

PENINGKATAN SISTEM IMUN OLEH KOMBINASI EKSTRAK ETANOL DAUN AWAR – AWAR (*Ficus septica burm. F*) DAN EKSTRAK ETANOL DAUN KELOR (*Moringa oleifera*) SEBAGAI KO-KEMOTERAPI KANKER PADA TIKUS PUTIH BETINA GALUR *SPRAGUE DAWLEY* YANG DIINDUKSI DOKSORUBISIN

EFFECT OF COMBINATION IMMUNE SYSTEM ENHANCEMENT AWAR-AWAR (*Ficus septica burm. F*) LEAF ETHANOL EXTRACT AND MORINGA (*Moringa oleifera*) LEAF ETHANOL EXTRACT AS CO-CHEMOTHERAPY CANCER IN RATS FEMALE *SPRAGUE DAWLEY* STRAIN INDUCED BY DOXORUBICIN

Dewi Indah Sari, Annisa Hardikasari Yazin, Rizka Angerti Anovia, Ulfa Ismayani, Endang Darmawan

*Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan
Jln. Prof. Dr. Soepomo, Janturan, Yogyakarta, Telp. (0274) 379418
Email: rizkachan95@yahoo.com*

Submitted : 05-06-2015

Reviewed : 15-06-2015

Accepted: 23-11-2015

ABSTRAK

Penggunaan obat doksorubisin untuk terapi kanker menyebabkan sistem imun tubuh menurun. Daun awar-awar dan daun kelor merupakan tanaman herbal yang memiliki manfaat sebagai agen imunostimulan atau meningkatkan sistem kekebalan tubuh. Adapun tujuan penelitian ini untuk mengetahui efek kombinasi ekstrak etanol daun awar-awar dan ekstrak etanol daun kelor sebagai ko-kemoterapi kanker pada tikus putih betina galur *Sprague Dawley* yang terinduksi doksorubisin. Delapan belas ekor tikus *Sprague Dawley* dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan, yaitu kelompok normal diberi NaCl 0,9% 10ml/kgBB, kelompok kontrol positif diberi doksorubisin dosis 4,67 mg/kgBB, kelompok perlakuan dosis tunggal yang masing-masing diberi ekstrak etanol daun awar-awar dosis 750 mg/kgBB dan ekstrak etanol daun kelor 500 mg/kgBB, kelompok perlakuan yang masing-masing diberi kombinasi ekstrak etanol daun awar-awar dan daun kelor dengan dosis 1,25 g/kgBB dan dosis 1,75 g/kgBB. Perlakuan dilakukan selama 7 hari berturut turut. Pada hari ke-1 dan ke-4 masing masing kelompok perlakuan kecuali kelompok normal diinduksi doksorubisin 4,67 mg/kgBB secara intramuskuler. Pengambilan darah untuk pemeriksaan limfosit CD3⁺ dan limfosit CD8⁺ dilakukan pada hari ke-0 dan ke-7. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak etanol daun awar-awar dan daun kelor dosis 1,25 g/kgBB dan dosis 1,75 g/kgBB dapat meningkatkan sistem imun relatif kecil yang secara statistik tidak berbeda signifikan ($p>0,05$). Namun pemberian dosis tunggal ekstrak etanol daun kelor dosis 500 mg/kgBB memiliki aktivitas sebagai imunostimulator terhadap CD3⁺ dan CD8⁺ yang lebih efektif jika dibandingkan dengan pemberian dosis tunggal ekstrak etanol daun awar-awar dosis 750 mg/kgBB.

Kata Kunci : doksorubisin, daun awar-awar, daun kelor, limfosit CD3⁺ dan limfosit CD8⁺ limfosit.

ABSTRACT

Use of the drug doxorubicin for cancer therapy causes decreasing of immune system reported. Leaves of *Ficus septica* Burm. F and leaves of *Moringa oleifera* as immunostimulatory agents. The

purpose of this study, among others, determine the combined effects of ethanol extract of *Ficus septica* Burm. F leaves and ethanol extract of *Moringa oleifera* leaves as co-chemotherapy for in female rats *Sprague Dawley* strain induced doxorubicin. Eighteen *Sprague Dawley* rats were divided into six treatment groups, normal group was given 0.9% NaCl 10ml / kgBB, positive control group were given by doxorubicin with dose of 4.67 mg / kgBB, single-dose treatment group were each given ethanol extract of *Ficus septica* Burm F leaves dose of 750 mg / kgBB and ethanol extract of *Moringa oleifera* leaves 500 mg / kgBB, treatment groups were given by combination of ethanol extract *Ficus septica* Burm. F leaves and *Moringa oleifera* leaves with a dose of 1.25 g / kgBB and a dose of 1, 75 g / kgBB. treatment carried out for 7 days. On days 1 and 4 of each treatment groups except the normal group induced by doxorubicin 4.67 mg / kgBB intramuscularly. Blood sampling performed on day 0 and 7 th for lymphocytes CD3+ and lymphocytes CD8+ test. The results showed that the combination of ethanol extract *Ficus septica* burm. F leaves and *Moringa oleifera* leaves dose of 1.25 g / kgBB and the dose of 1.75 g / kgBB can enhanced immune system relative small which was not statistically significantly different ($p > 0.05$). However, a single dose of ethanol extract *Moringa oleifera* leaves dose of 500 mg/kg have immunostimulatory activity as lymphocytes CD3+ and lymphocytes CD8+ were more effective than a single dose of ethanol extract of *Ficus septica* Burm. F leaves dose of 750 mg/kgBB.

Keywords: doxorubicin, *Ficus septica* Burm. F leaves, *Moringa oleifera* leaves, lymphocytes CD3+ and lymphocytes CD8+.

PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyebab utama kematian di dunia. Sekitar 13% dari semua kematian akibat kanker terjadi pada tahun 2008, dan lebih dari 70% dari semua kematian akibat kanker terjadi di negara-negara berkembang (WHO, 2011).

Penyakit ini terkait dengan pertumbuhan yang cepat dari sel-sel abnormal tidak terkendali di dalam tubuh serta memiliki kapasitas untuk menyerang jaringan sekitarnya menyebar ke organ lain, dikenal sebagai metastatis (Hanahan dan Weinberg, 2000).

Doksorubisin adalah salah satu obat yang sering digunakan untuk kemoterapi kanker (Tan *et al.*, 2009). Namun, penggunaan doksorubisin memiliki beberapa efek samping. Salah satu efek samping adalah penurunan jumlah limfosit serta rasio CD4+/CD8+. Penggunaan doksorubisin dapat menyebabkan kardi toksisitas dan sistem kekebalan tubuh yang menurun (Santos *et al.*, 2010; Bowles *et al.*, 2012). Doksorubisin dapat menekan produksi IL-2 dan INF-gamma, sitotoksitas sel NK, limfositproliferasi dan rasio CD4+/CD8 + di Tumor pada tikus (Zhang *et al.*, 2005). Oleh karena itu, diperlukan agen kokemoterapi yang dapat menekan efek immunosupresi tersebut.

Penggunaan kemoterapi seringkali dikombinasikan dengan suatu agen immunostimulan untuk meningkatkan dan melindungi fungsi kekebalan pasien selama pemberian kemoterapi. Pemberian agen kemoterapi dan agen ko-kemoterapi diharapkan dapat menghasilkan efek terapi yang lebih baik. Salah satunya dengan menggunakan agen immunomodulator yang berasal dari bahan alami seperti tumbuhan.

Tumbuhan yang diduga dapat berfungsi sebagai immunomodulator adalah daun awar-awar terbukti mampu meningkatkan aktivitas sitotoksik agen kemoterapi doksorubisin pada sel kanker payudara MCF-7. Mekanisme molekuler efek sitotoksik ekstrak etanolik daun awar-awar dilakukan dengan pengamatan apoptosis dengan metode double staining dan ekspresi protein Bcl-2 dengan metode immunositokimia. Pengamatan apoptosis dan ekspresi protein Bcl-2 pada aplikasi tunggal ekstrak daun awar-awar menunjukkan kemampuan ekstrak menginduksi apoptosis dan menurunkan ekspresi protein Bcl-2 (Endro *et al.*, 2012)

Sedangkan tanaman lain seperti daun kelor (*Moringa oleifera* Lam) memiliki kandungan saponin dan flavonoid lebih tinggi. Flavonoid pada daun kelor memiliki peran sebagai antioksidan dan mampu menghentikan reaksi berantai radikal bebas (Bamishaiye *et al.*, 2011; Lakshminarayana *et al.*, 2011). Hasil penelitian lain menunjukkan pemberian ekstrak daun kelor selain meningkatkan jumlah sel T CD4+ juga terbukti dapat meningkatkan jumlah relatif sel T CD8+ (Fathir *et al.*, 2014) serta daun kelor memiliki peran sebagai immunostimulan karena dapat meningkatkan aktivitas makrofag (Biswas *et al.*, 2012).

JALANNYA PENELITIAN

Bahan yang digunakan adalah simplisia daun kelor dan daun awar-awar yang diperoleh dari Merapi Farma, NaCl 0,9%, doxorubicin, lysing solution (BP FACS), etanol 96%, aquadest, Biotinylated rat anti-mouse monoclonal antibodies, 3,3'-diamino-benzidine (DAB, Novo Castra), reagen yang digunakan rat antigen CD3⁺ fluorescein isothiocyanate (FITC) (Invitrogen) and phycoerythrin (PE) anti-rat CD8⁺ (eBioscience). Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih galur *Sprague Dawley*. Alat yang digunakan meliputi seperangkat alat gelas, evaporator, LAB, corong Buchner, vortex, flowcytometer, spuit oral, tabung Eppendorf 5 ml, sentrifuge 2500 rpm.

Pembuatan Ekstrak

Daun awar-awar dan daun kelor diekstraksi menggunakan metode maserasi. Dimana 1000 g daun awar-awar kering dan 1000 g daun kelor kering diserbuk, setelah itu direndam dalam etanol 96% 5 L selama 5 hari. Kemudian disaring dan filtratnya di evaporator sampai terbentuk ekstrak kental.

Perlakuan Terhadap Hewan Uji

Sebanyak sebanyak 18 tikus dibagi menjadi 7 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 3 ekor. Selama 7 hari semua kelompok diberi perlakuan sebagai berikut :

Kelompok 1 : kelompok kontrol normal diberi NaCl 10 ml/kgBB secara oral 7 hari berturut-turut.

Kelompok 2 : Kelompok kontrol diberi NaCl 10 ml/kgBB secara oral 7 hari berturut-turut, dilanjutkan dengan doksorubisin 4,67 mg/kgBB pada hari ke 1 dan ke 4 secara intramuskuler.

Kelompok 3 : Kelompok perlakuan diberi ekstrak etanol daun awar-awar 750 mg/kgBB secara oral 7 hari berturut-turut, dilanjutkan dengan doksorubisin 4,67 mg/kgBB pada hari ke 1 dan ke 4 secara intramuskuler.

Kelompok 4: Kelompok perlakuan diberi ekstrak etanol daun kelor 500 mg/kgBB secara oral 7 hari berturut-turut, dilanjutkan dengan doksorubisin 4,67 mg/kgBB pada hari ke 1 dan ke 4 secara intramuskuler.

Kelompok 5 : Kelompok perlakuan diberi Kombinasi ekstrak etanol daun awar-awar dan daun kelor 750 mg/kgBB : 500 mg/kgBB secara oral 7 hari berturut-turut, dilanjutkan dengan doksorubisin 4,67 mg/kgBB pada hari ke 1 dan ke 4 secara intramuskuler.

Kelompok 6 : Kelompok perlakuan diberi Kombinasi ekstrak etanol daun awar-awar dan daun kelor 750 mg/kgBB : 1000 mg/kgBB secara oral 7 hari berturut-turut, dilanjutkan dengan doksorubisin 4,67 mg/kgBB pada hari ke 1 dan ke 4 secara intramuskuler.

Pengambilan Sampel Darah

Darah diambil dari sinus orbital pada hari ke 0 dan ke 7 untuk pemeriksaan limfosit CD3⁺ dan CD8⁺. Dimana sebelum pengambilan darah, tikus dibius menggunakan sodium pentobarbital (75 mg/kg).

Pemeriksaan Limfosit CD3⁺ dan Limfosit CD8⁺

Preparasi sampel darah dilakukan dengan cara mencampur 50µl sampel darah, 10µL reagen Invitrogen dan EBioscience setelah itu divortex. Selanjutnya, larutan disimpan dalam ruang gelap selama 15 menit. Tambahkan dengan 450µl BP FACS untuk pengenceran dan vortex, kemudian dibiarkan di ruangan gelap selama 15 menit. Sel dianalisis dengan flowcytometer yang dilengkapi dengan laser argon (eksitasi 488 nm) dan pengaturan filter yang sesuai untuk pengamatan FITC fluoresensi. Data berupa persentase dari setiap jenis fluorescent sel yang mewakili jumlah relatif dari CD3⁺ dan CD8⁺ T cell limfosit.

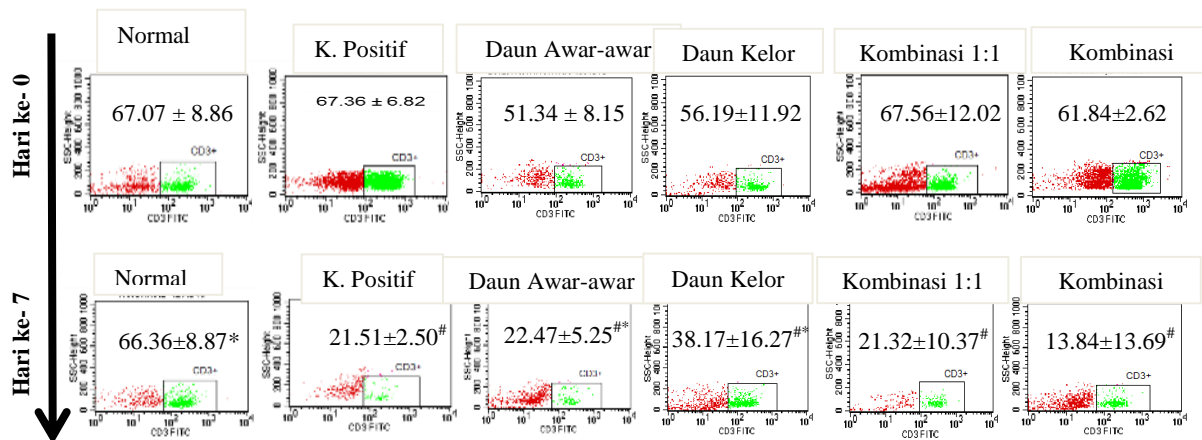
Dari data CD3⁺ limfosit dan CD8⁺ limfosit akan dianalisis secara statistik menggunakan analisis anova dan LSD untuk membandingkan keadaan antara lebih dari 2 kelompok dengan taraf kepercayaan 95% untuk melihat perbedaannya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah relatif CD3⁺ dan CD8⁺ limfosit kelompok positif (doksorubisin) menunjukkan adanya penurunan secara berturut-turut sebesar 68,07% dan 48,52% dibawah nilai kelompok normal CD3⁺ penurunan sebesar 1,06% , CD8⁺ peningkatan sebesar 1,86%. Secara statistik penurunan jumlah relatif CD3⁺ dan CD8⁺ limfosit kelompok ini berbeda bermakna dengan kelompok normal (P<0,05). Hal ini cukup menunjukkan bahwa doxorubin dapat menurunkan sistem imun tubuh dengan menekan jumlah relatif CD3⁺ dan CD8⁺ limfosit didalam tubuh.

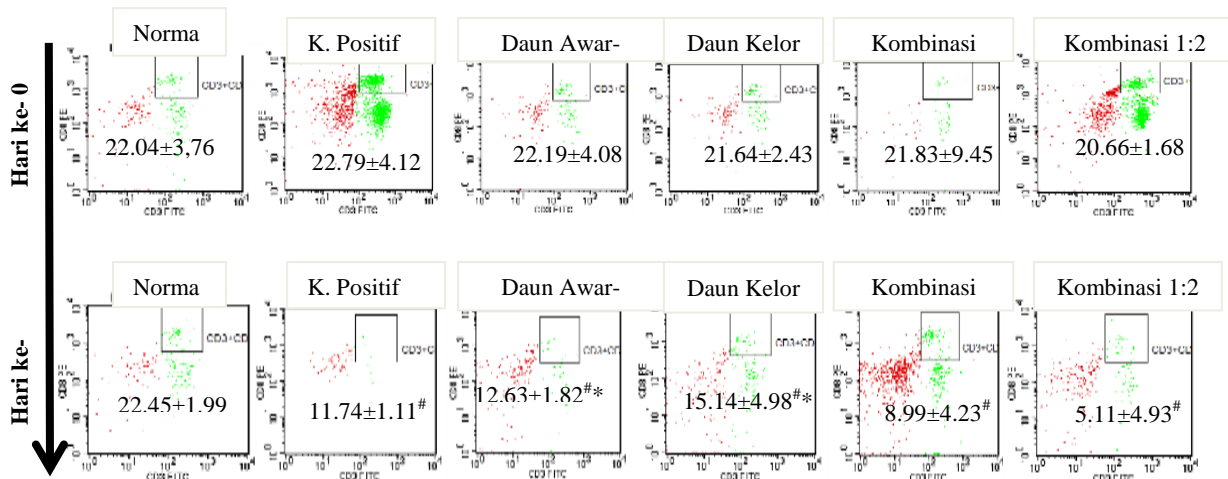
Berdasarkan Gambar 3 dapat dilihat bahwa pemberian kombinasi ekstrak etanol daun awar-awar dan daun kelor perbandingan 1:1 dan 1:2 menunjukkan peningkatan jumlah relatif CD3+ dan CD8+ limfosit relatif lebih kecil yang secara statistik tidak berbeda bermakna ($p>0,05$). Jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif.

Kelompok perlakuan ekstrak etanol daun kelor dosis 500 mg/kgBB mengalami penurunan jumlah relatif CD3+ dan CD8+ limfosit secara berturut-turut sebesar 32,08% dan 30,04%. Jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, kelompok ini mengalami penurunan yang lebih kecil dan berbeda bermakna ($p<0,05$) secara signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok perlakuan ekstrak etanol daun kelor memiliki kemampuan untuk meningkatkan system imun. Peningkatan jumlah CD3+ dan CD8+ limfosit dipengaruhi oleh adanya zat aktif di dalam ekstrak etanol daun kelor berupa saponin dan flavonoid yang dapat merangsang peningkatan IL-2 pada sel T CD4+. Peningkatan IL-2 memungkinkan juga terjadinya peningkatan jumlah CD3+ dan CD8+ limfosit (Mc Nally *et al.*, 2011).



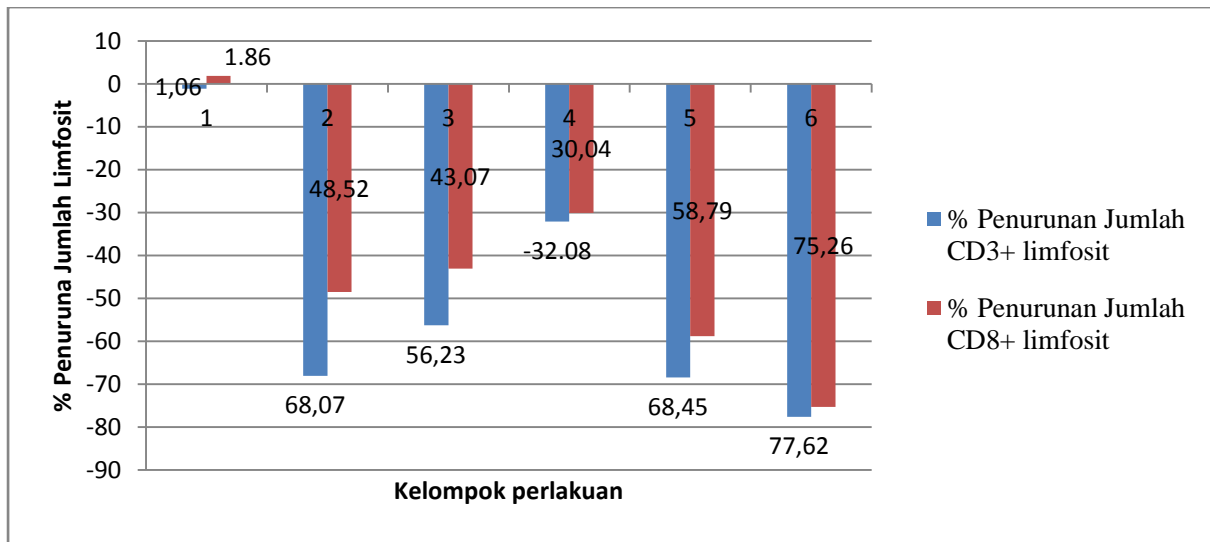
Gambar 1. Rerata jumlah relatif CD3+ limfosit sebelum dan sesudah pemberian dokсорубисин dengan analisis flowcyometri.

Keterangan :
 # : berbeda signifikan dengan kelompok normal $p<0,05$
 * : berbeda signifikan dengan kelompok positif ($p<0,05$)



Gambar 2. Rerata jumlah relatif CD8+ limfosit sebelum dan sesudah pemberian dokсорубисин dengan analisis flowcyometri.

Keterangan :
 # : berbeda signifikan dengan kelompok normal $p<0,05$
 * : berbeda signifikan dengan kelompok positif ($p<0,05$)



Gambar 3. Persentase penurunan jumlah relatif CD3⁺ dan CD8⁺ limfosit sesudah pemberian doksorubisin.

Keterangan:

1 : kelompok normal

2 : kelompok positif

3 : kelompok ekstrak etanol daun awar-awar

4 : kelompok ekstrak etanol dan daun kelor

5 : kelompok kombinasi ekstrak etanol daun awar-awar dan ekstrak etanol dan daun kelor perbandingan 1:1

6 : kelompok kombinasi ekstrak etanol daun awar-awar dan ekstrak etanol dan daun kelor perbandingan 1:2

Kelompok perlakuan ekstrak etanol daun awar-awar dosis 750 g/kgBB mengalami penurunan jumlah relatif CD3⁺ dan CD8⁺ limfosit secara berturut-turut sebesar 56,23% dan 43,07%. Jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif kelompok ini mengalami penurunan yang berbeda bermakna ($p < 0,05$) secara signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok perlakuan ekstrak etanol daun awar-awar dapat meningkatkan sistem imun. Hal ini mungkin disebabkan karena dosis yang terlalu rendah ataupun terlalu tinggi. Sehingga diperlukan adanya evaluasi dosis yang lebih lanjut.

KESIMPULAN

Kombinasi ekstrak etanol daun awar-awar dan daun kelor perbandingan 1:1 dan 1:2 dalam meningkatkan sistem imun relatif kecil yang secara statistik tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$). Namun pemberian ekstrak etanol daun awar-awar dan ekstrak etanol daun kelor secara terpisah memiliki kemampuan meningkatkan sistem imun yang relatif besar yang secara statistik berbeda bermakna ($p < 0,05$).

DAFTAR PUSTAKA

- Bamshaiye, E.I.F.F., Olayemi, E.F., Awagu, Bamshaiye, O.M., 2011, Proximate and phytochemical composition of *Moringa oleifera* leaves at three stages of maturation. *Advance Journal of Food Science and Technology* 3 : 233-237
- Biswas, S.K, Chowdhury, A., Joysre, D., Ajoy, R., Zahid, H., 2012, Pharmacological potentials of *Moringa oleifera* Lam, A Review. *International Journal Pharmaceutical Sciences and Research* 3 : 305-310
- Bowles, E.J, Wellman, R., Feigelson, H.S., 2012, Risk of heart failure in breast cancer patients after anthracycline and trastuzumab treatment: a retrospective cohort study, *J Natl Cancer Inst*, 104, 1293-305
- Dalimartha, D.S., 2007, *Ramuan Tradisional Pengobatan Kanker*, Penebar swadaya, Jakarta
- Endro, A.E., Hermawan, A., Nastiti, K., 2012, Immunomodulatory Effects of Hexane Insoluble Fraction of *Ficus septica* Burm. F. in Doxorubicin-treated Rats, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Vol 13*

- Fathir, A., Muhaimin, R., Widodo, 2014, Aktivitas Ekstrak Daun Kelor Terhadap Sel-T *Helper* dan Sel-T *Sitotoksik* pada Mencit yang Diinfeksi *Salmonella thypi*, *Jurnal Veteriner*, Vol.15, 114-122
- Hanahan, D., and Weinberg, P.A., 2000, *The Hallmarks of Cancer Cell*, *Cell*, 100(1), 57-70
- Lakshminarayana, M., Shivkumar, H., Rimaben, P., Bhargava, V.K., 2011, Antidiarrhoeal activity of leaf extract of *Moringa oleifera* in experimentally induced diarrhoea in rats, *International Journal of Phytomedicine* 3 : 68-74
- Mc Nally A, Geffery R H, Tim S, Ranjeny T, Raymond J S. 2011. CD4+CD25+ regulatory T cells control CD8+ T cell effector differentiation by modulating IL-2 homeostasis. *PNAS* 8 : 7529-7534.
- Santos, R.V.T., Caperuto, E.C., Mello, M.T., 2010, Effect of doxorubicin on cytokine production by lymphocytes and the Th1/Th2 balance. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 64, 579-81
- Tan, M.L., Choong, P.F., Dass, C.R., 2009, Review: doxorubicin delivery systems based on chitosan for cancer therapy, *J Pharm Pharmacol*, 61, 131-42
- WHO, 2011, Cancer, World Health Organization, Switzerland, diakses tanggal agustus 2014, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
- Zhang, X.Y., Li, W.G., Wu, Y.J., 2005, Proanthocyanidin from grape seeds potentiates anti-tumor activity of doxorubicin via immunomodulatory mechanism. *Int Immunopharmacol*, 5, 1247-57