

PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI FRAKSI ETIL ASETAT AKAR PASAK BUMI DAN DOXORUBICIN TERHADAP BERAT BADAN DAN JUMLAN NODUL TIKUS SPRAGUE DAWLEY BETINA YANG DIINDUKSI 7,12 DIMETILBENZ(α) ANTRASEN (DMBA)

THE EFFECT OF ETHYL ACETATE FRACTION OF PASAK BUMI ROOTS AND DOXORUBICIN COMBINATION ON THE NUMBER OF NODULES AND WEIGHT OF 7.12 DIMETILBENZ (α) ANTRASEN (DMBA) INDUCED SPRAGUE DAWLEY FEMALE RAT

Laela Hayu Nurani¹, Achmad Mursyidi¹, Sitaria Widyarini²

¹Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan

Jln. Prof. Dr. Soepomo Yogyakarta, Telp. (0274) 379418

²Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada

Jl. Farmako Sekip Utara, Yogyakarta

Email: laelafarmasi@gmail.com

Submitted: 17-11-2015

Reviewed: 26-03-2016

Accepted: 03-04-2016

ABSTRAK

Akar pasak bumi mengandung senyawa kuasinoid yang mempunyai efek penghambatan karsinogenesis, imunomodulator, antiulcer, dan antimalaria. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi fraksi etil asetat akar pasak bumi dan doxorubicin terhadap tikus putih yang diinduksi DMBA yang dilihat dari pengamatan berat badan dan palpasi. Tikus dibagi menjadi 8 kelompok perlakuan. Masing-masing kelompok terdiri dari 7 ekor tikus putih betina *Sprague Dawley*. Kelompok 1 (normal) hanya diberi pakan dan minum, kelompok 2 diberikan fraksi etil asetat akar pasak bumi (100 mg/kgBB), kelompok 3 diberikan doxorubicin (1,17 mg/kgBB) 1 kali seminggu selama 5 minggu, kelompok 4 diberikan DMBA (20 mg/kgBB) 2 kali seminggu selama 5 minggu, kelompok 5 diberikan DMBA (20 mg/kgBB)+doxorubicin (1,17 mg/kgBB), kelompok 6 diberikan DMBA (20 mg/kgBB)+fraksi etil asetat akar pasak bumi (100 mg/kgBB), kelompok 7 diberikan DMBA (20 mg/kgBB)+doxorubicin (1,17 mg/kgBB)+fraksi etil asetat akar pasak bumi (100 mg/kgBB), kelompok 8 doxorubicin (1,17 mg/kgBB)+fraksi etil asetat akar pasak bumi (100 mg/kgBB). Pengamatan dilakukan terhadap berat badan tikus dan pengamatan kejadian tumor dengan dilakukan palpasi pada minggu ke-6 perlakuan. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan bahwa pemberian kombinasi fraksi etil asetat akar pasak bumi dan doxorubicin dapat meningkatkan berat badan hewan uji dan menurunkan jumlah tumor dibandingkan doxorubicin tunggal.

Kata kunci: akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack), DMBA, berat badan, kanker

ABSTRACT

Pasak Bumi roots contain quasinoid compounds that have carcinogenesis inhibitory, immunomodulator, antiulcer, and antimalaria effects. This study aims to determine the effect of a combination of ethyl acetate fraction of Pasak Bumi roots and doxorubicin on DMBA-induced white mice by weight and palpation observation. The mice were divided into 8 groups. Each group consisted of 7 female *Sprague Dawley* mice. Group 1 (normal) was only given food and drink, Group 2 was given fraction of ethyl acetate of Pasak Bumi roots (100 mg/kg body weight, Group 3 (positive control) was given doxorubicin (1.17 mg/kg body weight) 1 times a week for 5 weeks, Group 4 was

given DMBA (20 mg/kg) two times a week for 5 weeks, Groups 5 was given DMBA (20 mg/kg) + doxorubicin (1.17 mg/kg), Group 6 was given DMBA (20 mg / kg) + ethyl acetate fractions of Pasak Bumi roots (100 mg / kg), Group 7 was given DMBA (20 mg / kg) + doxorubicin (1.17 mg / kg) + ethyl acetate fraction of Pasak Bumi roots (100 mg / kg) and Group 8 doxorubicin (1.17 mg / kg body weight) + ethyl acetate fraction of Pasak Bumi roots (100 mg / kg). Observations were made on the basis of body weight of mice and tumor incidence by palpation at week 6 of treatment. The result of this research shows that the administration of ethyl acetate fraction of Pasak Bumi roots and doxorubicin combination can increase body weight of the mice and decrease the number of tumors compared to single doxorubicin.

Keywords: Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack), DMBA, weight, cancer

PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan kanker terbanyak kedua sesudah kanker leher rahim di Indonesia (Tjindarbumi dan Mangunkusumo, 2001). Senyawa karsinogen yang dapat menyebabkan kanker salah satunya yaitu 7,12 dimethylbenzanthracena (DMBA) (Hodgson *et al.*, 2001). DMBA ini selain bersifat genotoksik karsinogen juga terbukti bersifat imunotoksik dan hematotoksik (Gao *et al.*, 2005; Melendez-colon *et al.*, 1999).

Pengobatan kanker payudara ini dilakukan dengan kemoterapi menggunakan obat sitostatika (doxorubicin). Obat sitostatika bekerja dengan mempengaruhi metabolisme asam nukleat terutama DNA atau biosintesis protein (Siswandono *et al.*, 2000). Dalam suatu penelitian yang didapatkan persentase pasien yang mengalami efek samping dari kemoterapi yang dijalannya yaitu kerontokan rambut sebanyak 89%, mual 87%, lelah 86%, muntah 54%, gangguan tidur 46%, peningkatan berat badan 45%, sariawan 44%, kesemutan 42%, gangguan pada mata 38%, diare 37%, konstipasi 19 %, kemerahan pada kulit 18% dan penurunan berat badan 13%. Baik berat badan maupun tinggi badan, keduanya terkait dengan kanker payudara. Indeks obesitas terkait dengan resiko kanker payudara. Selain itu pada obesitas, distribusi lemak tubuh juga mempunyai peran sendiri pada kanker payudara. Jaringan lemak bagian atas (sentral atau abdominal) meningkatkan resiko kanker payudara (Pierobon and Frankenfeld, 2012).

Saat ini pengembangan dalam upaya pencegahan dan penundaan proses karsinogenesis serta pengurangan kanker untuk terjadi kembali, dapat dilakukan melalui suatu senyawa ko kemoterapi maupun agen imunomodulator. Penemuan senyawa ko kemoterapi maupun agen imunomodulator berawal dari pengamatan kebiasaan pola konsumsi makanan yang ternyata dapat mengurangi resiko terkena kanker (Ignatiadis and Singhal., 2012).

Beberapa aktivitas akar pasak bumi ini telah banyak dilaporkan berdasarkan kandungan kimianya antara lain kuasinoid yang memiliki efek antiulcer (Tada *et al.*, 1991), sitotoksik terhadap sel kanker A-549, MCF-7 dan antimalaria (Kuo *et al.*, 2004). Kandungan utama dari kuasinoid adalah eurikomanon. Eurikomanon telah dilaporkan berefek sitotoksik terhadap sel Hela (sel kanker leher rahim) melalui mekanisme pemacuan p53 (Nurkhasanah and Azimahtol, 2008). Aktivitas zat aktif kuasinoid ekstrak akar pasak bumi sebagai antikanker diduga melalui mekanisme pemacuan apoptosis atau penghambatan proliferasi sel kanker dengan melibatkan kerja enzim-enzim antioksidan dan respon imun seluler (Tee and Hwariah, 2006). Aktivitas zat aktif kuasinoid ekstrak akar pasak bumi sebagai imunomodulator dengan meningkatkan sekresi IL-12 secara *in vitro* (Nurani *et al.*, 2010) serta ekstrak akar pasak bumi tidak toksik ($LD_{50}=7498,94$ mg/kg BB). Peningkatan berat badan tikus putih terjadi pada dosis, 25, 75 dan 225 mg/ml (Mawaddah *et al.*, 2013).

Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh pemberian kombinasi fraksi etil asetat akar Pasak Bumi dan doxorubicin pada tikus betina *Sprague Dawley* yang telah diinduksi DMBA yang dilihat dari pengamatan berat badan dan palpasi (pertumbuhan tumor).

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Bahan uji yang digunakan adalah akar pasak bumi pasak bumi yang diperoleh dari daerah Kalimantan. Hewan uji yang digunakan adalah tikus betina *Sprague Dawley* umur 1 bulan dengan berat yang hampir sama dan dalam kondisi sehat yang diperoleh dari Universitas Gadjah Mada.

Jalan Penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi 2 tahap yaitu pembuatan ekstrak etanol akar pasak bumi (*E.longifolia* Jack) dan uji karsinogenesis

Pembuatan fraksi etil asetat dari akar pasak bumi bumi (*E.longifolia* Jack)

Akar tanaman pasak bumi diidentifikasi di Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Akar dibuat simplisia dan kemudian dibuat serbuk dengan ayakan B50. Ekstraksi dilakukan dengan memaserasi 100 gram serbuk simplisia dengan pelarut etanol 70%. Ekstrak dikentalkan di *rotary evaporator* dan di atas waterbath kemudian difraksi. Fraksinasi dilakukan dengan etil asetat.

Uji antikarsinogenesis

1. Persiapan hewan uji

Tikus dipelihara dalam ruangan berventilasi cukup, makanan dalam bentuk pellet dan minuman air secukupnya, hewan diadaptasikan dalam kandang selama 1 minggu sebelum perlakuan.

2. Pembuatan larutan karsinogen (DMBA dalam *corn oil*)

7,12-Dimetilbenz(α) antrasen (DMBA) sesuai dengan dosis dilarutkan dalam *corn oil* sehingga jika larutan diberikan pada hewan uji secara peroral tidak melebihi volume maksimal yang diperolehkan. Larutan DMBA dalam *corn oil* selalu dibuat baru, sebelum pemberian terhadap hewan uji.

3. Pembuatan larutan uji (eksrak etanol akar pasak bumi dalam CMC Na 0,5%).

Ekstrak etanol akar pasak bumi sesuai dengan dosis disuspensikan dalam larutan CMC Na 0,5% sehingga jika larutan ini diberikan kepada hewan uji secara peroral tidak melehi volume maksimal yang diperolehkan. Larutan fraksi etil asetat akar pasak bumi dalam CMC Na 0,5% selalu dibuat baru sebelum pemberian terhadap hewan uji.

Tabel I. Waktu pemberian DMBA dan perlakuan kombinasi doxorubicin dan fraksi etil asetat akar pasak bumi pada *Sprague Dawley*

Minggu ke-	Fraksi Perlakuan	Kontrol Doxorubicin	Kontrol DMBA	Normal
1-5	2x 1 seminggu DMBA dalam <i>corn oil</i> secara oral	2x 1 seminggu DMBA dalam <i>corn oil</i> secara oral	2x 1 seminggu DMBA dalam <i>corn oil</i> secara oral	Pakan+aquadest
6-10	Setiap hari diberi fraksi etil asetat akar pasak bumi	Doxorubicin 1x 1 seminggu secara intraperitoneal		Pakan+aquadest
10-16	Setiap hari diberi fraksi etil asetat akar pasak bumi			Pakan+aquadest

4. Induksi karsinogen dengan DMBA dan perlakuan doxorubicin serta fraksi etil asetat akar pasak bumi

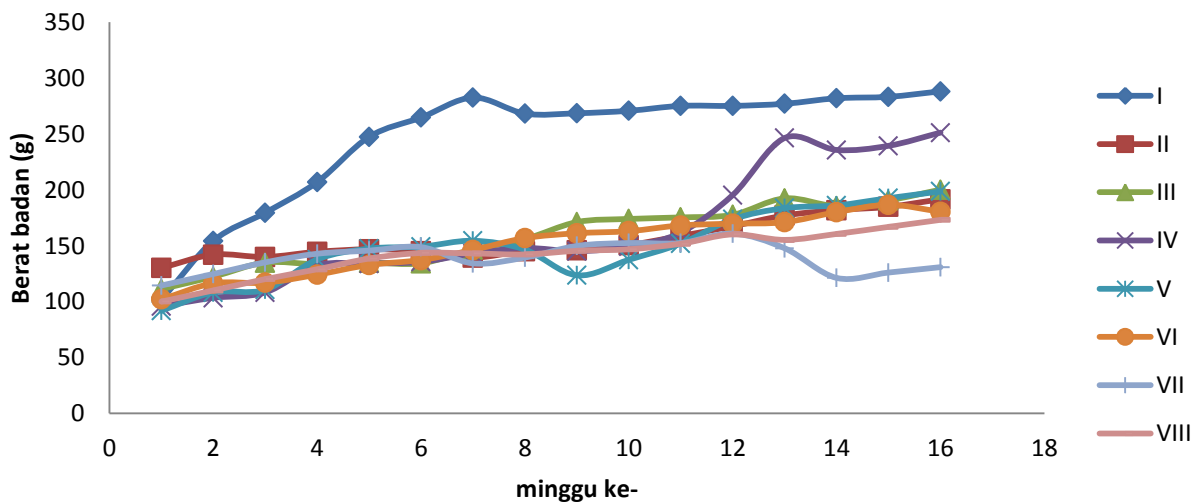
Tikus betina *Sprague Dawley* berumur 1 bulan dibagi menjadi 8 kelompok masing-masing kelompok terdiri dari 7 ekor tikus putih betina *Sprague Dawley*. Kelompok 1 (normal) hanya diberi pakan dan minum, kelompok 2 diberikan fraksi etil asetat akar pasak bumi dosis 100 mg/kgBB,

kelompok 3 (kontrol positif) diberikan doxorubicin dosis 1,17 mg/kgBB 1 kali seminggu selama 5 minggu, kelompok 4 diberikan DMBA dosis 20 mg/kgBB 2 kali seminggu selama 5 minggu, kelompok 5 diberikan DMBA 20 mg/kgBB+doxorubicin 1,17 mg/kgBB, kelompok 6 diberikan DMBA 20 mg/kgBB+fraksi etil asetat akar pasak bumi 100 mg/kgBB, kelompok 7 diberikan DMBA 20 mg/kgBB+doxorubicin 1,17 mg/kgBB+fraksi etil asetat akar pasak bumi 100 mg/kgBB, kelompok 8 doxorubicin 1,17 mg/kgBB+fraksi etil asetat akar pasak bumi 100 mg/kgBB pengamatan kejadian tumor dengan dilakukan palpasi pada minggu ke-6 perlakuan. Waktu pemberian DMBA serta doxorubicin dan fraksi etil asetat akar pasak bumi seperti terlihat pada Tabel I.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penyakit kanker perlu ditangani dari berbagai aspek. Salah satu factor resiko untuk kelangsungan hidup pasien adalah kelebihan berat badan (Maskarinec and Harmon., 2015). Hal lain yang perlu dikaji adalah perlunya suatu ko-kemoterapi (Ignatiadis dan Singhal., 2012).

Berat badan tikus dalam penelitian ini setiap seminggu sekali selama 16 minggu. Hasil Pengukuran terhadap berat badan hewan uji yang dilakukan menunjukkan kenaikan rata-rata berat badan pada seluruh kelompok perlakuan. Data selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Rata-rata berat badan tikus yang diinduksi DMBA dan ko-kemoterapi doxorubicin dan fraksi etil asetat akar pasak bumi

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap data berat badan hewan uji, masing-masing kelompok tidak mengalami penurunan setelah induksi DMBA sampai minggu ke-5. Pada beberapa penelitian lain umumnya rata-rata berat badan kelompok perlakuan lebih rendah dari kelompok kontrol. Sedangkan pada penelitian yang telah dilakukan terjadi penurunan berat-badan sekitar minggu ke-9 pada kelompok V (DMBA+doxorubicin) dan selanjutnya terjadi kenaikan yang tidak signifikan. Hal ini disebabkan oleh adanya efek samping dari doxorubicin yang dapat menurunkan berat badan (Ganti, Liu *et al.*, 2014).

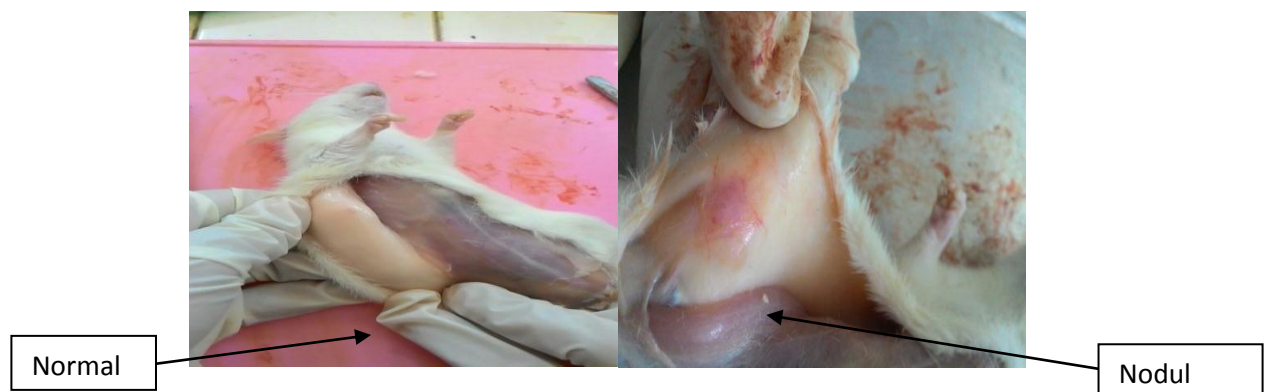
Pengamatan kejadian tumor dan palpasi yang dilakukan selama penelitian diperoleh data bahwa ditemukan adanya benjolan yang dapat teraba atau pertumbuhan tumor pada permukaan tubuh hewan uji dari kelompoknya yang diinduksi DMBA walaupun nodul hanya teraba pada beberapa tikus saja. Hasil palpasi terhadap organ *mamae* setelah dilakukannya pembedahan terhadap hewan uji pada minggu ke 16 menunjukkan adanya nodul atau benjolan didaerah sekitar *mamae* pada beberapa tikus. Data pengamatan dapat dilihat pada Tabel III dan nodul yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 2. Senyawa DMBA merupakan senyawa yang dapat menginduksi terjadinya tumor (Choi dan Cheong, 2014).

Doxorubicin merupakan senyawa yang dapat menurunkan kanker dengan berbagai mekanisme diantaranya meningkatkan system imun (Alizadeh, Trad *et al.*, 2014), meregulasi transkripsi sel kanker

(Latorre, Tebaldi *et al.*, 2012), serta penurunan protein kinase (Davidson, Grenier *et al.*, 2012). Jumlah nodul dalam penelitian ini menurun dimungkinkan karena oleh efek tersebut. Fraksi etil asetat akar pasak bumi juga mempunyai efek salah satunya menurunkan protein kinase sel kanker (Al-Salahi, *et al.*, 2014). Adanya tambahan fraksi tidak menyebabkan jumlah nodul menurun dibandingkan dengan doxorubicin tunggal. Hal ini terlihat pada Tabel II. Namun demikian perlu dilakukan penelitian lebih lanjut atas kemungkinan dilakukannya penurunan dosis doxorubicin saat ditambah fraksi etil asetat akar pasak bumi Hal ini perlu dilakukan untuk menurunkan efek samping doxorubicin.

Tabel II. Jumlah nodul pada setiap kelompok uji ko-kemoterapi fraksi etil asetat akar pasak bumi dan doxorubicin pada tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi DMBA

Kelompok	Jumlah Nodul Yang Terbentuk
I (Normal)	0
II (Fraksi Etil Asetat Akar Pasak Bumi)	0
III (Doxorubicin)	0
IV (DMBA)	3
V (DMBA+Doxorubicin)	1
VI (DMBA+ Fraksi Etil Asetat Akar Pasak Bumi)	1
VII (DMBA+ Fraksi Etil Asetat Akar Pasak Bumi+Doxorubicin)	1
VIII (Doxorubicin+ Fraksi Etil Asetat Akar Pasak Bumi)	0



Gambar 2. Nodul pada hewan uji yang terbentuk pada uji ko-kemoterapi fraksi etil asetat akar pasak bumi dan doxorubicin pada tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi DMBA

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan bahwa pemberian kombinasi fraksi etil asetat akar pasak bumi dan doxorubicin dapat meningkatkan berat badan hewan uji serta menurunkan terjadinya nodul.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih disampaikan kepada Pemerintah RI melalui Kemenristek RI atas bantuan dana Hibah Penelitian Tim Hibah Pascasarjana, tahun anggaran 2015/2016.

DAFTAR PUSTAKA

Al-Salahi OSA, Ji D, Majid AMSA, Kit-Lam C, Abdullah WZ, Zaki A, Din SKKJ, Yusoff NM, Majid ASA, 2014, Anti-Tumor Activity of *Eurycoma longifolia* Root Extracts against K-562 Cell Line: *In Vitro* and *In Vivo* Study, *PLoS ONE* , 9 (1): 13-16

- Alizadeh, D., M. Trad, 2014, Doxorubicin eliminates myeloid-derived suppressor cells and enhances the efficacy of adoptive T-cell transfer in breast cancer, *Cancer Research*, 74(1): 104-118.
- Choi, Y. J. and Y. Cheong, 2014, The chemo-preventive effect of ER- β agonist on DMBA induced breast cancers, *Cancer Research*, 74 (19 Supplement): 2146-2146.
- Davidson, D., J. Grenier, et al., 2012, Effects of the novel DNA dependent protein kinase inhibitor, IC486241, on the DNA damage response to doxorubicin and cisplatin in breast cancer cells, *Invest New Drug*, 30:1736
- Ganti, A., W. Liu., 2014, Impact of body mass index on incidence of febrile neutropenia and treatment-related mortality in United States veterans with diffuse large B-cell lymphoma receiving rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone, *British Journal of Haematology*, 167(5): 699-702.
- Gao J, Lauer FT, Dunaway S, Burchiel SW., 2005, Cytochrome P450 1B1 is required for 7,12-dimethylbenz(α)-anthracene (DMBA) induced spleen cell immunotoxicity, *Toxicol Sci*, 86(1):68-74
- Hodgson E.,2001, In vitro human phase I metabolism of xenobiotics I : pesticides and related chemicals used in agriculture and public health, September 2001., *J Biochem Mol Toxicol*, 15 (6), 296-299
- Ignatiadis, M., Singhal, S.K., 2012, Gene modules and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer subtypes: a pooled analysis, *Journal of clinical oncology*, : JCO. 2011.39. 5624.
- Kuo, P.-C., L.-S. Shi, A. G. Damu, 2003, Cytotoxic and antimalarial carboline alkaloids from the roots of *Eurycoma longifolia*, *Journal of Natural Products*,66(10): 1324-1327.
- Latorre, E., T. Tebaldi., 2012, Downregulation of HuR as a new mechanism of doxorubicin resistance in breast cancer cells, *Mol Cancer*, 11(13): 10.1186.
- Maskarinec, G., B. E. Harmon., 2015, Excess body weight and colorectal cancer survival: the multiethnic cohort, *Cancer Causes & Control*, 26(12): 1709-1718.
- Mawaddah, R.D., Meutia F., Sofia, Yusuf, H., 2013, The Acute Toxicity of Methanolic Extract of *Eurycoma longifolia* Jack Roots and Histopathologic Changes of Rat Vital Organs, *Int. Res J Pharm. App Sci.*, 3(3):13-17
- Melendez-colon, V.J.,Luch, A., Seidel., Baird, W.M., 2000, Formation of stable DNA adducts and apurinic sites upon metabolic activation of bay and fjord region polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell cultures, *Chem Res Toxicol*, 13 (1), 10-17
- Melendez-colon, V.J., Luch, A., Seidel A., Baird, W.M., 1999, Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than apurinic sites, *Carcinogenesis*, 20 (10), 1885-1891.
- Nurkhasanah Mahfudh1 and Azimahtol Hawariah Lope Pihie., 2008, Eurycomanone Induces Apoptosis through the Up-Regulation of p53 in Human Cervical Carcinoma Cells, *Journal of Cancer Molecules*, 4(4): 109-115.
- Pierobon, M. and C. L. Frankenfeld, 2012, Obesity as a risk factor for triple-negative breast cancers: a systematic review and meta-analysis, *Breast cancer research and treatment*, 137(1): 307-314.
- Siswandono, Soekardjo, B., 2000, *Kimia Medisinal*, Edisi 2, Airlangga University, Surabaya
- Tada H, Yasuda F, Otani K, Doteuchi M, Ishihara Y, Shiro M, 1991, New antiulcer quassinoids from *Eurycoma longifolia*, *Journal Medical Chemistry*: 26, 345-349
- Tee, T.T. and Hawariah L.P.A., 2005, Induction of Apoptosis by *Eurycoma longifolia* Jack Extracts, *Anticancer Research*,25: 2205-2214.
- Tjiandarbumi, D.,and Mangunkusumo, R.,2001, *Cancer In Indonesia Present and Future*, Departements of Sugery and Pathologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, Hal 1-21.