

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). 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). Efek yang umum terjadi pada penggunaan doksorubisin adalah myelosupresi akut dan kardiotoxikitas (Hortobagyi, 1997 ; Muller *et al.*, 1998).

Antrasiklin diketahui dapat menghambat topoisomerase II, yang merupakan akibat dari interkalasi antrasiklin dengan untai DNA. Produksi radikal hidroksil berkaitan dengan efek antitumor dan toksisitas terhadap jaringan normal (Gewirtz, 1999; Ravid, *et al.*, 1999). Radikal hidroksil merupakan radikal bebas paling reaktif. Radikal hidroksil dapat dihasilkan dari reduksi superoksida menjadi hidroperoksida yang dikatalisis dengan besi (II) melalui reaksi Fenton (Frei, 1994; Perkins, 1994). Derivat hidroperoksida inilah yang akan merusak sel hematopoietik dan stromal sumsum tulang sehingga menyebabkan myelosupresi sumsum tulang dengan cara mengaktifkan jalur kematian dengan memproduksi reaktif oksigen spesies (ROS), berkurangnya glutathion (GSH) dan gangguan pada membran mitokondria sehingga akan terjadi apoptosis (Murata *et al.*, 2004; Tsai-Turton *et al.*, 2007; Strauss, *et al.*, 2008). Myelosupresi sumsum tulang akan

bermanifestasi sebagai anemia, leukopenia, neutropenia dan trombositopenia di darah perifer (Tobias, 2010).

Leukopenia adalah keadaan jumlah sel darah putih yang lebih rendah dari normal (Lonsdale 1995). Leukosit merupakan sel yang berperan penting dalam sistem imun. Leukopenia tidak hanya meningkatkan risiko untuk terjadinya infeksi dan demam, yang meningkatkan morbiditas dan mortalitas pasien, tetapi juga dapat menyebabkan keterlambatan pemberian kemoterapi dan pengurangan dosis, sehingga dapat berpengaruh terhadap efek terapeutik dan respon terhadap kemoterapi tersebut (Dika, 2012; Aapro *et al.*, 2006; EONS, 2011).

Neutropenia adalah kondisi dimana jumlah neutrofil dalam darah terlalu rendah (Bolyard, 2010). Neutrofil berfungsi memfagositosis bakteri dan partikel kecil lainnya, dan juga mengandung glikogen yang akan dirombak menjadi glukosa melalui glikolisis untuk menghasilkan energi (Mescher, 2012). Neutrofil sangat penting dalam mempertahankan tubuh terhadap infeksi bakteri dan oleh karena itu, pasien dengan terlalu sedikit neutrofil lebih rentan terhadap infeksi (Bolyard, 2010).

Salah satu upaya pencegahan efek samping doksorubisin yaitu dengan pemberian bahan alam. Salah satu bahan alam yang berpotensi dalam menghambat penurunan jumlah leukosit dan neutrofil adalah alfalfa (*Medicago sativa* L.). Ekstrak etanol herba alfalfa mengandung flavonoid sebanyak 8,13%, alkaloid sebanyak 48,86 ppm dan kumarin sebanyak 229, 83 ppm (Susilowati *et al.*, 2014). Flavonoid dapat bertindak sebagai antioksidan dengan berbagai

mekanisme aksi yaitu menekan pembentukan ROS, mengikat ROS dan peningkatan regulasi pertahanan antioksidan (Kumar and Pandey, 2013). 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 (2014) menyatakan bahwa ekstrak etanol herba alfalfa memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 59,339 $\mu\text{g/ml}$.

Menurut Rahmayanti dan Sitanggung (2008), di dalam tanaman alfalfa, terdapat berbagai zat aktif yang mampu meningkatkan antibodi dan memberikan khasiat antioksidan dan vitamin seperti vitamin A, B1, B2, B6, B12, betacarotene, niacine, pantothenic acid, asam folat, biotin, PABA (p-aminobenzoic acid), inositol, choline, C, E, D dan K. Selain itu di dalam tanaman alfalfa juga terkandung mineral-mineral seperti kromium, kalsium, copper, yodium, zat besi, magnesium, mangan, molybdenum, fosfor, kalium, selenium, seng, dan sodium. Penelitian yang dilakukan oleh Dewi, R. S., (2014) menyebutkan bahwa, kandungan vitamin B12, Asam folat dan zat besi pada *Spirulina platensis* mampu meningkatkan produksi hemoglobin, leukosit dan hitung jenis darah perifer.

Berdasarkan pemaparan di atas, maka perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh efek ekstrak etanol herba alfalfa terhadap jumlah leukosit dan neutrofil pada mencit yang diinduksi doksorubisin untuk menilai efektivitas dari ekstrak etanol herba alfalfa dalam menghambat penurunan jumlah leukosit dan neutrofil akibat penggunaan doksorubisin. Dengan adanya bukti akitvitas antioksidan dan keamanan ekstrak herba alfalfa, maka diduga herba alfalfa mampu mengurangi penurunan jumlah leukosit dan neutrofil pada mencit yang diinduksi doksorubisin.

B. Perumusan Masalah

1. Apakah doksorubisin mampu menurunkan jumlah leukosit dan neutrofil?
2. Apakah ekstrak etanol herba alfalfa mampu menghambat penurunan jumlah leukosit dan neutrofil pada mencit yang diinduksi dengan doksorubisin?

C. Tujuan Penelitian

1. Membuktikan bahwa doksorubisin mampu menyebabkan penurunan jumlah leukosit dan neutrofil.
2. Membuktikan bahwa ekstrak etanol herba alfalfa mampu menghambat penurunan jumlah leukosit dan neutrofil pada mencit yang diinduksi doksorubisin.

D. Manfaat penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan bukti ilmiah mengenai manfaat ekstrak etanol herba alfalfa dalam menghambat penurunan jumlah leukosit dan neutrofil akibat penggunaan doksorubisin pada terapi pengobatan kanker.

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)

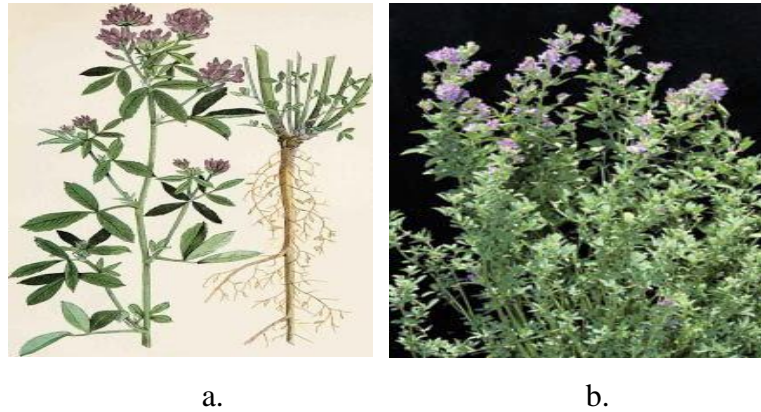
Super Divisi	:	Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi	:	Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	:	Mognoliopsida (berkeping dua/ Dikotil)
Sub Kelas	:	Rosidae
Ordo	:	Fabales
Famili	:	Fabaceae (suku polong-polongan)
Genus	:	<i>Medicago</i>
Spesies	:	<i>Medicago sativa</i> L.

(Backer dan Bakhuizen, 1968).

b. Morfologi

Alfalfa dapat hidup hingga umur 12 tahun dan mencapai ketinggian 2 meter (Rahmayanti dan Sitanggang, 2006). Akar alfalfa dapat mencapai 4,5 meter sehingga tahan dalam menghadapi musim kering/panas (Sajimin, 2010). 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 pada bagian tengah berongga dan tidak berduri.

Gambar tanaman alfalfa dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Tanaman Alfalfa (Christopher, 2006)

(a) Morfologi Alfalfa

(b) Tanaman Alfalfa yang telah Berbunga

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).

Menurut Rahmayanti dan Sitanggung (2016), di dalam tanaman alfalfa, terdapat berbagai zat aktif yang mampu meningkatkan antibodi dan memberikan khasiat antioksidan, seperti :

- 1) Vitamin : A, B1, B2, B6, B12, betacarotene, niacine, pantothenic acid, asam folat, biotin, PABA (p-aminobenzoic acid), inositol, choline, C, E, D dan K.
- 2) Mineral : Kromium, kalsium, copper, yodium, zat besi, magnesium, mangan, molybdenum, fosfor, kalium, selenium, seng, sodium.

- 3) Asam amino : Arginine, alanine, aspartic acid, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, guanine, fenilalanin, proline, serine, threonin, tyrosine dan valin.
- 4) Enzim : Amilase, koagulase, emulsin, invertase, lipase, pektinase, peroksidase dan protease.

Alfalfa memiliki kandungan kimia penting seperti 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).

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 IC_{50} 1893,4 $\mu\text{g/ml}$ (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).

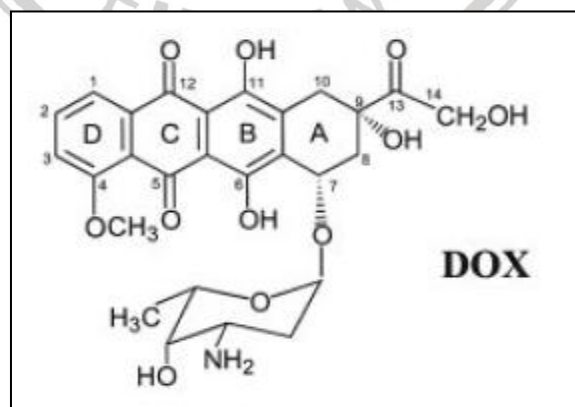
2. Doksorubisin

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 kardiotosik, 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 yang umum terjadi pada penggunaan doksorubisin adalah myelosupresi akut dan kardi toksisitas (Hortobagyi, 1997 ; Muller *et al.*, 1998).

Berdasarkan petunjuk pemakaian obat, efek samping penggunaan doksorubisin antara lain mual, muntah, *alopecia* (kerontokan rambut), gangguan irama jantung, dan *neutropenia* (penurunan jumlah sel darah putih) (Susan, 2009). Manifestasi klinik lain yang ditimbulkan akibat penggunaan doksorubisin adalah hipertensi dan tromboemboli (Bovelli *et al.*, 2010). Penggunaan doksorubisin juga memiliki kemungkinan terjadi resistensi (Smith *et al.*, 2006). Struktur kimia doksorubisin dapat dilihat pada gambar 2.



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

3. Leukosit

Leukosit adalah sel darah yang mengandung inti, disebut juga sel darah putih. Dilihat dalam mikroskop cahaya maka sel darah putih mempunyai granula spesifik (granulosit), yang dalam keadaan hidup berupa tetesan setengah cair, dalam sitoplasmanya dan mempunyai bentuk inti yang bervariasi, yang tidak mempunyai granula, sitoplasmanya homogen dengan inti bentuk bulat atau bentuk ginjal. Granula dianggap spesifik bila secara tetap terdapat dalam jenis leukosit tertentu dan pada sebagian besar precursor (pra zatnya) (Effendi, 2003).

Leukosit terdiri dari dua golongan utama, yaitu agranular dan granular. Leukosit agranular mempunyai sitoplasma yang tampak homogen, dan intinya berbentuk bulat atau berbentuk ginjal. Leukosit granular mengandung granula spesifik (yang dalam keadaan hidup berupa tetesan setengah cair) dalam sitoplasmanya dan mempunyai inti yang memperlihatkan banyak variasi dalam bentuknya. Terdapat 2 jenis leukosit agranular yaitu; limfosit yang terdiri dari sel-sel kecil dengan sitoplasma sedikit, dan monosit yang terdiri dari sel-sel yang agak besar dan mengandung sitoplasma lebih banyak. Terdapat 3 jenis leukosit granular yaitu neutrofil, basofil, dan asidofil (eosinofil) (Effendi, Z., 2003)

Leukosit terbentuk di sumsum tulang (myelogenous), disimpan dalam jaringan limfatikus (limfa, timus, dan tonsil) dan diangkut oleh darah ke organ dan jaringan. Umur leukosit adalah 13-20 hari. Vitamin, asam folat dan asam

amino dibutuhkan dalam pembentukan leukosit. Sistem endokrin mengatur produksi, penyimpanan dan pelepasan leukosit (Anonim, 2011).

Secara normal, jumlah sel darah putih dalam tubuh adalah 4.000-10.000 per milimeter kubik. Leukopenia adalah jumlah sel darah putih di bawah normal. Fungsi utama sel darah putih adalah membantu tubuh melawan infeksi (Helty, 2008).

Penyebab utama leukopenia adalah kelainan pada darah yang diidentifikasi dengan jumlah sel neutrofil (salah satu tipe sel darah putih) yang rendah. Penyebab lainnya adalah kemoterapi, terapi radiasi, myelofibrosis, aplastic anemia, influenza, hodgkin, beberapa jenis kanker, malaria, TBC dan demam berdarah (Choudhary *et al*, 2013).

Mekanisme dari leukopenia yang disebabkan oleh obat sebagian besar dimediasi oleh sistem imun yang membentuk antigenik kompleks dengan permukaan sel leukosit dan terbentuk antibodi terhadap kompleks. Ketika antibodi terbentuk dan terikat dengan antigen maka menyebabkan *leukoagglutination* atau aktivasi dari sistem komplemen dan dibersihkan dari sirkulasi dengan sequestrasi di limpa, paru, dan lain-lain (Haryono, 2014).

Bila terjadi leukopenia maka daya tahan tubuh menurun dan mudah terjadi infeksi. Adapun infeksi yang harus diperhatikan adalah demam, menggigil, radang tenggorokan, napas pendek, batuk, hidung tersumbat, sensasi panas selama berkemih, pada area injuri tampak kemerahan, bengkak, hangat, dan diare (Helty, 2008).

4. Neutrofil

Neutrofil adalah sel darah putih yang memiliki masa hidup yang pendek. Neutrofil meninggalkan pembuluh darah dan bergerak ke tempat infeksi, menyusul gradien kemotaktik yang dihasilkan oleh sinyal mikroba atau endogen. Pada lokasi inflamasi, neutrofil diaktifkan untuk melakukan beberapa fungsi termasuk sekresi sitokin, degranulasi, dan fagositosis. Neutrofil adalah jenis fagosit yang menelan dan mencerna bakteri. Proses ini sangat penting karena neutrofil adalah salah satu pertahanan tubuh yang utama terhadap infeksi (Brinkmann, Zychlinsky, 2012).

Neutrofil merupakan 60-70% dari leukosit yang beredar dan memiliki diameter 12-15 μ m, dengan inti yang terdiri atas 2-5 lobus. Neutrofil berfungsi memfagositosis bakteri dan partikel kecil lainnya, neutrofil juga mengandung glikogen yang akan dirombak menjadi glukosa melalui glikolisis untuk menghasilkan energi. Neutrofil mempunyai waktu paruh 6-7 jam dalam darah dan dapat hidup 1-4 hari dalam jaringan ikat sebelum apoptosis (Mescher, 2012).

Neutropenia adalah kondisi dimana jumlah neutrofil dalam darah terlalu rendah. Neutrofil sangat penting dalam mempertahankan tubuh terhadap infeksi bakteri dan oleh karena itu, pasien dengan terlalu sedikit neutrofil lebih rentan terhadap infeksi. Neutropenia dapat terjadi dengan penyebab yang beragam. Pasien yang menderita kanker dapat menjadi neutropenia karena kemoterapi yang mereka terima, kadang-kadang neutropenia terjadi setelah

infeksi virus. Beberapa orang dilahirkan dengan neutropenia, namun dalam beberapa kasus belum diketahui penyebabnya (Bolyard, 2010).

Keadaan neutropenia merupakan faktor risiko untuk terjadinya infeksi. Sekitar 90% kasus neutropenia mudah menderita demam, tanpa disertai gejala klinis lain. Dalam keadaan demikian, perlu dicari adakah faktor risiko untuk jenis infeksi tertentu, riwayat penyakit dasarnya serta pengobatannya, telah berapa lama terjadi neutropenia, antibiotik profilaksis yang telah diberikan, penyakit infeksi yang pernah diderita sebelumnya dan pengobatannya, perjalanan ke daerah endemis penyakit infeksi tertentu, pengetahuan spektrum mikroba serta uji resistensi, serta kemungkinan adanya gejala klinis yang khas harus dicari dengan teliti (Hadinegoro, 2002).

F. Landasan Teori

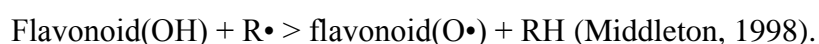
Doksorubisin adalah antibiotik golongan antrasiklin yang digunakan secara luas sebagai obat antineoplastik yang efektif. Doksorubisin memiliki efek toksik pada prekursor sel hematopoetik serta dapat menyebabkan depresi sumsum tulang baik dalam tempo yang cepat atau lambat. Efek yang umum terjadi pada penggunaan doksorubisin adalah myelosupresi akut dan kardiotoxikitas (Hortobagyi, 1997).

Berdasarkan literatur, kemoterapi yang bersifat myelosupresi dapat menyebabkan gangguan hematologi sebesar lebih dari 10% (Solimando, 2003). Gangguan hematologi dapat terjadi karena terganggunya proses hematopoietik dari sel induk darah (Bartucci et al.2011). Hematopoietik merupakan proses terkontrol dari generasi sel darah pada sumsum tulang. Generasi sel darah

tersebut dapat menghasilkan sel darah normal pada darah perifer antara lain leukosit (sel darah putih), eritrosit (sel darah merah), dan platelet (Fiedler and Brunner, 2012).

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 IC_{50} 100,38 $\mu\text{g/ml}$ (Rana *et al.*, 2010). Penelitian lain yang dilakukan Widyowati (2014) menyatakan bahwa ekstrak etanol herba alfalfa memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 59,339 $\mu\text{g/ml}$. Mekanisme flavonoid sebagai antioksidan berhubungan dengan kemampuannya mendonorkan atom hidrogen pada radikal bebas sehingga radikal bebas dapat berkurang (Sandhar *et al.*, 2010).

Flavonoid dapat teroksidasi oleh radikal bebas menghasilkan bentuk radikal yang lebih stabil dan kurang reaktif. Dengan kata lain, flavonoid menstabilkan spesies oksigen reaktif dengan mereaksikan senyawa reaktifnya. Reaktivitas yang tinggi dari gugus hidroksil kelompok flavonoid, senyawa reaktif dari radikal bebas dibuat tidak aktif, menurut persamaan berikut (Korkina *et al.*, 1997) :



Dimana $\text{R}\cdot$ adalah radikal bebas dan $\text{O}\cdot$ adalah radikal bebas oksigen.

Flavonoid tertentu dapat langsung mengikat senyawa superoksida, sedangkan

flavonoid lainnya hanya dapat mengikat radikal dari oksigen yang sangat reaktif yang disebut peroksinitrit (Hanasaki *et al.*, 1994).

Menurut Rahmayanti dan Sitanggang (2008), di dalam tanaman alfalfa, terdapat berbagai zat aktif yang mampu meningkatkan antibodi dan memberikan khasiat antioksidan dan vitamin seperti vitamin A, B1, B2, B6, B12, betacarotene, niacine, pantothenic acid, asam folat, biotin, PABA (p-aminobenzoic acid), inositol, choline, C, E, D dan K. Selain itu di dalam tanaman alfalfa juga terkandung mineral-mineral seperti kromium, kalsium, copper, yodium, zat besi, magnesium, mangan, molybdenum, fosfor, kalium, selenium, seng, dan sodium.

Dewi, R. S., (2014) menyebutkan bahwa, kandungan vitamin B12, Asam folat dan zat besi pada *Spirulina platensis* mampu meningkatkan produksi hemoglobin, leukosit dan hitung jenis darah perifer. Berdasarkan bukti-bukti yang telah dipaparkan, maka diduga herba alfalfa mampu menghambat penurunan jumlah leukosit dan neutrofil pada mencit yang diinduksi doksorubisin.

Hipotesis

1. Doksorubisin mampu menurunkan jumlah leukosit dan neutrofil.
2. Ekstrak etanol herba alfalfa (*Medicago sativa* L.) mampu menghambat penurunan jumlah leukosit dan neutrofil pada mencit yang diinduksi doksorubisin.