

NASKAH PUBLIKASI

EFEK NEFROPROTEKTIF FRAKSI ETIL ASETAT DAUN KESUM
(*Polygonum minus* Huds.) PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)
GALUR WISTAR YANG DIINDUKSI *CISPLATIN*



NELLY

I11109019

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS TANJUNGPURA

2013

LEMBAR PENGESAHAN
NASKAH PUBLIKASI

EFEK NEFROPROTEKTIF FRAKSI ETIL ASETAT DAUN KESUM (*Polygonum minus* Huds.) PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) JANTAN GALUR WISTAR YANG DIINDUKSI CISPLATIN

TANGGUNG JAWAB YURIDIS MATERIAL PADA

NELLY
NIM 111109019

DISETUJUI OLEH

PEMBIMBING UTAMA

PEMBIMBING KEDUA

Indri Kusharyanti M.Sc, Apt
NIP. 198303112006042001

dr. Mardhia
NIP. 198504172010122004

PENGUJI PERTAMA

PENGUJI KEDUA

dr. Heru Fajar Trianto, M.Biomed
NIP. 198410132009121005

dr. Rangga Putra Nugraha
NIP. 198607142012121001

MENGETAHUI,
DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS TANJUNGPURA

dr. Sugito Wonodirekso, MS
NIP. 194810121975011001

**EFEK NEFROPROTEKTIF FRAKSI ETIL ASETAT DAUN KESUM
(*Polygonum minus* Huds.) PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)
GALUR WISTAR YANG DIINDUKSI *CISPLATIN***

Nelly¹, Indri Kusharyanti², Mardhia³

INTISARI

Latar Belakang. *Cisplatin* digunakan sebagai agen kemoterapi kanker secara luas namun sering menyebabkan nefrotoksisitas. Kesum (*Polygonum minus* Huds.) merupakan tanaman yang terbukti memiliki aktivitas antioksidan kuat. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek nefroprotektif fraksi etil asetat daun kesum pada tikus putih yang diinduksi *cisplatin*. **Metodologi.** Penelitian ini merupakan penelitian “*Randomized Post Test Only Controlled Group*” yang menggunakan 15 tikus putih jantan galur Wistar yang dibagi dalam 5 kelompok: kontrol negatif (CMC 1%), kontrol *cisplatin* (5mg/kgBB), kelompok dosis I (0,707mg/200gBB), dosis II (1,414mg/200gBB) dan dosis III (2,828mg/200gBB). Kelompok dosis I, II, dan III diberi fraksi etil asetat selama 10 hari secara per oral dan diinduksi dosis tunggal *cisplatin* hari ke-5 secara intraperitoneal. Fraksi etil asetat daun kesum diperoleh dengan cara maserasi dengan larutan metanol 70% dan dilanjutkan dengan fraksinasi cair-cair. Efek nefroprotektif diukur berdasarkan kadar ureum dan kreatinin serum serta gambaran histopatologi kerusakan sel tubulus proksimal ginjal. Teknik analisis data menggunakan *One way ANOVA* dilanjutkan dengan *LSD Post Hoc Test*. **Hasil.** Fraksi etil asetat daun kesum dosis I, II, dan III memberikan efek pencegahan nefrotoksisitas *cisplatin* yang ditunjukkan dengan kadar ureum dan kreatinin serum serta gambaran histopatologi ginjal yang berbeda signifikan dengan kontrol *cisplatin* ($p < 0,05$). Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa pemberian fraksi etil asetat daun kesum memiliki efek nefroprotektif yang meningkat seiring dengan peningkatan dosis. **Kesimpulan.** Fraksi etil asetat daun kesum (*Polygonum minus* Huds.) dapat memberikan efek nefroprotektif pada tikus putih yang diinduksi *cisplatin*.

Kata kunci: *Polygonum minus* Huds., *cisplatin*, nefroprotektif, ureum, kreatinin

- 1) Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura Pontianak, Kalimantan Barat
- 2) Departemen Farmasi Klinis, Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura Pontianak, Kalimantan Barat
- 3) Departemen Mikrobiologi, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura Pontianak, Kalimantan Barat

**NEPHROPROTECTIVE EFFECT OF ETHYL ACETATE FRACTION OF
KESUM (*Polygonum minus* Huds.) LEAF ON ALBINO WISTAR RATS
(*Rattus norvegicus*) INDUCED BY CISPLATIN**

Nelly¹, Indri Kusharyanti², Mardhia³

ABSTRACT

Background. Cisplatin is widely used as the chemotherapy agent although it often causes nephrotoxicity. Kesum (*Polygonum minus* Huds.) is a plant that proven to have strong antioxidant activity. **Purpose.** The purpose of this study was to determine the nephroprotective effect of ethyl acetate fraction of kesum leaf on cisplatin-induced albino rats. **Methodology.** This was a randomized post test only controlled group study using fifteen male albino wistar rats divided into 5 groups: negative control (CMC 1%), control of cisplatin (5mg/kgBW), dose group I (0,707 mg/200gBW), dose II (1,414 mg/200gBW) and dose III (2,808 mg/200gBW). Dose groups I, II, and III were given fraction of ethyl acetate for 10 days orally and induced dose cisplatin day 5 in intraperitoneal. Ethyl acetate fraction of kesum leaf obtained by maceration using methanol 70%, followed by liquid-liquid fractionation. Nephroprotective effect was measured by the concentration of serum urea and creatinine, also the histopathological image of damaged proximal tubular cells. Data were analyzed by One way ANOVA followed by LSD Post Hoc Test. **Results.** Dose groups I, II, and III of ethyl acetate fraction of kesum leaf give preventive effect against cisplatin-induced nephrotoxicity showed by the concentration of urea and creatinine serum also the histopathological image of renal that are significantly different from the cisplatin control group ($P < 0,05$). The results also showed that administration of ethyl acetate fraction of kesum leaf has increased nephroprotective effect along with the increasing doses. **Conclusion.** Ethyl acetate fraction of kesum leaf can give the nephroprotective effect on cisplatin-induced albino rats.

Keywords: *Polygonum minus* Huds., cisplatin, nephroprotective, urea, creatinine

1) Medical School, Faculty of Medicine, University of
Tanjungpura, Pontianak, West Borneo

- 2) *Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Tanjungpura, Pontianak, West Borneo*
- 3) *Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Tanjungpura, Pontianak, West Borneo*

LATAR BELAKANG

Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum (II), CDDP) adalah salah satu obat antineoplastik paling efektif dan paling sering digunakan sebagai agen kemoterapi kanker. Penggunaan *cisplatin* secara klinis terbukti berhasil memberikan prognosis yang lebih baik dan menurunkan tingkat mortalitas pasien kanker.¹ Tingkat keberhasilan kemoterapi *cisplatin* sebanding dengan dosis *cisplatin* yang diberikan. Akan tetapi semakin besar dosis *cisplatin*, semakin berat pula efek samping utama *cisplatin* yaitu nefrotoksisitas.²

Biaya dialisis yang mahal serta kelemahan terapi suportif kemoterapi *cisplatin* yang telah ada saat ini meningkatkan pencarian obat herbal sebagai agen kemoprotektif untuk mengurangi nefrotoksisitas yang diinduksi *cisplatin* dengan biaya dan efek samping yang minimum.³ Kombinasi obat-obat herbal yang memiliki aktivitas antioksidan dengan *cisplatin* terbukti memiliki efek signifikan dalam mencegah nefrotoksisitas dengan menurunkan radikal bebas dan peroksidasi lipid yang merusak sel ginjal.^{3,4,5}

Kesum (*Polygonum minus* Huds.) yang merupakan tanaman yang banyak dimanfaatkan sebagai bumbu dalam makanan khas Kalimantan Barat serta obat tradisional diketahui memiliki aktivitas antimikroba dan antioksidan.⁶ Ekstrak metanol daun kesum memiliki aktivitas antioksidan yang termasuk golongan sangat aktif dalam penangkapan radikal bebas 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).⁷ Aktivitas antioksidan tinggi berkorelasi positif dengan adanya kandungan total komponen fenolik yang tinggi dalam daun kesum.⁸

Skrining fitokimia fraksi etil asetat terhadap daun kesum menunjukkan adanya senyawa golongan fenolik, alkaloid, dan flavonoid.⁹ Senyawa golongan alkaloid sendiri terbukti memiliki efek inhibisi yang kuat terhadap peroksidasi lipid melalui aktivitas antioksidannya.¹⁰

Berdasarkan tinjauan di atas, fraksi etil asetat daun kesum diduga memiliki efek nefroprotektif karena kandungan zat aktif di dalamnya dan perlu dilakukan uji efek nefroprotektif fraksi etil asetat daun kesum pada tikus putih galur wistar yang diinduksi *cisplatin*.

BAHAN DAN METODE

Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain penelitian "*Randomized Post Test Only Controlled Group*" yang menggunakan hewan uji tikus putih jantan galur Wistar sebagai subjek penelitian.

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada Februari 2013 sampai Maret 2013. Tempat penelitian meliputi Laboratorium Farmasetika dan Farmakologi Fakultas Kedokteran UNTAN Pontianak dan Laboratorium Biologi Fakultas MIPA UNTAN Pontianak.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu berupa bejana maserasi, neraca analitik, spuit injeksi dan oral, ayakan no. 60, penangas air, mikroskop *Zeiss PrimoStar*, *centrifuge*, mikropipet, oven, kertas film, blok parafin, mikrotom, *incubator*, desikator, *rotary evaporator*, corong buchner, pompa vakum, cawan penguap, batang pengaduk, termometer, vortex dan spektrofotometer *UV-VIS*.

Bahan yang digunakan yaitu simplisia daun kesum, pelarut metanol, pelarut etil asetat, pelarut n-heksan, kertas saring, kloroform, asam klorida, larutan basa ammonia 1%, asam asetat glasial, pereaksi meyer dan dragendorf, serbuk magnesium, H_2SO_4 , larutan $FeCl_3$ 1%, larutan CMC 1%, *cisplatin*, kit reagen kreatinin dan ureum, organ ginjal

tikus, NaCl fisiologis 0,9%, larutan fiksatif, alkohol (70%, 80%, 90%, 95%, dan 100%), xylol, paraffin, aquades, pewarna hematoksilin dan eosin.

Metode

Persiapan Hewan Percobaan

Tikus putih jantan galur Wistar berumur 2-3 bulan dengan berat badan 100-200 gram dan sehat.

Pembuatan Ekstrak dan Fraksi

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan metanol selama 5 hari, kemudian di fraksinasi dengan metode fraksinasi bertingkat menggunakan pelarut N-heksan, etil asetat dan metanol berturut-turut.

Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia menggunakan uji tabung. Adapun uji skrining fitokimia yang dilakukan meliputi pemeriksaan alkaloid, polifenol, tanin, flavonoid, steroid-triterpenoid dan saponin.

Penentuan Dosis *Cisplatin*

Cisplatin diberikan melalui injeksi intra peritoneal, dengan dosis sebesar 5 mg/kg BB tikus untuk semua kelompok perlakuan kecuali kelompok CMC.¹¹

Pembuatan larutan fraksi dan penentuan dosis

Dosis yang digunakan untuk tikus adalah 0,707 mg/200 gBB (dosis I), 1,414 mg/200 gBB (dosis II) dan 2,828 mg/200 gBB (dosis III). Fraksi dibuat dalam suspensi sebanyak 10 ml, dengan larutan CMC 1% yang ditambahkan hingga 10 ml.

Perlakuan terhadap hewan percobaan

Perlakuan dilakukan dengan membagi lima belas tikus kedalam lima kelompok secara acak. Kelompok I hanya diberikan suspensi CMC 1% sebagai kontrol CMC selama 10 hari. Kelompok II diberikan dosis tunggal *cisplatin* 5 mg/kg BB melalui injeksi peritoneal dan dibiarkan selama 5 hari kemudian dikorbankan. Kelompok III, IV dan V diberikan variasi dosis I, II dan III selama 10 hari, dimana pada hari kelima, 1 jam setelah pemberian dosis, tikus diinduksi *cisplatin* 5 mg/kg BB secara intra peritoneal 1 jam. Pada hari kesepuluh, tikus dikorbankan untuk diukur kadar kreatinin dan ureum dalam serum dan derajat kerusakan ginjal melalui pemeriksaan preparat histopatologi.¹²

Pengukuran kadar Kreatinin dan Ureum

Darah tikus di sentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm selama 20 menit untuk diambil serumnya. Serum darah diukur kadar ureum dan kreatinin serum dengan menggunakan spektrofotometer *UV-VIS*.

Pengukuran Derajat Kerusakan Ginjal

Pembuatan preparat histologi dilakukan secara bertahap sebagai berikut: fiksasi, dehidrasi, pencetakan, pemotongan dan pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE). Secara kualitatif, tiap preparat diamati perubahan struktur histopatologi pada tubulus kontortus proksimal berupa nekrosis sel tubulus, dilatasi, vakuolisasi, pembentukan *cast*, dan hilangnya *brush border*. Secara semi-kuantitatif, dibaca 100 tubulus proksimal dengan perbesaran 400x pada daerah perbatasan bagian luar medula dengan korteks bagian dalam. Dihitung jumlah tubulus yang mengalami kerusakan dalam 100 tubulus dan ditentukan tingkat kerusakan ginjal berdasarkan persentase kerusakan tubulus yaitu 0 (0%), 1 (1-10%), 2 (11%-25%), 3 (26%-50%), 4 (51%-75%) dan 5 (>75%).¹³

Analisis data

Teknik analisis data menggunakan *One way ANOVA* dan *Post Hoc Test (LSD)*.

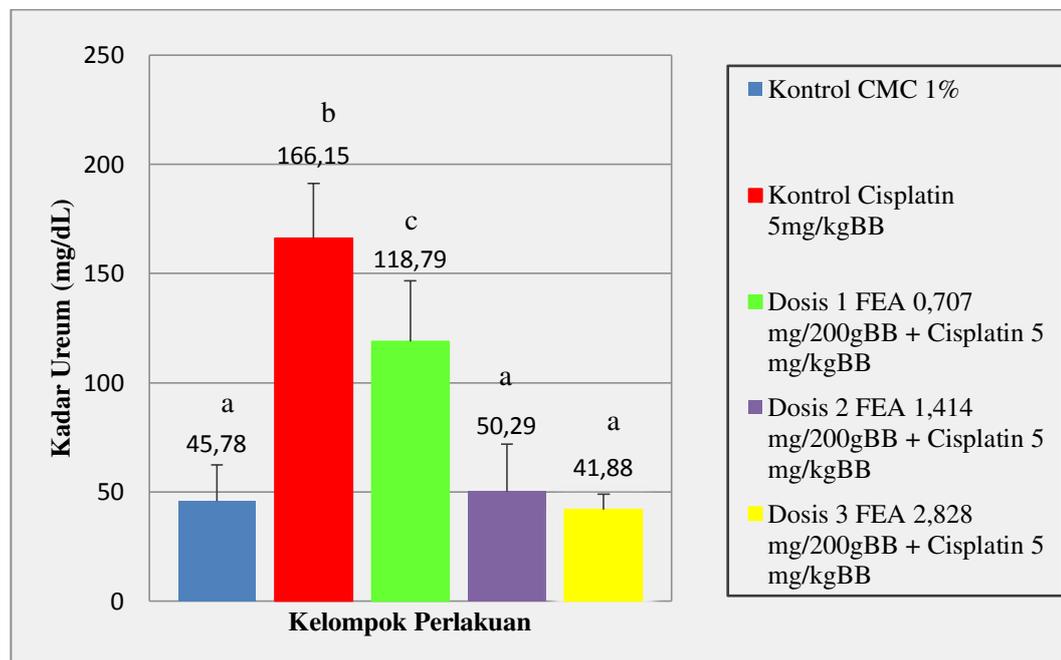
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil ekstraksi pada penelitian ini diperoleh ekstrak metanol kental daun kesum sebanyak 78,349 gram dengan rendemen sebesar 5,7%. Sedangkan fraksi etil asetat kental daun kesum yang didapat sebanyak 4,08 gram, dengan rendemen sebesar 5,16%. Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak metanol mengandung senyawa flavonoid, tanin, triterpenoid, alkaloid, saponin dan polifenol. Sedangkan hasil skrining fitokimia fraksi etil asetat daun kesum mengandung senyawa fenolik, alkaloid, dan flavonoid.

Kadar Ureum Serum

Hasil yang diperlihatkan pada gambar 1 menunjukkan bahwa kelompok *cisplatin* kadar ureum ($166,15 \pm 25,04$ mg/dL) lebih tinggi daripada kelompok kontrol CMC ($45,78 \pm 16,68$ mg/dL). Hal ini menandakan bahwa telah terjadi peningkatan kadar ureum karena sel ginjal telah mengalami kerusakan akibat pemberian *cisplatin*. Kerusakan sel terjadi karena penginduksian *cisplatin* dengan dosis 5 mg/kg BB tikus yang diberikan secara intraperitoneal (ip) menyebabkan tubulus nekrosis akut yang ditandai dengan peningkatan kadar ureum dalam plasma.¹¹ Sedangkan rata-rata kadar ureum kelompok dosis I ($118,79 \pm 27,89$ mg/dL), dosis II ($50,29 \pm 21,52$ mg/dL) dan dosis III ($41,88 \pm 7,13$ mg/dL) yang perlakuannya diberikan *cisplatin* dan fraksi etil asetat daun kesum dosis 0,707 mg/200gBB, 1,414 mg/200gBB, dan 2,828 mg/200 gBB memiliki rata-rata kadar ureum yang lebih rendah dan berbeda bermakna ($p < 0,05$) dengan kelompok *cisplatin*. Hal ini menunjukkan terjadi pencegahan kerusakan ginjal akibat pemberian fraksi etil asetat kesum.

Grafik rata-rata kadar ureum serum tikus pada gambar 1 juga menunjukkan bahwa kadar ureum serum tikus kelompok perlakuan fraksi etil asetat daun kesum dosis I berbeda nyata dengan kelompok *cisplatin* maupun kelompok kontrol CMC ($p < 0,05$) yang artinya pemberian fraksi etil asetat dosis I telah berhasil menurunkan kadar ureum serum tikus yang diinduksi *cisplatin* meskipun belum mencapai kadar ureum serum tikus yang hanya mendapatkan CMC. Ketika dosis fraksi etil asetat ditingkatkan pada kelompok perlakuan dosis II dan III, kadar ureum serum tikus tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol CMC ($p > 0,05$) yang menunjukkan dosis II dan III dapat menurunkan kadar ureum serum tikus yang diinduksi *cisplatin* hingga mencapai kadar ureum serum tikus kelompok kontrol CMC. Sehingga dapat disimpulkan bahwa peningkatan pemberian dosis fraksi etil asetat daun kesum dapat meningkatkan efek pencegahan kerusakan ginjal yang diinduksi *cisplatin*.

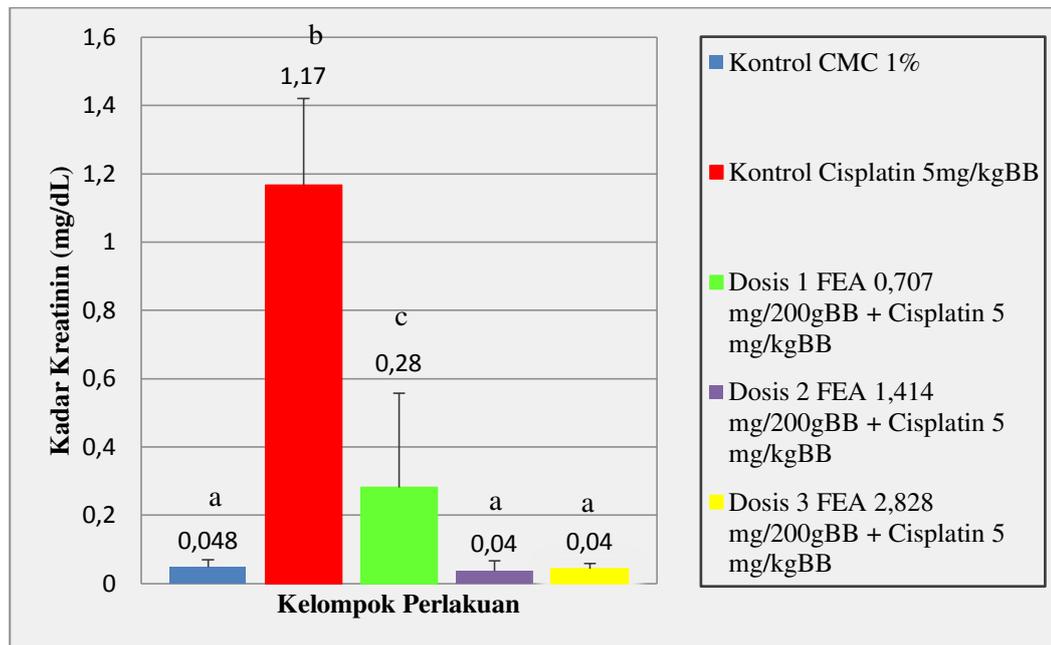


Gambar 1. Grafik Rataan Kadar Ureum Serum Tikus. Keterangan: a dan a tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$), a dan b berbeda bermakna ($p < 0,05$), a dan c berbeda bermakna ($p < 0,05$), b dan c berbeda bermakna ($p < 0,05$) menggunakan metode *Post Hoc Test Multiple Comparisons-LSD*.

Kadar Kreatinin Serum

Hasil yang diperlihatkan pada gambar 2 menunjukkan bahwa kelompok *cisplatin* kadar kreatinin ($1,167 \pm 0,254$ mg/dL) lebih tinggi daripada kelompok kontrol CMC ($0,048 \pm 0,021$ mg/dL). Hal ini menandakan bahwa telah terjadi peningkatan kadar kreatinin karena sel ginjal telah mengalami kerusakan akibat pemberian *cisplatin*. Kerusakan sel terjadi karena penginduksian *cisplatin* dengan dosis 5 mg/kg BB tikus yang diberikan secara intraperitoneal (ip) menyebabkan tubulus nekrosis akut yang ditandai dengan peningkatan kadar kreatinin dalam plasma.¹¹ Sedangkan rata-rata kadar kreatinin kelompok dosis I ($0,282 \pm 0,276$ mg/dL), dosis II ($0,037 \pm 0,029$ mg/dL) dan dosis III ($0,043 \pm 0,016$ mg/dL) yang perlakuannya diberikan fraksi etil asetat daun kesum memiliki rata-rata kadar kreatinin yang lebih rendah dan berbeda bermakna ($p < 0,05$) dengan kelompok *cisplatin* ($1,167 \pm 0,254$ mg/dL). Hal ini menunjukkan terjadi pencegahan kerusakan sel ginjal akibat pemberian fraksi etil asetat kesum.

Grafik rata-rata kadar kreatinin serum tikus pada gambar 2 juga menunjukkan bahwa kadar kreatinin serum tikus kelompok perlakuan fraksi etil asetat daun kesum dosis I berbeda nyata dengan kelompok *cisplatin* maupun kelompok kontrol CMC ($p < 0,05$) yang artinya pemberian fraksi etil asetat dosis I telah berhasil menurunkan kadar kreatinin serum tikus yang diinduksi *cisplatin* meskipun belum mencapai kadar kreatinin serum tikus yang hanya mendapatkan CMC. Ketika dosis fraksi etil asetat ditingkatkan pada kelompok perlakuan dosis II dan III, kadar kreatinin serum tikus tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol CMC ($p > 0,05$) yang menunjukkan dosis II dan III dapat menurunkan kadar kreatinin serum tikus yang diinduksi *cisplatin* hingga mencapai kadar kreatinin serum tikus kelompok kontrol CMC. Sehingga dapat disimpulkan bahwa peningkatan pemberian dosis fraksi etil asetat daun kesum dapat meningkatkan efek pencegahan kerusakan ginjal yang diinduksi *cisplatin*.



Gambar 2. Grafik Rataan Kadar Kreatinin Serum Tikus Semua Perlakuan. Keterangan: a dan a tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$), a dan b berbeda bermakna ($p < 0,05$), a dan c berbeda bermakna ($p < 0,05$), b dan c berbeda bermakna ($p < 0,05$) menggunakan metode *Post Hoc Test Multiple Comparisons-LSD*.

Derajat Kerusakan Tubulus Ginjal

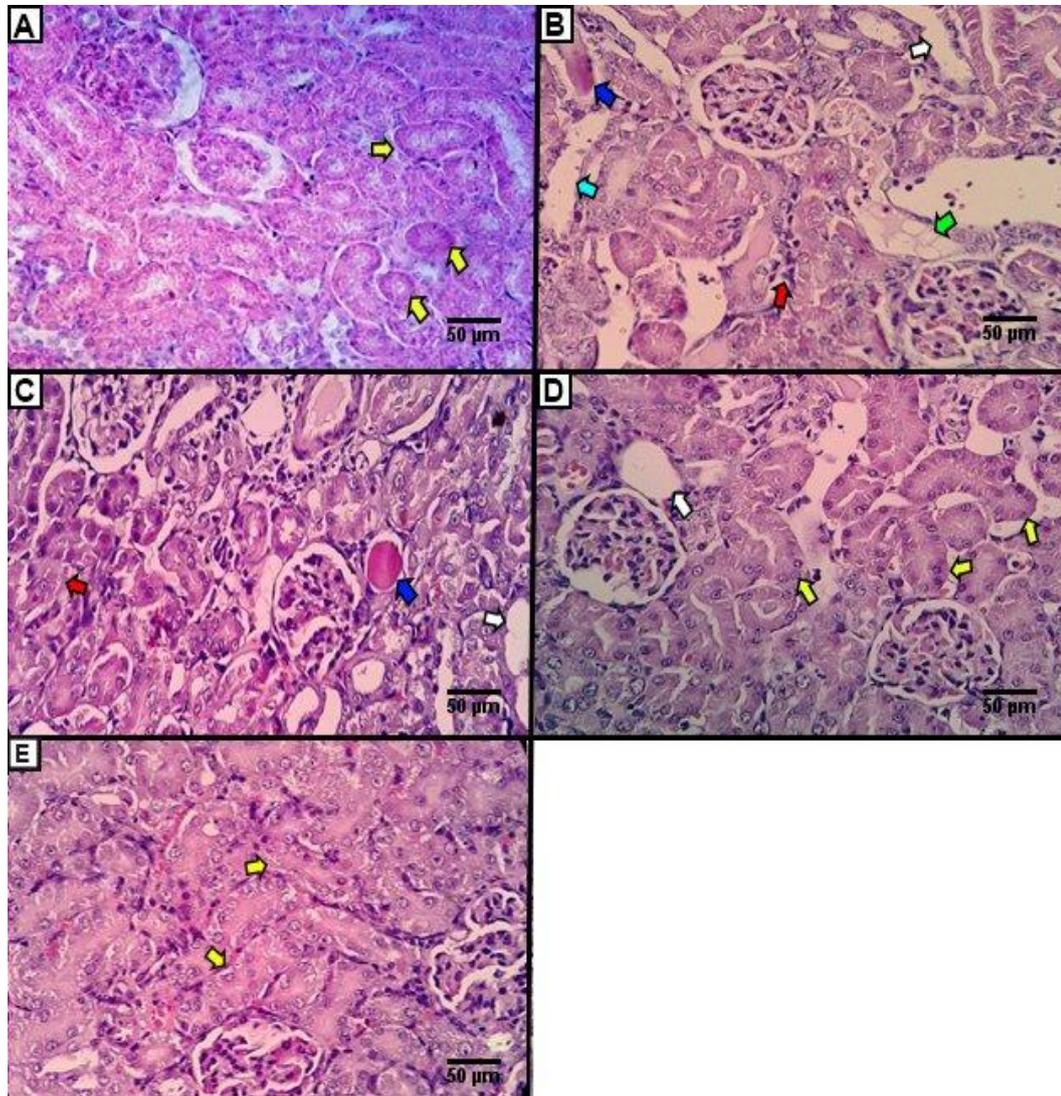
Tingkat kerusakan ginjal akibat nefrotoksisitas *cisplatin* diukur berdasarkan kerusakan pada sel tubulus proksimal. Hal ini sesuai dengan mekanisme kerja *cisplatin* yang menginduksi kerusakan DNA mitokondria dan DNA nukleus dengan membentuk ikatan silang utama pada N7 guanin serta berikatan kovalen dengan adenin dan sitosin sehingga tubulus proksimal ginjal sensitif terhadap toksisitas *cisplatin* karena bagian ginjal ini mengandung mitokondria terbanyak pada ginjal.¹⁴ Hasil kualitatif dari gambaran histopatologi ginjal tikus kelompok *cisplatin*, kontrol CMC, perlakuan fraksi etil asetat daun kesum dosis I, II, dan III dapat dilihat pada gambar 3.

Secara kualitatif, hasil histopatologi menunjukkan adanya perbedaan antara tikus kontrol CMC tanpa *cisplatin* dengan tikus yang

diinduksi *cisplatin*. Pada tikus kontrol CMC (A) yang tidak diinduksi *cisplatin* menunjukkan gambaran sel tubulus proksimal normal yang agak memanjang dibanding tubulus distal dilapisi oleh epitel selapis kuboid atau silindris. Sitoplasma jernih dengan lumen terbuka serta apek sel memiliki banyak mikrovili membentuk *brushborder* yang menambah luas permukaan penyerapan. Sel tubulus proksimal terlihat besar dengan 3 sampai 5 inti bulat yang terletak pada pusat sel. Sedangkan histologi sel ginjal kelompok *cisplatin* menunjukkan tanda-tanda terjadi nekrosis tubular akut berupa nekrosis, dilatasi, terbentuknya *cast*, vakuolisasi dan hilangnya *brush border* pada sel tubulus proksimal ginjal (B).

Nekrosis merupakan kematian sel jaringan akibat jejas saat individu masih hidup. Secara mikroskopik terjadi perubahan inti yaitu hilangnya kromatin, robek (*karioreksis*), inti tidak lagi mengambil warna banyak karena itu pucat tidak nyata (*kariolisis*). Sedangkan vakuolisasi tubulus adalah proses terbentuknya rongga-rongga pada sel dinding kapiler tubulus. Vakuolisasi merupakan ciri dari terjadinya degenerasi melemak pada ginjal. Hal ini disebabkan karena mekanisme kerja *cisplatin* yang mengikat DNA menyebabkan terganggunya fungsi faktor transkripsi sehingga terjadi gangguan metabolisme lemak. Degenerasi melemak yang terjadi akibat *cisplatin* termasuk makrovesikular atau steatosis yang ditandai pembentukan rongga-rongga yang besar pada sel dalam tubulus proksimal sehingga inti sel menjadi tergeser ke tepi. Sedangkan pada mikrovesikular dalam satu tubulus terbentuk rongga-rongga kecil yang mengelilingi satu inti di tengah tubulus. Kerusakan yang terjadi pada kelompok yang diinduksi *cisplatin* berupa sel epitel tubulus kontortus proksimal yang kehilangan *brush border* diikuti hilangnya integritas antarsel dan polaritas sel¹⁵. Hal ini menyebabkan sel yang mengalami deskuamasi dan debris sel berinteraksi dengan protein fibronektin membentuk *cast* atau endapan padat yang menyebabkan obstruksi lumen dan peningkatan tekanan tubulus yang berakibat kebocoran balik filtrat sehingga kadar kreatinin dan ureum darah meningkat. Hal ini

menunjukkan peningkatan kadar ureum dan kreatinin terjadi akibat nekrosis tubulus akut yang disebabkan oleh *cisplatin*.¹⁵



Gambar 3. Gambaran histopatologi ginjal tikus kelompok (A) kontrol CMC; (B) *cisplatin* 5 mg/kgBB intraperitoneal dosis tunggal; (C) *cisplatin* + fraksi etil asetat daun kesum dosis I; (D) *cisplatin* + fraksi etil asetat daun kesum dosis II; (E) *cisplatin* + fraksi etil asetat daun kesum dosis III. Gambaran histopatologi ginjal tikus yang menerima kontrol CMC menunjukkan sel tubulus normal (→). Ginjal tikus yang diinduksi *cisplatin* 5 mg/kgBB intraperitoneal dosis tunggal menunjukkan nekrosis sel tubulus (→), hilangnya *brush border* (⇨), dilatasi tubulus (⇨), pembentukan *cast* dalam lumen tubulus (⇨), dan vakuolisasi sel tubulus (⇨). Pemberian fraksi etil asetat daun kesum dosis I, II, dan III menunjukkan berkurangnya keparahan kerusakan ginjal. (HE, 400x)

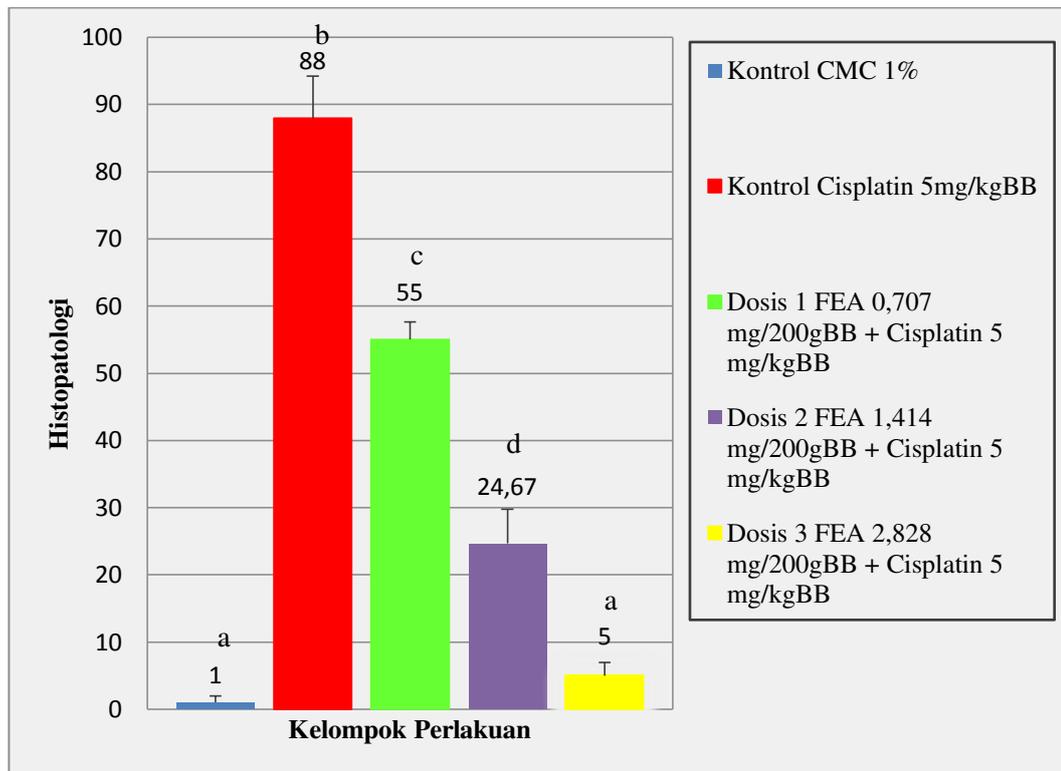
Dilatasi atau pelebaran lumen tubulus ginjal dapat disebabkan oleh hilangnya *brushborder*. Selain itu, kumpulan protein yang membentuk *cast* berakibat penyaluran melalui tubulus ginjal terhambat juga merangsang terjadi pelebaran atau dilatasi tubulus. Oleh sebab itu, pengobatan *cisplatin* umumnya dikombinasi dengan diuresis untuk mempercepat eliminasi *cast* yang menghambat kerja ginjal dalam melakukan fungsi ekskresi. Namun, sampai saat ini terapi kombinasi *cisplatin* dengan diuresis belum mampu menurunkan toksisitas *cisplatin* secara signifikan.¹⁴ Golongan obat dengan mekanisme antioksidan seperti amifostin telah menjadi standar kombinasi *cisplatin* untuk mencegah toksisitas pada ginjal dengan menetralkan radikal bebas sehingga mengurangi kerusakan sel tubulus ginjal. Namun amifostin tidak banyak digunakan secara klinis karena harganya yang mahal, efek samping pemberian amifostin itu sendiri, dan kontroversi mengenai selektivitas amifostin yang diduga memiliki efek protektif terhadap sel tumor) sehingga pengembangan obat-obat herbal dengan aktivitas antioksidan kuat seperti daun kesum semakin banyak dikembangkan untuk mengurangi toksisitas akibat *cisplatin*.^{3,16}

Hasil histopatologi sel tubulus kelompok perlakuan fraksi etil asetat daun kesum dosis I (C), dosis II (D), dosis III (E) dan diinduksi *cisplatin* menunjukkan berkurangnya keparahan kerusakan ginjal. Dengan demikian, secara mikroskopik terlihat efek pemberian daun kesum dapat mengurangi tingkat kerusakan sel ginjal akibat toksisitas *cisplatin*. Oleh karena itu dianalisis lebih lanjut secara kuantitatif untuk melihat tingkat kerusakan tubulus pada masing-masing kelompok sehingga dapat diketahui pengaruh dosis daun kesum dalam memberikan efek pencegahan kerusakan ginjal akibat *cisplatin*. Tingkat kerusakan sel tubulus dapat dilihat pada gambar 4.

Gambar 4 menunjukkan penginduksian *cisplatin* menyebabkan kerusakan tubulus proksimal $88 \pm 6,25\%$ (tingkat kerusakan 5) yang berbeda nyata dengan kelompok CMC dan semua perlakuan dosis. Perbandingan antara masing-masing kelompok perlakuan fraksi etil asetat

daun kesum memiliki hasil $p < 0,05$. Hal ini berarti terdapat perbedaan yang bermakna pada jumlah tubulus proksimal yang rusak antara masing-masing kelompok perlakuan.

Hasil kuantitatif histopatologi ginjal tikus kelompok perlakuan dosis I fraksi etil asetat berbeda nyata dengan kelompok *cisplatin* maupun kelompok kontrol CMC yang menunjukkan bahwa pemberian fraksi etil asetat dosis I telah berhasil menurunkan tingkat kerusakan tubulus kontortus proksimal ginjal tikus yang diinduksi *cisplatin* meskipun belum bisa mencapai tingkat yang sama dengan kelompok tikus normal yang hanya mendapatkan CMC. Ketika dosis fraksi etil asetat ditingkatkan pada kelompok perlakuan dosis II dan III, dapat dilihat peningkatan efek nefroprotektif fraksi etil asetat daun kesum yang ditunjukkan dengan semakin menurunnya tingkat kerusakan dari tingkat 5 pada kelompok *cisplatin* menjadi tingkat 4 pada kelompok perlakuan dosis I, kemudian menjadi tingkat 2 pada kelompok perlakuan dosis II, dan tingkat 1 pada kelompok perlakuan dosis III yang telah mencapai tingkat kerusakan yang sama dengan kelompok kontrol CMC. Hasil kuantitatif histopatologi ginjal tikus kelompok perlakuan dosis III fraksi etil asetat tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol CMC ($p < 0,05$) yang menunjukkan bahwa pemberian dosis III fraksi etil asetat daun kesum telah dapat mencegah kerusakan tubulus ginjal yang diinduksi *cisplatin* hingga mencapai hasil kuantitatif tubulus ginjal tikus normal yang hanya mendapatkan CMC. Dari hasil kuantitatif histopatologi ginjal tikus dapat disimpulkan bahwa peningkatan pemberian dosis fraksi etil asetat daun kesum dapat meningkatkan efek nefroprotektif pada tikus yang diinduksi *cisplatin* sehingga untuk memperoleh efek optimalnya perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan rentang dosis yang lebih lebar.



Gambar 4. Grafik Tingkat Kerusakan Tubulus. Keterangan: terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$) antara: a dan b; a dan c; a dan d; b dan c; b dan d; c dan d, sedangkan a dan a tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$) menggunakan metode *Post Hoc Test Multiple Comparisons-LSD*.

Cisplatin berikatan silang dengan DNA mitokondria sehingga menyebabkan kerusakan yang menginduksi peningkatan radikal bebas atau ROS (*Reactive Oxygen Spesies*), aktivasi protein p21 dan protein p53 yang menyebabkan disfungsi mitokondria berakibat terjadinya penurunan jumlah ATP intrasel yang menginduksi apoptosis dan nekrosis sel tubulus. Selain itu, peningkatan ROS memicu pembentukan TNF- α yang memicu respon inflamasi yang juga menyebabkan cedera tubulus dan kematian sel ginjal.¹⁴

Kombinasi obat-obat herbal yang mengandung senyawa fenolik dan flavonoid sebagai antioksidan telah terbukti memiliki efek signifikan dalam mencegah toksisitas ginjal akibat *cisplatin* dengan menurunkan radikal bebas dan peroksidasi lipid yang merusak sel ginjal.^{3,4,5} Hasil dari

penapisan fitokimia fraksi etil asetat daun kesum membuktikan adanya senyawa golongan fenolik, flavonoid dan alkaloid. Aktivitas nefroprotektif fraksi etil asetat daun kesum diduga karena adanya derivat flavonoid yang sama dengan *Polygonum odoratum* meliputi rutin (3.77%), catechin (0.34%), quercetin (0.08%), isohamnetin (0.01%) dan kaempferol (0.01%) yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi dalam menangkap radikal bebas.¹⁷ Aktivitas antioksidan pada senyawa flavonoid dan fenolik dikarenakan ketiga senyawa tersebut adalah senyawa-senyawa fenol, yaitu senyawa dengan gugus -OH yang terikat pada karbon cincin aromatik. Senyawa fenol ini mempunyai kemampuan untuk menyumbangkan atom hidrogen. Aktivitas antioksidan kuat pada daun kesum inilah yang diduga memiliki peranan terhadap efek pencegahan nefrotoksisitas akibat *cisplatin*.

Flavonoid merupakan salah satu golongan fenol terbesar yang berada di alam yang dapat melindungi tubuh dari radikal bebas melalui mekanisme antioksidan. Flavonoid dapat bekerja sebagai antioksidan primer yang dapat menghambat oksidasi dengan cara bereaksi terhadap radikal bebas reaktif sehingga radikal bebas ini menjadi stabil.¹⁸ Diduga hal ini menyebabkan jumlah proton yang didonorkan terhadap radikal bebas yang terbentuk mencukupi untuk menetralkan efek toksik radikal bebas dari *cisplatin*. Radikal bebas yang reaktif (ROS) tersebut dicegah berikatan dengan asam lemak tak jenuh membran sel mitokondria tubulus proksimal ginjal mengakibatkan inisiasi peroksidasi lipid yang merusak struktur dan fungsi mitokondria dalam pembentukan energi menjadi terhambat sehingga apoptosis dan nekrosis sel dapat dicegah. Hal ini juga menyebabkan dicegahnya aliran balik ureum dan kreatinin ke dalam darah sehingga kadar dalam darah mengalami penurunan kembali normal. Namun, perlu dilakukan pembuktian dengan penelitian lebih lanjut kadar antioksidan alami tubuh pada tikus yang diberi perlakuan daun kesum dan *cisplatin* serta dibandingkan efektifitas mekanisme antioksidan kesum

dengan menggunakan kontrol positif amifostin yang merupakan obat standar pencegahan nefrotoksisitas pada *cisplatin*.

Mekanisme nefroprotektif fraksi etil asetat daun kesum diduga sama dengan mekanisme flavonoid *quercetin* yang terdapat dalam tanaman *Polygonum*. Daun kesum diduga menghambat stres oksidatif pada sel akibat *cisplatin* dengan bertindak sebagai *scavenging agent* dalam menetralkan radikal bebas secara langsung dengan menyumbangkan pasangan elektron bebas. Secara tidak langsung, flavonoid dalam kesum diduga menghambat faktor transkripsi NF- κ B yang menginduksi produksi sitokin pro-inflamasi TNF- α sehingga mengurangi respon inflamasi sel ginjal akibat toksisitas *cisplatin*.¹⁹

Flavonoid merangsang aktivitas enzim detoksifikasi fase 2 yang mengkatalisis proses untuk mengeluarkan senyawa-senyawa kimia yang berpotensi toksik atau karsinogenik. Flavonoid juga dapat menurunkan proses inflamasi dan menjaga regulasi siklus sel normal dengan menghentikan siklus dari sel yang rusak sehingga tubuh memiliki waktu untuk memperbaiki atau menghancurkan sel rusak tersebut sebelum berproliferasi.²⁰ Pemberian flavonoid dapat meningkatkan *glomerular filtration rate* (GFR).²¹ Peningkatan GFR pada ginjal akan meningkatkan ekskresi terhadap ureum dan kreatinin sehingga kadar ureum dan kreatinin darah menurun. Selain flavonoid, fraksi etil asetat daun kesum juga mengandung alkaloid yang terbukti memiliki efek inhibisi yang kuat terhadap peroksidasi lipid pada isolasi jaringan dengan cara meningkatkan enzim superoksida dismutase (SOD).¹⁰

Dalam penelitian ini, penurunan kreatinin dan ureum serum serta jumlah tubulus kontortus proksimal yang rusak pada kelompok perlakuan berbanding lurus dengan peningkatan dosis fraksi etil asetat daun kesum yang diberikan. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh semakin meningkatnya kandungan fenolik, flavonoid, dan alkaloid pada tiap tingkatan dosis yang mencegah kerusakan ginjal akibat pemberian *cisplatin*.

Berdasarkan pemeriksaan hasil histopatologi sel tubulus proksimal ginjal serta kadar ureum dan kreatinin serum yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa pemberian fraksi etil asetat daun kesum dapat memberikan pengaruh yang nyata terhadap pencegahan kerusakan ginjal yang dibuktikan melalui penurunan kadar ureum dan kreatinin serta penurunan tingkat kerusakan pada histopatologi sel tubulus proksimal ginjal akibat nefrotoksisitas *cisplatin*. Peningkatan pemberian dosis fraksi etil asetat daun kesum juga terbukti meningkatkan efek nefroprotektif pada tikus putih yang diinduksi *cisplatin*.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat daun kesum (*Polygonum minus* Huds.) dapat memberikan efek nefroprotektif pada tikus putih galur Wistar yang diinduksi *cisplatin*. Fraksi etil asetat daun kesum kelompok dosis III dapat memberikan efek nefroprotektif terbesar pada tikus putih galur wistar yang diinduksi *cisplatin*, yaitu pada dosis 2,828 mg/200gramBB.

DAFTAR PUSTAKA

1. Florea AM, Busselberg D. *Cisplatin* as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*. 2011; 3:1351-1371.
2. Basu A, Krishnamurthy S. Cellular responses to *Cisplatin*-induced DNA damage. *Journal of Nucleic Acids*. 2010; 2011:16.
3. Javaid R, Aslam M, Nizami Q, Javaid R. Role of antioxidant herbal drugs in renal disorders: an overview. *Journal Free Radicals and Antioxidant*. 2012; 2(1): 02-05.
4. Karimi G, Khoei A, Omidi A, Kalantari M, Babaei J, Taghiabadi E, *et al*. Protective effect of aqueous and ethanolic extracts of

- Portulaca oleracea against *Cisplatin* induced nephrotoxicity. Irian Journal of Basic Medical Sciences.2009; 13(2):31-35.
5. Joy J, Krishnan C, and Nair K. Amelioration of *Cisplatin* induced nephrotoxicity in swiss albino mice by *Rubia cordifolia* extract. Journal of Cancer Research and Therapeutics.2008; 4(3): 111-115.
 6. Wibowo M A. Uji antimikroba fraksi metanol dan dietil-eter daun tanaman kesum (*Polygonum minus* Huds.). Agripura.2007; 4:26-31
 7. Almey, Azlim AA, Ahmed JK, Syed Z, Mustapha SK, Aisyah MR, *et al.* Total phenolic content and primary antioxidant activity of methanolic and ethanolic extracts of aromatic plants leaves. International Food Research Journal.2010; 17: 1077-1084.
 8. Maizura M, Aminah A, Aida WWM. Total phenolic content and antioxidant activity of kesum (*Polygonum minus*), ginger (*Zingiber officinale*), and tumeric (*Curcuma Longa*) extract. International Food Research Journal.2011; 18: 526-531.
 9. Wibowo MA. Efek antineoplasia fraksi etil asetat daun kesum pada hewan model kanker paru. Jurnal Kedokteran Hewan.2011; 5(1): 1-5.
 10. Shelkea TT, Bhaskarb VH, Adkara PP, Jhaa U, Oswala RJ. Nephroprotective activity of ethanolic extract of stem barks of *Crataeva nurvala* Buch Ham. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.2011; 2(10): 2712-2717.
 11. Ezz-Din D, Mohamed SG, Abdel RHF and Ahmed EAM. Physiological and histological impact of *Azadirachta indica* (neem) leaves extract in a rat model of *Cisplatin*-induced hepato and nephrotoxicity. Journal of Medicinal Plants Research.2011; 5(23): 5499-5506
 12. Michael, Kusharyanti I, dan Isnindar. Pengaruh ekstrak metanol daun kesum (*Polygonum minus* Huds.) terhadap peningkatan kadar kreatinin dan ureum serum tikus putih galur wistar terinduksi

- sisplatin. Pontianak: Jurusan Farmasi FK Universitas Tanjungpura; 2013.
13. Sadis C. Nicotine Protects Kidney from Renal Ischemia/Reperfusion Injury through the Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway. *PLoS ONE*. 2007; 2(5): e469. doi:10.1371/journal.pone.0000469
 14. Ronald PM, Raghu KT, Ganesan R, and William BR. Mechanisms of *Cisplatin* nephrotoxicity. *Toxins*. 2010; 2: 2490-2518
 15. Jorres A. Management of acute kidney problems. Berlin: Springer-Verlag; 2010.
 16. Harari PM, Connor NP dan Grau C. Functional preservation and quality of life in head and neck radiotherapy. Berlin: Springer-Verlag; 2009.
 17. Nanasombat S and Teckchuen N. Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2009; 3(5): 443-449.
 18. Waji RA, Sugrani A. Flavanoid (quarsetin). [Makalah kimia organik bahan alam]. Makassar: Program Pascasarjana, Universitas Hasanuddin; 2009.
 19. Gonzalez PDS, Francisco JLH, Fernando PB, Ana IM and Jose MLN. Quarsetin reduces *cisplatin* nephrotoxicity in rats without compromising its anti-tumor activity. *Nephrol Dial Transplant*. 2011; 0: 1-12
 20. Linus Paulus Institute. Tea phytochemicals. 2010. Available from: [URL: http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/tea/](http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/tea/). Accessed April 1, 2013.
 21. Jouad H, Lacaille-Dubois MA, Lyoussi B, Eddouks M. Effects of the flavanoids extracted from *Spergularia purpurea* Pers. on arterial blood pressure and renal function in normal and hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001; 72(2): 159-163.