

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Doksorubisin merupakan antibiotik golongan antrasiklin yang banyak digunakan untuk terapi berbagai macam jenis kanker seperti leukemia akut, kanker payudara, kanker tulang dan ovarium (Childs *et al.*, 2002). Mekanisme aksi doksorubisin yaitu berinterkalasi dengan DNA melalui enzim topoisomerasi II sehingga menghambat replikasi dan transkripsi DNA menjadi RNA. Interkalasi ini menyebabkan penghambatan siklus sel di fase G1 dan G2 kemudian diikuti apoptosis (Minotti *et al.*, 2004).

Aplikasi terapi doksorubisin memiliki beberapa masalah seperti toksik terhadap jaringan normal selain sel kanker, kecenderungan muncul resistensi dan adanya efek samping *cardiomyopati*, *congestive heart failure* (Minotti *et al.*, 2004) dan nefrotoksik. Doksorubisin menyebabkan efek samping nefrotoksik akibat adanya *reactive oxygen species* (ROS). ROS merusak sel sel tubulus proksimal, endotel, membran basalis dan glomerulus sehingga menyebabkan glomeruskloresis, interstitial fibrosis dan albuminuria (Purwanto, 2011).

Pemberian doksorubisin *single dose* pada dosis 15 mg/kg BB pada tikus terbukti meningkatkan kadar serum kreatinin dan kadar *blood urea nitrogen* (BUN) serta kadar *malondialdehyde* hasil dari lipid peroksidasi. Selain itu, menurunkan beberapa aktivitas enzim *superoxide dismutase* (SOD), *catalase*

(CAT) dan *reduced glutathione* (GSH) pada ginjal (Shinde *et al.*, 2010). Kadar GSH yang rendah akibat induksi doksorubisin dapat menyebabkan keadaan *stress oxidative* (Ayla *et al.*, 2011). Doksorubisin mampu menyebabkan efek nefrotoksik dengan parameter kadar protein urin, albumin dan kolesterol yang lebih tinggi, serta *Glomerular filtration rate* yang lebih rendah dari kadar normalnya (Venkatesan *et al.*, 2000).

Salah satu upaya pencegahan efek samping doksorubisin akibat adanya ROS yaitu dengan pemberian antioksidan dari bahan alam. Ekstrak etanol herba alfalfa memiliki senyawa aktif antara lain flavonoid, kumarin dan alkaloid (Susilowati *et al.*, 2014). Menurut penelitian Rana *et al.*, (2010) ekstrak alkohol akar alfalfa memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} 100,38 $\mu\text{g/ml}$. Penelitian Widyowati *et al.*, (2014) menyatakan bahwa ekstrak etanol herba alfalfa memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 59,339 $\mu\text{g/ml}$ dan senyawa yang diduga berkhasiat sebagai antioksidan adalah flavonoid. Mekanisme Flavonoid sebagai antioksidan berhubungan dengan kemampuannya mendonorkan atom hidrogen pada radikal bebas sehingga radikal bebas dapat berkurang (Sandhar *et al.*, 2010).

Penelitian Susilowati dan Rosyidah (2008) menyebutkan bahwa ekstrak etanolik herba alfalfa yang mengandung flavonoid mempunyai efek antiinflamasi dengan mekanisme menghambat asam arakhidonat yang memproduksi prostaglandin. Penelitian lain menyebutkan bahwa kurkumin mampu memproteksi kerusakan ginjal yang diinduksi doksorubisin. Hal ini berkaitan dengan aktivitas kurkumin sebagai antioksidan dan antiinflamasi

(Venkatesan *et al.*, 2000). Pemberian *Lepidium sativum* memiliki efek proteksi terhadap nefrotoksik doksorubisin dengan jalan meningkatkan status antioksidan dalam ginjal (Shinde *et al.*, 2010).

Penelitian ekstrak herba alfalfa terhadap efek nefroprotektif yang disebabkan toksisitas doksorubisin belum pernah dilakukan sebelumnya, namun hasil uji toksisitas yang dilakukan oleh Ahmad *et al.*, (2013) bahwa alfalfa tidak memiliki efek buruk pada hati dan ginjal tikus. Dengan adanya bukti aktivitas antioksidan, antiinflamasi dan keamanan ekstrak herba alfalfa, maka diduga herba alfalfa mampu menghambat efek nefrotoksik doksorubisin.

B. Perumusan Masalah

1. Apakah doksorubisin yang diberikan dengan dosis 0,14 mg/20 g BB pada hari ke- 1, 5, 9 dan 13 mampu menyebabkan efek nefrotoksik?
2. Apakah ekstrak etanol herba alfalfa mampu menghambat efek nefrotoksik pada mencit yang diinduksi dengan doksorubisin?

C. Tujuan Penelitian

1. Membuktikan bahwa doksorubisin yang diberikan dengan dosis 0,14 mg/20 g BB pada hari ke-1, 5, 9 dan 13 mampu menyebabkan efek nefrotoksik.
2. Membuktikan bahwa ekstrak etanol herba alfalfa mampu menghambat efek nefrotoksik pada mencit yang diinduksi doksorubisin.

D. Manfaat penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan bukti ilmiah mengenai manfaat ekstrak etanol herba alfalfa sebagai nefroprotektif dalam mengurangi efek

nefrotoksik akibat penggunaan doksorubisin pada terapi pengobatan kanker payudara.

E. Tinjauan Pustaka

1. Tanaman Alfalfa

a. Klasifikasi

Kedudukan herba alfalfa (*Medicago sativa* L.) dalam sistematika tanaman (taksonomi) adalah sebagai berikut :



Kingdom	:	Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom	:	Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi	:	Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi	:	Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	:	Mognoliopsida (berkeping dua/ Dikotil)
Sub Kelas	:	Rosidae
Ordo	:	Fabales
Famili	:	Fabaceae (suku polong-polongan)
Genus	:	<i>Medicago</i>
Spesies	:	<i>Medicago sativa</i> L.

(Backer dan Bakhuizen, 1968).

b. Morfologi

Tanaman perdu yang saat masih kecil bisa digunakan sebagai tanaman hias. Bisa hidup hingga umur 12 tahun dan mencapai ketinggian 2 meter

(Rahmayanti dan Sitanggang, 2006). Akar alfalfa dapat mencapai 4,5 m sehingga tahan dalam menghadapi musim kering/panas (Sajimin, 2011). Alfalfa memiliki batang tegak dan halus yang tumbuh sampai 45-100 cm. Bunga alfalfa memiliki warna kuning sampai biru keunguan dengan panjang 9-10 mm dan membujur. Buah alfalfa berbentuk polong bulat yang dibagian tengah berongga dan tidak berduri.

Morfologi herba alfalfa dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Morfologi Herba Alfalfa (Christopher, 2006)

c. Kandungan Kimia

Tanaman alfalfa terutama bagian daun dan batang memiliki nilai nutrisi yang tinggi, bagian daun memiliki protein dan serat tinggi. Selain itu alfalfa juga mengandung flavonoid (*apigenin*, *glikosida*, *luteolin*, *adenosine*), senyawa fitoestrogen (isoflavonoid) yaitu *coumestrol*, *biochanin*, *daidzin* (Sajimin, 2011). Alfalfa memiliki kandungan klorofil dan pigmen xanthofil serta vitamin A, B1, B2, C, D, E serta vitamin K (Rahmayanti dan Sitanggang, 2006).

Alfalfa memiliki kandungan kimia penting seperti pati, karbohidrat, protein (histon dan L-lisin, L-arginin, aspartat dan asam glutamate) dan

asam amino non protein (L-canaverin), tannin, pectin, amina, triterpen glikosida, karotenoid, basa purin. Selain itu juga mengandung senyawa flavon, alkaloid, tannin dan senyawa fenolik, apegenin, glikosida (Joy and George, 2014; Golawska *et al.*, 2010). Tanaman ini juga memiliki 2-3 % saponin, flavon, sterol, turunan kumarin, flavonoid (Jasjeet *et al.*, 2011; Susilowati, 2014; Fazliza, 2013).

d. Khasiat Tanaman

Alfalfa secara empiris digunakan untuk mengobati rematik, arthritis, merangsang nafsu makan, tonikum, menyerap kelebihan kolesterol bahkan mengobati diabetes (Jasjeet *et al.*, 2011).

Ekstrak etanol herba alfalfa mempunyai aktivitas imunostimulator pada konsentrasi 100 µg/mL (Fitriani, 2013). Kandungan saponin pada ekstrak kasar herba alfalfa terbukti memiliki efek antineoplastik pada sel kanker (Wahed, 2009). Kandungan flavonoid pada fraksi etil asetat ekstrak etanol herba alfalfa memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan IC₅₀ 1893,4 µg/ml (Hidayati, 2011). Hasil penelitian Susilowati *et al.*, 2012 menyatakan bahwa fraksi *n*-heksana ekstrak etanol herba alfalfa memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D dengan nilai IC₅₀ 523,9 µg/ml dan sel HeLa dengan nilai IC₅₀ 503,5 µg/ml. Fraksi *n*-heksana ekstrak etanol herba alfalfa mengandung senyawa kumarin dan flavonoid.

Penelitian Susilowati dan Rosyidah (2008) kandungan flavonoid dalam ekstrak etanol alfalfa juga terbukti memiliki efek antiinflamasi. Ekstrak etanol alfalfa juga terbukti memiliki khasiat sebagai antioksidan

(Widyowati, 2014; Rana, 2010). Ekstrak etanol Alfalfa terbukti memiliki efek antipiretik (Wulan et al., 2015). Ekstrak etanol batang alfalfa memiliki efek kardioprotektif pada tikus wistar yang diinduksi dengan isoproterenol (Gomathi *et al.*, 2014).

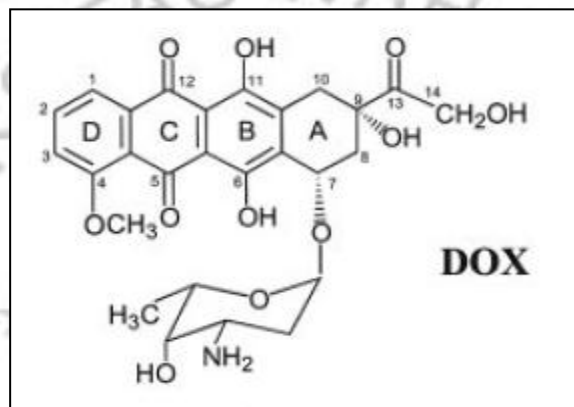
2. Doksorubisin

Doksorubisin adalah suatu antibiotik golongan antrasiklin yang paling banyak digunakan pada berbagai macam jenis kanker seperti leukemia akut, kanker payudara, kanker tulang dan ovarium (Childs *et al.*, 2002). Mekanisme aksi doksorubisin dapat berinterkalasi dengan DNA melalui enzim topoisomerasi II sehingga menghambat replikasi dan transkripsi DNA menjadi RNA. Interkalasi ini menyebabkan penghambatan siklus DNA di fase G1 dan G2 kemudian diikuti apoptosis (Minotti *et al.*, 2004).

Dosis lazim penggunaan doksorubisin yaitu 60-75 mg/m² sebagai dosis tunggal secara iv selama 21 hari. Penggunaan doksorubisin menyebabkan beberapa efek samping seperti mielosupresi dan kardi toksik, alopesia, gangguan ginjal, reaksi hipersensitivitas, nekrosis jaringan dan selulitis berat (Anonim, 2008).

Doksorubisin dimetabolisme di hati. Semua golongan antrasiklin dikonversi menjadi intermediet alkohol aktif yang berperan penting dalam aktivitas terapeutik. Doksorubisin dengan cepat masuk ke dalam hati, ginjal, paru-paru dan limpa. Klirens doksorubisin diperlambat pada pasien disfungsi hepar dan perlu dilakukan pengurangan dosis 50% dari dosis normal (Brunton *et al.*, 2005).

Efek samping berbahaya penggunaan doksorubisin adalah *cardiomyopathy* dan *congestive heart failure*. Kardi toksisitas doksorubisin tersebut berkorelasi positif dengan dosis kumulatif yang diberikan, sehingga efektivitas pemanfaatan doksorubisin terbatas oleh dosis dan lama pemberian. Guna meminimalkan risiko *disfungsi* jantung yang *irreversible* disarankan dosis doksorubisin tidak melebihi 500 mg/m² permukaan tubuh (Singal *et al.*, 2001). Struktur kimia doksorubisin dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Struktur doksorubisin (Minotti *et al.*, 2004)

3. Nefrotoksik Doksorubisin

Nefrotoksik doksorubisin ditandai dengan adanya glomerulosklerosis, interstisial fibrosis dan albuminuria. Mekanisme doksorubisin menyebabkan efek nefrotoksik melalui ikatan dengan reseptor membrane sel tubulus proksimal kemudian merangsang enzim NADPH yang berada pada mitokondria sehingga membentuk *Reactive oxygen spesies* (ROS). ROS akan merusak sel-sel tubulus proksimal, endotel, membran basalis maupun glomerulus. Sel-sel yang rusak akan membentuk *debris*. *Debris* akan mengaktifkan makrofag, lewat *TLR-4*, sehingga makrofag mengekspresikan

sitokin-sitokin TNF- α 1, TGF- β 1, IL-1 β , IL-6 dan IL-8 (Tamaki *et al.*, 1994: Wang dan Wang, 2001 *cit* Purwanto, 2011).

Hasil penelitian Shinde *et al.*, (2010) melaporkan pemberian doksorubisin *single dose* pada dosis 15 mg/kg BB terbukti menyebabkan gagal ginjal akut sehingga fungsi ginjal untuk mengekskresikan zat-zat buangan menjadi berkurang akibatnya kadar kreatinin dan BUN dalam darah menjadi meningkat. Adanya radikal bebas akibat reaksi doksorubisin dengan reseptor menyebabkan menurunnya aktivitas enzim *superoxide dismutase* (SOD), *catalase* (CAT), *reduced glutathione* yang berfungsi sebagai antioksidan didalam tubuh.

Pembentukan ROS dalam mitokondria diawali dengan satu elektron dari cincin C doksorubisin bereaksi dengan oksigen dibantu dengan enzim NADPH (sitokrom P450, *mitochondrial NADPH reductase*, *xanthine dehydrogenase*, *endothelial nitric oxide synthase*) menghasilkan ROS seperti anion superoksida dan hidrogen peroksida. Siklus semiquinon dapat mengoksidasi ikatan antara cincin A dan daunosamine menghasilkan 7-deoksiaglikon yang dapat meningkatkan solubility lipid, interkalasi aglikon dalam membran biologi dan bentuk ROS merupakan target sensitivitas (Minotti *et al.*, 2004).

4. Metode Penetapan Kadar Kreatinin

Kreatinin adalah suatu produk penguraian otot. Kreatinin disekresikan oleh ginjal melalui kombinasi filtrasi dan sekresi. Kadar yang lebih besar daripada nilai yang telah ditetapkan mengisyaratkan adanya penyakit ginjal.

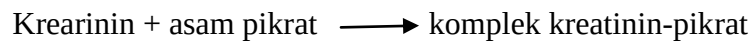
Kreatinin serum merupakan indikator kuat bagi fungsi ginjal. Peningkatan dua kali lipat kadar kreatinin serum mengindikasikan penurunan fungsi ginjal sebesar 50%. Demikian juga, peningkatan kadar kreatinin tiga kali lipat mengisyaratkan penurunan fungsi ginjal 75% (Corwin, 2001).

Pada wanita dewasa rentang normal kreatinin kisaran 0,6 mg/dL-1,1 mg/dL atau 53-97 $\mu\text{mol/L}$ dan pada laki-laki dewasa kisaran 0,9 mg/dL-1,3 mg/dL atau 80-115 $\mu\text{mol/L}$ (Anonim, 2009).

Metode penetapan kreatinin dapat dilakukan melalui dua cara yaitu metode kimia (reaksi jaffe) dan enzimatik. Pengukuran kreatinin pertama kali dilaporkan oleh Jaffe pada tahun 1886. Sejalan dengan kemajuan teknologi hingga saat ini banyak dilakukan perkembangan dan modifikasi dari metode jaffe untuk mendapatkan pengukuran yang akurat (Husdan and Repoport, 1968). Metode jaffe yang telah dimodifikasi antara lain metode jaffe *Uncompensated* dan *rate-blanked compensated* (Widyastiti, 2005).

Prinsip metode jaffe yaitu berdasarkan reaksi kreatinin dengan asam pikrat dalam suasana basa menghasilkan kompleks pikrat-kreatinin berwarna oranye yang memberikan serapan maksimal pada panjang gelombang 490-500 nm yang diukur secara spektrofotometri. Metode jaffe memiliki kekurangan yaitu kurangnya spesifik karena reagen pikrat mampu bereaksi dengan substansi interferensi seperti keton, bilirubin dan obat turunan sefalosporin (Marshall, 2012). Namun, metode jaffe memiliki kelebihan yaitu mudah, cepat dan jumlah sampel yang digunakan sedikit.

Reaksi penetapan kadar kreatinin :



(Anonim, 2009).

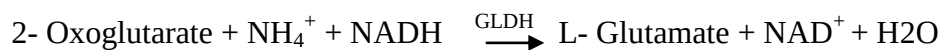
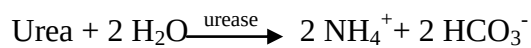
Metode enzimatik yaitu suatu metode yang menggunakan enzim kreatininase yang akan mengkatalisis konversi kreatinin menjadi kreatin (Marshall, 2012). Metode enzimatik lebih spesifik dibandingkan metode jaffe. Metode enzimatik tidak terpengaruh dengan substansi interferensi. Namun, metode enzim lebih mahal, dan membutuhkan reaksi yang lebih lama dibandingkan metode lainnya sehingga metode tersebut tidak dipergunakan pada laboratorium klinik di Indonesia (Widyastiti, 2005).

5. Metode Penetapan Kadar *Blood urea nitrogen* (BUN)

Urea adalah produk akhir metabolisme protein yang mengandung nitrogen. Salah satu tugas penting ginjal adalah untuk mengeliminasi urea dari tubuh. Pada penurunan fungsi ginjal, kadar *Blood Urea Nitrogen* meningkat (Corwin, 2001). Peningkatan BUN dapat disebabkan oleh obat atau logam yang bersifat nefrotoksik yang dikategorikan dalam gagal ginjal akut (Renal) (Sacher *et al.*, 2004). Rentang normal nitrogen urea dalam darah atau serum adalah 5 sampai 20 mg / dl , atau 1,8-7,1 mmol urea per liter. Kisaran luas karena adanya faktor variasi normal seperti asupan protein, katabolisme protein endogen, keadaan hidrasi, sintesis urea hati, dan ekskresi urea ginjal (Hosten, 1990).

Ada dua metode umum untuk pengukuran nitrogen urea yaitu reaksi diacetyl atau Fearon dan enzimatik. Metode reaksi diacetyl berdasarkan reaksi kromogen dan urea yang diukur dengan alat fotometri, metode ini memiliki

spesivitas yang rendah. Metode pengukuran urea yang spesifik dibandingkan metode lainnya yaitu metode enzimatik (Hosten, 1990). Reaksi pengukuran kadar urea melalui reaksi enzimatik:



Prinsip metode enzimatik yaitu enzim urease yang akan mengkonversi urea menjadi amonia dan asam karbonat. Kemudian enzim glutamat dehidrogenase mengubah ammonia menjadi L-Glutamat yang akan memberikan serapan pada spektrofotometer.

(Anonim, 2009).

F. Landasan Teori

Doksorubisin dapat menyebabkan efek nefrotoksik melalui ikatan dengan reseptor membrane sel tubulus proksimal kemudian merangsang enzim NADPH yang berada pada mitokondria sehingga membentuk *Reactive oxygen spesies* (ROS). ROS akan merusak sel-sel tubulus proksimal, endotel, membran basalis maupun glomerulus. Sel-sel yang rusak akan membentuk *debris*. *Debris* akan mengaktifkan makrofag, lewat *TLR-4*, sehingga makrofag mengekspresikan sitokin-sitokin $\text{TNF-}\alpha$ 1, $\text{TGF-}\beta$ 1, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 dan IL-8 (Tamaki *et al.*, 1994; Wang dan Wang, 2001 *cit* Purwanto, 2011).

Pemberian doksorubisin *single dose* pada dosis 15 mg/kg BB pada tikus terbukti menyebabkan efek nefrotoksik dengan adanya peningkatan kadar serum kreatinin dan kadar *blood urea nitrogen* (BUN). Selain itu, menurunkan beberapa aktivitas enzim *superoxide dismutase* (SOD), *catalase* (CAT),

reduced glutathione (GSH) pada ginjal yang diperantarai adanya radikal bebas (shinde *et al.*, 2010).

Kandungan senyawa aktif dalam ekstrak etanol herba alfalfa antara lain flavonoid dengan kadar 8,13 %, kumarin dengan kadar 48,86 ppm dan alkaloid dengan kadar 229, 83 ppm (Susilowati *et al.*, 2014). Beberapa penelitian membuktikan bahwa senyawa flavonoid yang terkandung dalam alfalfa memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ 100,38 µg/ml (Rana *et al.*, 2010). Penelitian lain yang dilakukan Widyowati (2014) menyatakan bahwa ekstrak etanol herba alfalfa memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 59,339 µg/ml. Mekanisme flavonoid sebagai antioksidan berhubungan dengan kemampuannya mendonorkan atom hidrogen pada radikal bebas sehingga radikal bebas dapat berkurang (Sandhar *et al.*, 2010). Ekstrak etanol herba alfalfa juga dilaporkan memiliki aktivitas antiinflamasi karena kemampuannya menghambat asam arakhidonat yang memproduksi prostaglandin (Susilowati dan Rosyidah, 2008). Uji toksisitas ekstrak etanol herba alfalfa telah dilakukan oleh Ahmad *et al.*, (2013), dimana alfalfa tidak memiliki efek buruk pada hati dan ginjal tikus.

Penelitian lain yang dilakukan Venkatesan *et al.*, (2000) menyebutkan bahwa senyawa aktif kurkumin yang memiliki aktivitas antioksidan dan antiinflamasi mampu memproteksi kerusakan ginjal yang diinduksi doksorubisin. Pemberian *Lepidium sativum* mampu melindungi ginjal terhadap nefrotoksik akibat pemberian doksorubisin dengan jalan meningkatkan status SOD, CAT dan GSH dalam ginjal (Shinde *et al.*, 2010). Berdasarkan bukti-

bukti yang telah dipaparkan, maka diduga herba alfalfa mampu menghambat efek nefrotoksik pada mencit yang diinduksi doksorubisin.

G. Hipotesis

1. Doksorubisin yang diberikan dengan dosis 0,14 mg/20 g BB pada hari ke-1, 5, 9 dan 13 mampu menyebabkan efek nefrotoksik.
2. Ekstrak etanol herba alfalfa (*Medicago sativa* L.) mampu menghambat efek nefrotoksik pada mencit yang diinduksi doksorubisin.

