec Januari 2018  
Ketua Komisi Etik Penelitian



Dr. Rini Riyanti, Sp.PK

**Tanggapan Anggota Komisi Etik**

(Diisi oleh Anggota Komisi Etik, berisi tanggapan sesuai dengan butir-butir isian diatas dan telaah terhadap Protokol maupun dokumen kelengkapan lainnya)

**Review Proposal :**

1. Pemilihan, perawatan, perlakuan, pengorbanan dan pemusnahan hewan coba mengacu pada buku pedoman etik penelitian kesehatan ( Penggunaan hewan coba dengan prinsip 3R : *Reduced, Reused, Redefined*)
2. Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan ekstrak etanol daun kenitu agar didapatkan kadar yang sesuai.
3. Mohon diperhatikan kontrol kualitas perhitungan eritrosit.
4. Mohon diperhatikan pembuangan limbah medis dan limbah B3 agar tidak mencemari lingkungan.

Jember, 19 Januari 2018



Dr. Rini Riyanti, Sp.PK

## Lampiran 4.1 Tabel Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas

## Tests of Normality

Kelompok		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Jumlah Eritrosit	Normal	.258	4	.	.884	4	.358
	Negatif	.271	4	.	.855	4	.243
	ekstrak kenitu 100 mg	.249	4	.	.911	4	.487
	ekstrak kenitu 200 mg	.245	4	.	.902	4	.442
	ekstrak kenitu 400 mg	.334	4	.	.848	4	.218

a. Lilliefors Significance Correction

## Test of Homogeneity of Variances

Jumlah Eritrosit

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.315	4	15	.864

## Lampiran 4.2 Data Penelitian

## ANOVA

Jumlah Eritrosit					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.053E13	4	1.013E13	4.375	.015
Within Groups	3.474E13	15	2.316E12		
Total	7.528E13	19			

## Post Hoc Tests

## Multiple Comparisons

Jumlah Eritrosit

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Normal	Negatif	2.1125E6	1.0762E6	.068	-181308.047	4406308.047
	ekstrak kenitu 100 mg	2.6450E6*	1.0762E6	.027	351191.953	4938808.047
	ekstrak kenitu 200 mg	4.1688E6*	1.0762E6	.001	1874941.953	6462558.047
	ekstrak kenitu 400 mg	998750.0000	1.0762E6	.368	-1.295E6	3292558.047
Negatif	Normal	-2.1125E6	1.0762E6	.068	-4.406E6	181308.047
	ekstrak kenitu 100 mg	532500.0000	1.0762E6	.628	-1.761E6	2826308.047
	ekstrak kenitu 200 mg	2.0562E6	1.0762E6	.075	-237558.047	4350058.047
	ekstrak kenitu 400 mg	-1.1138E6	1.0762E6	.317	-3.408E6	1180058.047
ekstrak kenitu 100 mg	Normal	-2.6450E6*	1.0762E6	.027	-4.939E6	-351191.953

	Negatif	-532500.0000	1.0762E6	.628	-2.826E6	1761308.047
	ekstrak kenitu 200 mg	1.5238E6	1.0762E6	.177	-770058.047	3817558.047
	ekstrak kenitu 400 mg	-1.6462E6	1.0762E6	.147	-3.940E6	647558.047
ekstrak kenitu 200 mg	Normal	-4.1688E6*	1.0762E6	.001	-6.463E6	-1.875E6
	Negatif	-2.0562E6	1.0762E6	.075	-4.350E6	237558.047
	ekstrak kenitu 100 mg	-1.5238E6	1.0762E6	.177	-3.818E6	770058.047
	ekstrak kenitu 400 mg	-3.1700E6*	1.0762E6	.010	-5.464E6	-876191.953
ekstrak kenitu 400 mg	Normal	-998750.0000	1.0762E6	.368	-3.293E6	1295058.047
	Negatif	1.1138E6	1.0762E6	.317	-1.180E6	3407558.047
	ekstrak kenitu 100 mg	1.6462E6	1.0762E6	.147	-647558.047	3940058.047
	ekstrak kenitu 200 mg	3.1700E6*	1.0762E6	.010	876191.953	5463808.047

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

**Lampiran 4.3 Tabel Dosis Ekstrak Daun Kenitu**

Kelompok	Nomor perlakuan	Berat badan (g)	Dosis ekstrak etanol daun kenitu	Volume Normal Saline dan DMSO 10% yang disondekan (mL)
KN	1	165 g	-	1 mL
	2	160 g	-	1 mL
	3	158 g	-	1 mL
	4	179 g	-	1 mL
K-	1	153 g	-	1 mL
	2	161 g	-	1 mL
	3	154 g	-	1 mL
	4	153 g	-	1 mL
Kp1	1	154 g	10.25 mg	1 mL
	2	151 g	10.75 mg	1 mL
	3	157 g	9 mg	1 mL
	4	153 g	11.9 mg	1 mL
Kp2	1	156 g	22.2 mg	1 mL
	2	145 g	21 mg	1 mL
	3	148 g	19.8 mg	1 mL
	4	150 g	20.8 mg	1 mL
Kp3	1	170 g	46 mg	1 mL
	2	210 g	38 mg	1 mL
	3	164 g	43 mg	1 mL
	4	160 g	40.2 mg	1 mL

**Lampiran 4.4 Tabel Dosis Cyclophosphamide**

Kelompok	Nomor perlakuan	Berat badan (g)	Dosis Cyclophosphamide 50 mg/kgBB	Volume yang diinjeksikan dalam normal saline (mL)
KN	1	165 g	-	1 mL
	2	160 g	-	1 mL
	3	158 g	-	1 mL
	4	179 g	-	1 mL
K-	1	153 g	7,65 mg	1 mL
	2	161 g	8,05 mg	1 mL
	3	154 g	7,7 mg	1 mL
	4	153 g	7,65 mg	1 mL
Kp1	1	154 g	7,7 mg	1 mL
	2	151 g	7,55 mg	1 mL
	3	157 g	7,85 mg	1 mL
	4	153 g	7,65 mg	1 mL
Kp2	1	156 g	7,8 mg	1 mL
	2	145 g	7,25 mg	1 mL
	3	148 g	7,4 mg	1 mL
	4	150 g	7,5 mg	1 mL
Kp3	1	170 g	8,5 mg	1 mL
	2	210 g	10,5 mg	1 mL
	3	164 g	8,2 mg	1 mL
	4	160 g	8 mg	1 mL

**Lampiran 4.5 Tabel Jumlah Eritrosit**

Kelompok	Nomor Perlakuan	Berat Badan (g)	Jumlah Eritrosit (/mm <sup>3</sup> )
KN	1	165 g	7.030.000
	2	160 g	6.050.000
	3	158 g	5.590.000
	4	179 g	9.600.000
K-	1	153 g	4.150.000
	2	161 g	6.450.000
	3	154 g	4.900.000
	4	153 g	4.320.000
Kp1	1	154 g	5.275.000
	2	151 g	2.740.000
	3	157 g	5.525.000
	4	153 g	4.150.000
Kp2	1	156 g	5.085.000
	2	145 g	1.830.000
	3	148 g	1.530.000
	4	150 g	3.150.000
Kp3	1	170 g	5.700.000
	2	210 g	8.600.000
	3	164 g	5.330.000
	4	160 g	4.645.000

**Lampiran 4.6 Jumlah Eritrosit Awal**

Kelompok	Nomor Perlakuan	Berat Badan (g)	Jumlah	Jumlah
			Eritrosit (/mm <sup>3</sup> ) Pengamat 1	Eritrosit (/mm <sup>3</sup> ) Pengamat 2
KN	1	165 g	7.100.000	6.960.000
	2	160 g	6.090.000	6.010.000
	3	158 g	5.500.000	5.680.000
	4	179 g	9.820.000	9.380.000
K-	1	153 g	4.110.000	4.190.000
	2	161 g	6.520.000	6.380.000
	3	154 g	4.950.000	4.850.000
	4	153 g	4.380.000	4.260.000
Kp1	1	154 g	5.350.000	5.200.000
	2	151 g	2.780.000	2.700.000
	3	157 g	5.400.000	5.650.000
	4	153 g	4.110.000	4.190.000
Kp2	1	156 g	5.170.000	5.000.000
	2	145 g	1.800.000	1.860.000
	3	148 g	1.560.000	1.500.000
	4	150 g	3.130.000	3.170.000
Kp3	1	170 g	5.750.000	5.650.000
	2	210 g	8.610.000	8.590.000
	3	164 g	5.110.000	5.550.000
	4	160 g	4.640.000	4.650.000

Lampiran 4.7 Dokumentasi



Ekstrak daun kenitu



Ekstrak daun kenitu dilarutkan ke DMSO 10% dan normal saline



Proses Adaptasi



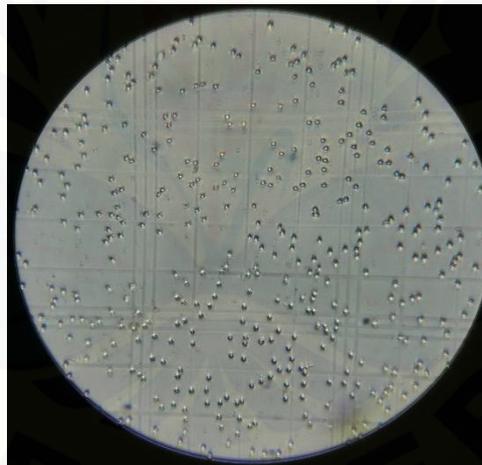
Pemberian *cyclophosphamide* intraperitoneal



Pemberian ekstrak daun kenitu persone



Sample Darah



Perhitungan jumlah eritrosit