

**EFEK EKSTRAK ETANOL AKAR PASAK BUMI (*Eurycoma longifolia*, Jack)
TERHADAP EKSPRESI HRAS PADA ORGAN HATI TIKUS GALUR Sprague Dawley
PADA PEMBERIAN DOXORUBICIN**

**EFFECTS OF PASAK BUMI ROOTS(*Eurycoma longifolia*, Jack) EXTRACTS
ETHANOLON THE EXPRESSION OF HRAS IN HEART ORGANS OF GALUR MICE
Sprague Dawley ON GIVING DOXORUBICIN**

Noval^{1*}, Raihana²

¹Department of Pharmacy, Health Faculty, Sari Mulia University Banjarmasin

²Department of Pharmacy, Pharmacy Faculty, Ahmad Dahlan University Yogyakarta

e-mail: novalhalim10@gmail.com

ABSTRAK

Agan kemoterapi doxorubicin menimbulkan efek samping yang serius pada sel normal, terutama pada organ hati dan jantung yang disebabkan oleh radikal bebas. RAS merupakan komponen penting dari jalur transduksi sinyal yang mengontrol proliferasi sel, diferensiasi dan kelangsungan hidup. Akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia*, Jack) telah dilaporkan memiliki aktivitas sebagai antioksidan dan hepatoprotektor. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol akar pasak bumi terhadap ekspresi HRAS pada tikus sehat yang diberi doxorubicin.

Penelitian ini dilakukan dengan membagi hewan uji menjadi 7 kelompok yaitu Kelompok I kontrol doxorubicin 4,67 mg/kgBB, kelompok II kontrol ekstrak etanol akar pasak bumi 200 mg/kgBB, kelompok III, IV dan V adalah kelompok perlakuan yang diberikan doxorubicin 4,67 mg/kgBB dengan ekstrak etanol akar pasak bumi masing-masing 50 mg/kgBB; 100 mg/kgBB; 200 mg/kgBB, kelompok VI kontrol pelarut dan kelompok VII kontrol sehat. Penelitian dilanjutkan dengan melakukan pengecatan menggunakan metode imunohistokimia untuk melihat ekspresi HRAS pada tiap kelompok percobaan. Analisis data dilakukan dengan menghitung persen ekspresi, kemudian dilanjutkan dengan uji statistik menggunakan SPSS.

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol doxorubicin ($18,56 \pm 1,85$) dengan perlakuan kelompok 5 ($10,43 \pm 1,71$) dan tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok kontrol doxorubicin ($18,56 \pm 1,85$) dengan perlakuan kelompok 3 ($17,80 \pm 4,23$) dan perlakuan kelompok 4 ($16,70 \pm 1,97$).

Dari hasil penelitian diperoleh kesimpulan bahwa ekstrak etanol akar pasak bumi dengan dosis 200 mg/KgBB dapat menurunkan ekspresi HRAS pada pemberian doxorubicin.

Kata kunci: Doxorubicin, *Eurycoma longifolia* Jack, HRAS

ABSTRACT

Doxorubicin chemotherapy agents cause serious side effects in normal cells, especially in the liver and heart caused by free radicals. RAS is an important component of the signal transduction pathway that controls cell proliferation, differentiation and survival. The pasak bumi root (*Eurycoma longifolia*, Jack) has been reported to have activity as an antioxidant and hepatoprotector. This study aims to determine the effect of giving ethanol extract of pasak bumi root on HRAS expression in healthy mice given doxorubicin.

This research was conducted by dividing the test animals into 7 groups, namely doxorubicin control group 4.67 mg / kgBB, group II control ethanol extract of pasak bumi roots 200 mg / kgBB, group III, IV and V were the treatment groups given doxorubicin 4.67 mg / kgBW with ethanol extract of the pasak bumi root, each 50 mg / kgBB; 100 mg / kgBB; 200 mg / kgBW, group VI solvent control and group VII healthy control. The study was continued by painting using an immunohistochemical method to see the expression of HRAS in each experimental group. Data analysis was performed by calculating percent expressions, then proceed with statistical tests using SPSS.

The results of statistical tests showed that there were significant differences between the doxorubicin control group (18.56 ± 1.85) and the treatment of group 5 (10.43 ± 1.71) and there were no significant differences between the doxorubicin control group ($18.56 \pm 1, 85$) with group 3 treatment (17.80 ± 4.23) and group 4 treatment (16.70 ± 1.97).

From the results of the study concluded that the ethanol extract of pasak bumi roots at a dose of 200 mg / KgBB can reduce the expression of HRAS in the administration of doxorubicin.

Keywords: Doxorubicin, *Eurycoma longifolia* Jack, HRAS

PENDAHULUAN

Doxorubicin merupakan salah satu obat kemoterapi yang umum digunakan untuk menangani berbagai jenis kanker [1] seperti kanker payudara, ovarium, sarkoma, limfoma, dan leukemia akut [2], serta kanker hati [3]. Ada dua mekanisme yang diusulkan dimana doxorubicin bertindak pada sel kanker yaitu interkalasi ke dalam DNA dan penghambatan topoisomerase II dan generasi radikal bebas. Spesies oksigen reaktif dapat menyebabkan peroksidasi lipid dan kerusakan membran, kerusakan DNA, stres oksidatif, dan memicu jalur kematian sel (apoptosis) [4]. Doxorubicin dapat menginduksi apoptosis pada sel normal

dan sel kanker melalui mekanisme yang berbeda, yaitu melalui jalur p53 pada sel kanker dan H₂O₂ pada sel normal [5]. Protein RAS bertindak sebagai pengatur jalur sinyal yang memodulasi proliferasi sel, kelangsungan hidup, dan apoptosis. [6].

Doxorubicin dapat menyebabkan efek samping yang parah pada jaringan normal, seperti jantung, hati, dan ginjal. Kardiotoxicitas dan hepatotoxicitas terhadap doxorubicin disebabkan karena adanya radikal bebas [7]. Pemberian doxorubicin memicu hepatotoxicitas yang ditandai oleh perubahan patologis parah dan inflamasi [8]. Gambaran histopatologis pada hati menunjukkan bahwa doxorubicin memicu

hepatotoksisitas, ditandai dengan perubahan histopatologi organ hati seperti nekrosis, degenerasi hepatosit, dilatasi sinusoidal, hemoragi, dan dilatasi serta kongesti vaskular [9]. Perbedaan toksisitas doxorubicin pada sel kanker dan sel normal perlu diselidiki untuk meningkatkan efek antitumor doxorubicin melalui pendekatan kombinasi untuk melindungi sel-sel normal [10].

Tumbuhan telah lama kita ketahui merupakan sumber yang sangat penting dalam upaya mempertahankan kesehatan masyarakat [11]. Pasak bumi (*Eurycoma longifolia*, Jack) adalah salah satu tumbuhan pohon yang memiliki khasiat farmakologis yang meliputi semua bagian tumbuhannya mulai dari akar, batang, daun, bunga, dan buahnya. Tumbuhan ini banyak ditemukan di Indonesia, Malaysia, Filipina, Vietnam, dan Thailand [12]. Tumbuhan ini merupakan pohon kecil dengan ketinggian mencapai 20 m. Pasak bumi juga adalah salah satu jenis tumbuhan obat yang telah digunakan sebagai obat untuk detoksikasi, antioksidan radikal bebas, obat kuat, dan peningkat imunitas serta antikanker [13].

Senyawa kuasinoid yang terkandung dalam akar pasak bumi dimungkinkan dapat melindungi sel-sel hati dari radikal bebas dengan kemampuan menghambat peroksidasi lipid [14]. Pemberian antioksidan dapat menyebabkan aktivasi Akt [15].

Fosforilasi Akt mempromosikan HRAS [16]. Keluarga protein RAS berperan dalam pertahanan kelangsungan hidup sel. Oleh karena itu akar pasak bumi diduga dapat menurunkan toksisitas dari doxorubicin dengan menghambat pembentukan radikal bebas, sehingga apoptosis pada sel normal tidak terjadi.

Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol akar pasak bumi terhadap ekspresi HRAS pada tikus sehat yang diberi doxorubicin. Sehingga nantinya pasak bumi dapat dijadikan sebagai tambahan alternatif pada pasien yang diberikan doxorubicin untuk melindungi sel-sel hati dari radikal bebas, karena aktivitas antioksidan dari pasak bumi. Berdasarkan latar belakang tersebut, perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh pemberian akar pasak bumi terhadap ekspresi HRAS pada tikus sehat yang diberi doxorubicin.

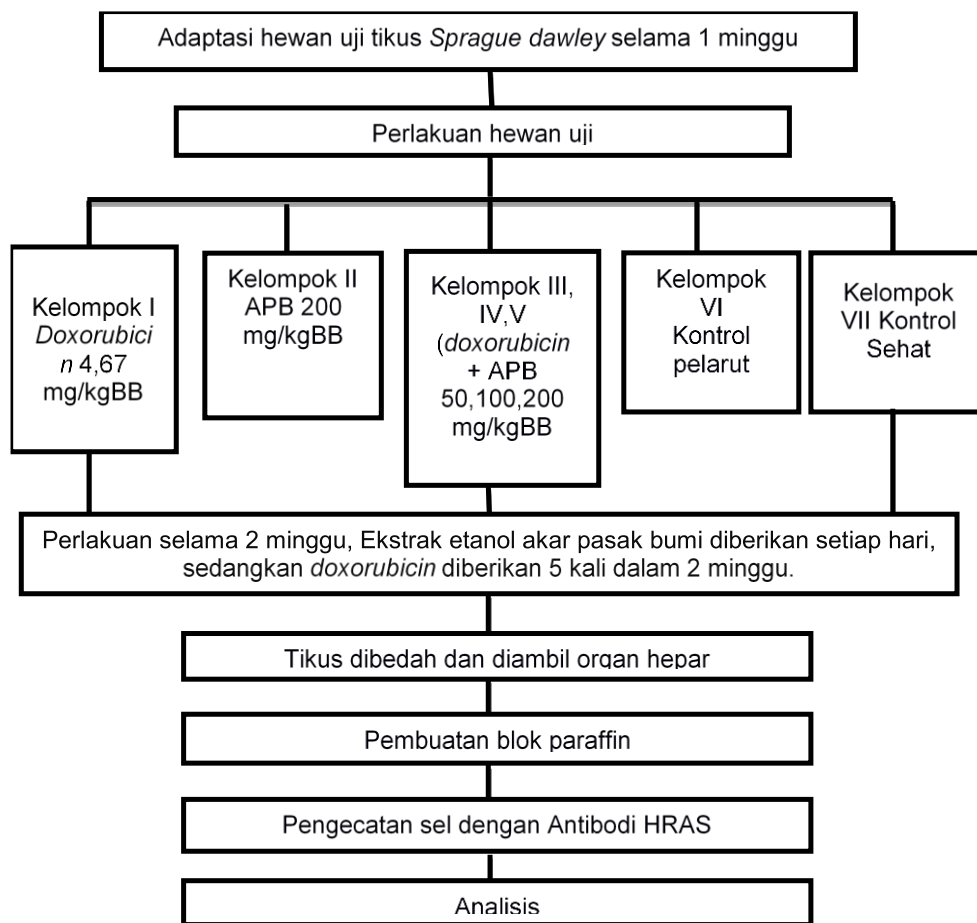
METODOLOGI

1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi, Universitas Sari Mulia Banjarmasin dalam waktu kurang lebih selama 3 bulan. Metodologi dari penelitian ini menggunakan metode eksperimental. Metode eksperimental yaitu suatu penelitian dengan melakukan kegiatan percobaan yang bertujuan untuk mengetahui gejala atau

pengaruh yang timbul, sebagai akibat dari tersebut[17].
adanya perlakuan tertentu atau eksperimen

Adapun rancangannya sebagai berikut,



2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah spuit per oral, spuit injeksi, corong Buchner, timbangan analitik, alat-alat bedah, meja operasi, pisau scalpel, mikroskop,

kamera, alat-alat gelas, sarung tangan, masker, toples maserasi, magnetic stirrer, kertas saring, penangas air, rotary evaporator, karet pengikat, pot tempat ekstrak, batang pengaduk, cawan porselen dan mikropipet 20;200;1000 µl, Sedangkan

bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk akar pasak bumi yang berasal dari Banjarmasin, Kalimantan Selatan, etanol 70 %, tikus Galur Sprague dawley, Aquadest, Doxorubicin, CMC-Na, formalin.

3. Cara Kerja

Pelaksanaan penelitian terdiri atas beberapa tahap, yaitu:

a. Ekstraksi serbuk akar pasak bumi

Serbuk akar pasak bumi sebanyak 1000 g diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol sebanyak 3L, kemudian diaduk dengan menggunakan magnetic stirrer selama tiga jam. Setelah itu, diamkan selama 24 jam yang bertujuan untuk mengoptimalkan maserasi dari akar pasak bumi, kemudian disaring menggunakan corong buchner yang telah dilapisi kertas saring. Filtrat yang diperoleh kemudian dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh maserat yang kental kemudian dimasukkan dalam cawan porselin lalu dipanaskan diatas penangas air hingga diperoleh ekstrak yang kental.

b. Perhitungan dosis dan pembuatan larutan uji

1) Dosis doxorubicin

Dosis yang digunakan pada penelitian ini adalah 4,67 mg/KgBB (Ikawati, 2010). Tikus dengan berat badan ± 200 gram, maka dosis

doxorubicin yang diperlukan adalah sebagai berikut:

Dosis <i>doxorubicin</i>	=
4,67 mg/KgBB	
Volume Obat	=
5ml (injeksi)	
Konsentrasi <i>doxorubicin</i>	=
50mg/5ml	
Berat rata-rata tikus	=
200 gram	
Perhitungannya menjadi	=
$VOA = \frac{4,67 \text{ mg} \times 0,2 \text{ kg}}{50 \text{ mg/ml}} = 0,095 \text{ ml}$	

Pemberian injeksi *doxorubicin* pada 1 ekor tikus dengan berat 200 gram adalah 0,095 ml. Jadi untuk membuat larutan injeksi *doxorubicin*, serbuk obat ditambah dengan WFI (*Water For Injection*) sebanyak 5ml dan diambil 0,095ml untuk tiap 200 gram tikus.

2) Dosis ekstrak akar pasak bumi

Dosis ekstrak etanol akar pasak bumi yang akan diberikan kepada tikus secara peroral adalah 50 mg/KgBB, 100 mg/kgBB dan 200 mg/kgBB dengan konsentrasi 20mg/ml. Misal, tikus dengan berat badan 200 gram, maka dosis ekstrak etanol akar pasak bumi yang diperlukan adalah

Dosis 50mg/kgBB →
$$VOA = \frac{50 \text{ mg} \times 0,2 \text{ kg}}{20 \text{ mg/ml}} = 0,5 \text{ ml}$$

Dosis 100 mg/kgBB →
$$VOA = \frac{100 \text{ mg} \times 0,2 \text{ kg}}{20 \text{ mg/ml}} = 1 \text{ ml}$$

Dosis 200 mg/kgBB →
$$VOA = \frac{200 \text{ mg} \times 0,2 \text{ kg}}{20 \text{ mg/ml}} = 2 \text{ ml}$$

Pemberian peroral pada 1 ekor tikus dengan dosis 50mg/kg BB, 100mg/kg BB dan 200mg/kg BB adalah 0,5 ml, 1 ml dan 2 ml. Ekstrak yang dibutuhkan per hari untuk setiap kelompok tikus adalah:

Kontrol akar pasak bumi
(200mg/kgBB) → 2,0ml x 7
tikus = 14 ml

Dosis 50 mg/kgBB
→ 0,5ml x 7 tikus = 3,5 ml

Dosis 100mg/kgBB
→ 1,0ml x 7 tikus = 7,0 ml

Dosis 200mg/kgBB
→ 2,0ml x 7 tikus = 14 ml

3) Persiapan hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam percobaan ini adalah tikus galur *Sprague Dawley* dengan bobot ± 200 gram yang berumur 3 minggu. Kondisi fisik hewan sehat dan tidak tampak cacat secara anatomi. Tikus dipelihara dalam kandang, tiap kandang berisi 7 ekor tikus, dan diberi makan serta

diberi minum secukupnya. Tikus diadaptasikan selama 7 hari, setelah itu diberi perlakuan.

Selama penelitian tikus ditimbang setiap harinya untuk mengetahui perkembangan berat badan. Empat puluh sembilan tikus umur 3 minggu secara acak dibagi menjadi 7 kelompok.

Pengelompokan Hewan Uji dan Uji Efek Ekstrak Etanol Akar Pasak Bumi Terhadap ekspresi HRAS Pada Tikus Galur SD. Empat puluh sembilan ekor tikus umur tiga minggu secara acak dibagi menjadi 7 kelompok. Kelompok tersebut diberi perlakuan sebagai berikut:

Kelompok 1 : Kelompok kontrol *doxorubicin*, hewan uji diberikan *doxorubicin* dengan dosis 4,67 mg/kgBB sebanyak 5 kali dalam 2 minggu.

Kelompok 2 : Kelompok kontrol ekstrak etanol akar pasak bumi, hewan uji diberikan ekstrak etanol akar pasak bumi dengan dosis 200 mg/kgBB secara per oral setiap hari selama 2 minggu.

Kelompok 3 : Kelompok perlakuan, hewan uji diberikan *doxorubicin* dosis 4,67 mg/kgBB secara i.m sebanyak 5 kali dalam 2 minggu, dengan penambahan ekstrak etanol akar pasak bumi dosis 50 mg/kgBB.

Kelompok 4 : Kelompok perlakuan, hewan uji diberikan *doxorubicin* dosis 4,67 mg/kgBB secara i.m sebanyak 5 kali dalam 2 minggu, dengan penambahan ekstrak etanol akar pasak bumi dosis 100 mg/kgBB.

Kelompok 5 : Kelompok perlakuan, hewan uji diberikan *doxorubicin* dosis 4,67 mg/kgBB secara i.m sebanyak 5 kali dalam 2 minggu, dengan penambahan ekstrak etanol akar pasak bumi dosis 200 mg/kgBB.

Kelompok 6 : Kelompok kontrol pelarut, hewan uji diberi CMC-Na 0,5 %.

Kelompok 7 : Kelompok kontrol sehat, hewan uji hanya diberi pakan dan minum saja.

4) Pengambilan organ hati hewan uji

Empat puluh sembilan ekor tikus galur *Sprague Dawley* yang telah diberi perlakuan selama dua minggu kemudian dibunuh dengan cara dikorbankan untuk dilakukan pembedahan dengan mengambil organ hati. Organ yang ambil tersebut kemudian dibersihkan dengan larutan NaCl fisiologis agar jaringan tersebut tidak mati kemudian dimasukan dalam pot untuk difiksasi dengan larutan formalin 10%.

5) Pembuatan preparat histopatologi

Organ hati yang telah difiksasi dibawa ke laboratorium patologi kedokteran hewan UGM. Pembuatan preparat diawali dengan *trimming* yaitu

pemotongan jaringan setebal 3-5 mm dan 1 x 1 cm menggunakan pisau skapel kemudian dimasukkan dalam *embedding cassette*. Selanjutnya yaitu dehidrasi yang bertujuan untuk menghilangkan air dari jaringan. Dehidrasi dilakukan dengan menggunakan etanol secara bertingkat. Larutan etanol yang digunakan berturut-turut adalah etanol 80 % sekali selama 2 jam, etanol 95% sebanyak 2 kali, masing-masing 2 jam dan etanol 100% sebanyak 3 kali masing-masing 1 jam. Kemudian *cleaning* menggunakan *xylene* sebanyak 3 kali yang bertujuan untuk membersihkan jaringan dari cairan dehidrasi. Setelah dilakukan *cleaning*, pembuatan dilanjutkan dengan *impregnasi* yaitu penggunaan reagen pembersih paraffin dengan cara penetrasi dalam jaringan dan dilakukan sebanyak 3 kali masing-masing 60 menit. Jaringan yang telah dimasukkan dalam *embedding cassette* dipindahkan ke dalam *base mold* dan diisi dengan paraffin cair. Setelah itu jaringan dipotong menggunakan pisau konvensional dan mikrotom sliding (*cutting*) dengan ketebalan 5-7 mikron. Hasil pemotongan selanjutnya direndam

dengan air hangat di atas *hot plate* selama 0,5 jam.

6) Uji imunohistokimia (IHC)

Langkah pertama deparafinasi preparat (blok parafin) dengan xylol sebanyak 2 kali masing-masing 5 menit. Rehidrasi preparat dengan menggunakan etanol 100%, etanol 95% dan etanol 70% sebanyak 2 kali masing-masing selama 5 menit dan terakhir dicuci dengan *buffer citrate*. Kemudian masing-masing preparat ditambahkan 300 µl metanol dingin dan diamkan selama 10 menit, kemudian cairan dibuang. Lalu cuci preparat dengan larutan PBS sebanyak 2 kali masing-masing 500µl selama 5 menit, larutan dibuang. Cuci preparat dengan aquades sebanyak 2 kali masing-masing 500µl selama 5 menit lalu buang larutan dan bersihkan.

Lakukan perendaman dalam *peroxidase blocking solution* (larutan H₂O₂ 1:9) masing-masing sebanyak 100µl selama 5-10 menit untuk menghilangkan aktivitas peroxidase endogen, kemudian buang larutan. Cuci dengan larutan PBS sebanyak 2 kali masing-masing 500µl selama 5 menit, buang larutan. Tambahkan *blocking serum* masing-masing 100µl

dan inkubasi pada suhu kamar (25°C) selama 10-15 menit, buang larutan. Tambahkan antibodi primer HRAS yang telah disiapkan ditambahkan sebanyak 30-50µl pada preparat (disesuaikan sampai semua bagian tergenang) kemudian diinkubasi pada suhu kamar (25°C). Preparat sampel diinkubasi dengan antibodi HRAS, selanjutnya dicuci dengan PBS (segar) masing-masing sebanyak 500µl selama 5 menit, buang larutan.

Ditambahkan antibodi sekunder (*Trakle Link*) masing-masing sebanyak 100µl dan inkubasi pada suhu kamar selama 20 menit. Cuci dengan larutan PBS segar masing-masing 500µl selama 5 menit. Kemudian jaringan pada preparat diberi label (*Trak Avidin-HRP*) masing-masing sebanyak 100µl dan diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Cuci selama 5 menit dengan larutan PBS sebanyak 2 kali dan masing-masing 500µl. Preparat diinkubasi dalam *peroxidase substratesolution* (DAB) 100 µl (1:50) per preparat selama 5 menit. Preparat dicuci dengan *aquades* masing-masing 2 kali sebanyak 500µl selama 5 menit, buang cairan.

Pada preparat tersebut ditambahkan Mayer *hematoxylin(counterstrain)* sebanyak 100µl selama 5 menit, kemudian dicuci dengan *aquades* sampai bersih dan dikeringkan. Preparat selanjutnya dicelupkan ke dalam alkohol 100%, dibersihkan dan dicelupkan ke dalam *xylol*. Preparat selanjutnya ditetesi dengan *mounting media* kemudian ditutup dengan *cover slip*. Setelah kering, preparat siap diperiksa di bawah mikroskop cahaya.

terdistribusi normal dan varian homogen maka dilanjutkan dengan uji Parametrik dengan menggunakan ANOVA satu jalur dan analisis dengan uji *Post Hoc*. Apabila data tersebut tidak memenuhi salah satu persyaratan analisis parametrik maka dapat dilanjutkan uji statistik Non Parametrik menggunakan uji *Kruskal Wallis* dan *Mann Whitney* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan persen ekspresi HRAS antar kelompok perlakuan.

7) Analisis hasil

Analisis hasil dilakukan dengan menghitung persen ekspresi dari HRAS. Persen ekspresi diperoleh dari perbandingan sel yang terekspresi dengan yang tidak terekspresi. Persen ekspresi diperoleh dengan rumus:

$$\% \text{ ekspresi} = \frac{\text{Jumlah sel yang mengekspresi antibodi}}{\text{Jumlah semua sel}} \times 100\%$$

Setelah diperoleh persen ekspresi dari tiap perlakuan dilanjutkan dengan analisis statistik. Analisis statistik dengan SPSS diawali dengan uji normalitas dengan uji *Kolmogorov Smirnov* untuk menentukan data tersebut terdistribusi normal atau tidak dan uji homogenitas dengan uji *Levene*. Jika data

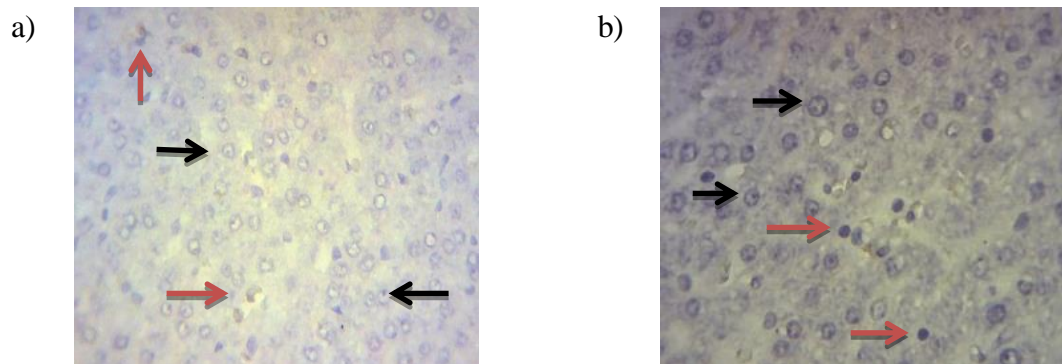
HASIL DAN PEMBAHASAN

Perlakuan dengan *doxorubicin* pada tikus sehat menunjukkan kehilangan massa tubuh, selain itu juga terlihat penurunan kelangsungan hidup lima hari setelah pemberian *doxorubicin* [18]. Penghambatan proliferasi sel normal juga terlihat pada penggunaan kemoterapi [19], penghambatan proliferasi dan penurunan kelangsungan hidup ini dapat dilihat dengan menurunnya ekspresi HRAS sebagai salah satu gen yang terlibat dalam pengaturan kelangsungan hidup sel setelah pemberian *doxorubicin*. Secara empiris akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia*, Jack) dapat berpotensi sebagai antioksidan radikal bebas, peningkat imunitas serta antikanker [20]. Pemberian antioksidan dapat menyebabkan aktivasi

Akt dan telah menunjukkan peningkatan aktivitas Akt sehingga dapat meningkatkan kelangsungan hidup sel dengan menghambat apoptosis melalui inaktivasi *caspase-9* dan *caspase-3* [15]. Fosforilasi Akt mempromosikan HRAS [16]. Protein HRAS menghambat aktivasi nuklease yang memicu apoptosis dan mengarah langsung ke penurunan yang signifikan dalam kematian sel [21]. Ekspresi HRAS diharapkan meningkat dengan adanya ekstrak etanol akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia*, Jack). Peningkatan ekspresi HRAS menunjukkan semakin meningkatnya kemampuan sel untuk mempertahankan kelangsungan hidup dan mencegah terjadinya apoptosis pada sel

normal pada tikus sehat yang diberikan *doxorubicin*.

Ekspresi HRAS diamati setelah pemberian ekstrak etanol akar pasak bumi dan *doxorubicin* menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x yang dilengkapi optilab. Pengamatan terhadap ekspresi HRAS dilakukan pada empat bidang pandang. Persen ekspresi dihitung dari jumlah sel yang terekspresi per jumlah sel seluruhnya dikali dengan 100%. Hasil pengamatan ekspresi HRAS pada jaringan hepar setelah diberi perlakuan dengan *doxorubicin* dan ekstrak etanol akar pasak bumi dapat dilihat pada Gambar 2.



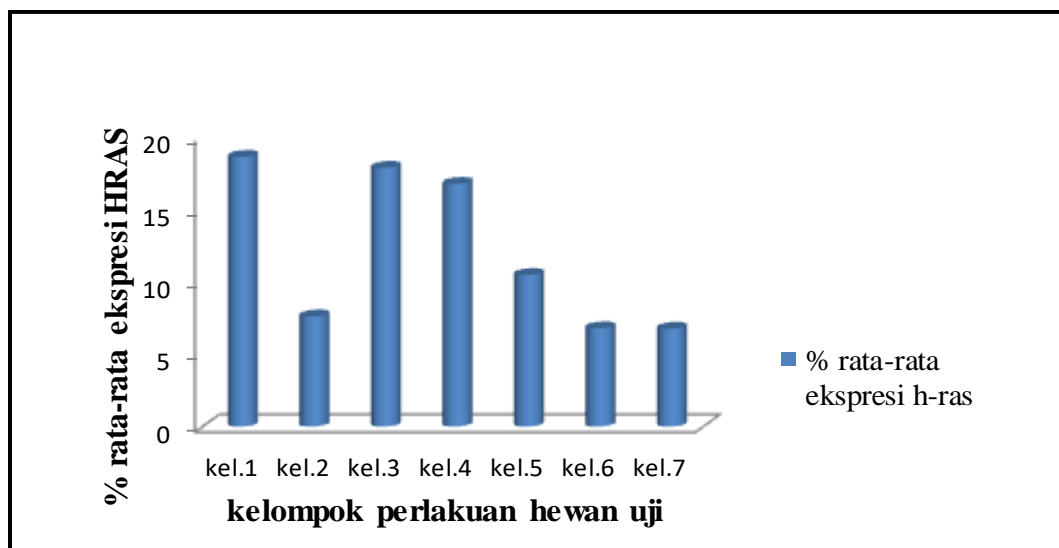
Gambar 2. Kel.1 kontrol *doxorubicin* 4,67 mg/KgBB (a). Kel.5 perlakuan *doxorubicin* 4,67 mg/KgBB + eks. APB 200 mg/KgBB (b). Panah merah menunjukkan HRAS yang terekspresi, sedangkan panah hitam menunjukkan HRAS yang tidak terekspresi.

Gambar tersebut menunjukkan penurunan ekspresi HRAS pada perlakuan *doxorubicin* 4,67 mg/KgBB + eks. Akar pasak bumi dosis 200 mg/KgBB dibandingkan dengan kelompok *doxorubicin*. Persen rata-rata ekspresi

HRAS dari tiap kelompok percobaan efek ekstrak etanol akar pasak bumi terhadap ekspresi HRAS pada pemberian *doxorubicin* dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 3.

Tabel 1. Persen rata-rata ekspresi HRAS dari tiap kelompok percobaan hewan uji pada percobaan efek ekstrak etanol akar pasak bumi terhadap ekspresi HRAS pada pemberian doxorubicin

Kelompok	Rata-rata ekspresi HRAS ± SD (%)
Kel.1 : Kelompok <i>doxorubicin</i> 4,67mg/KgBB	18,56 ± 1,85
Kel.2 : Kelompok ekstrak APB 200 mg/KgBB	7,58 ± 3,06
Kel.3 : Perlakuan <i>doxorubicin</i> 4,67 mg/KgBB + ekst. APB 50 mg/KgBB	17,80 ± 4,23
Kel.4 : Perlakuan <i>doxorubicin</i> 4,67 mg/KgBB + ekst. APB 100 mg/KgBB	16,70 ± 1,97
Kel.5 : Perlakuan <i>doxorubicin</i> 4,67 mg/KgBB + ekst. APB 200 mg/KgBB	10,43 ± 1,71
Kel.6 : Kontrol pelarut CMC –Na	6,76 ± 2,00
Kel.7 : Kontrol sehat	6,73 ± 1,52



Gambar 3. Diagram batang rata-rata ekspresi HRAS (%) pada tiap kelompok percobaan hewan uji pada percobaan efek ekstrak etanol akar pasak bumi terhadap ekspresi HRAS pada pemberian *doxorubicin*.

Analisis data dilakukan dengan uji statistik dari persen ekspresi yang diperoleh dari masing-masing perlakuan. Pertama kali yang dilakukan adalah menguji normalitas dan homogenitas data dengan taraf kepercayaan 95%. Untuk uji normalitas

digunakan *Kolmogorof-Smirnov*, sedangkan untuk uji homogenitas digunakan metode *Lavene*. Tujuan dari dua uji tersebut adalah untuk mengetahui apakah data yang diperoleh terdistribusi normal atau tidak dan untuk mengetahui apakah data tersebut homogen atau tidak. Apabila data-data tersebut terdistribusi normal dan homogen langkah selanjutnya dianalisis dengan menggunakan metode statistika parametrik dengan menggunakan uji ANOVA. Apabila data tersebut tidak terdistribusi secara normal atau tidak homogen langkah berikutnya adalah data dianalisis dengan menggunakan metode statistik non parametrik dengan uji *Kruskal-Walis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* dengan taraf kepercayaan 95%.

Hasil uji normalitas dengan menggunakan metode *Kolmogorof-Smirnov* diperoleh *asympt.Sig* 0,16 ($p > 0,05$) yang berarti data tersebut terdistribusi secara normal. Untuk uji homogenitas yang menggunakan uji *Lavene* diperoleh nilai *asympt.Sig* 0,00 ($p < 0,05$) yang berarti data tidak homogen. Dengan demikian data tersebut termasuk data non parametrik yang selanjutnya diuji dengan metode *Kruskal-Walis* untuk melihat apakah ada perbedaan antar kelompok dalam percobaan atau tidak. Hasil dari uji ini diperoleh *asympt.Sig* sebesar 0,00 ($p < 0,05$) yang menyatakan bahwa terdapat perbedaan antar kelompok dalam percobaan. Kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk melihat dimana letak perbedaannya. Hasil uji SPSS tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Tabel Ringkasan hasil analisis uji SPSS dengan taraf kepercayaan 95% dari tiap kelompok percobaan efek ekstrak etanol akar pasak bumi terhadap ekspresi HRAS pada pemberian doxorubicin

kelompok	2	3	4	5	6	7
1	S	TS	TS	S	S	S
2		S	S	S	TS	TS
3			TS	S	S	S
4				S	S	S
5					S	S
6						TS

Ket :
 S : Berbeda signifikan
 TS : Tidak berbeda signifikan

Dari data pada Gambar 3 dan Tabel 2 terlihat bahwa ekspresi HRAS pada kelompok *doxorubicin* mengalami peningkatan

dibandingkan dengan kelompok kontrol sehat dan ekstrak etanol akar pasak bumi dapat menurunkan ekspresi HRAS jika dibandingkan dengan kelompok kontrol *doxorubicin*. Hasil ini tidak sesuai dengan yang diperkirakan. Pada kelompok kontrol *doxorubicin* terlihat ekspresi HRAS yang meningkat, peningkatan ekspresi HRAS ini diduga karena keterlibatan radikal bebas yang dihasilkan oleh *doxorubicin*. ROS bertindak sebagai *second messenger* dan dapat mempengaruhi berbagai proses seluler termasuk tanggapan faktor pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel. Hidrogen peroksida (H_2O_2) baru-baru ini telah ditunjukkan untuk mempromosikan kelangsungan hidup sel. Aktivasi RAS diatur oleh produksi superoksida dan hidrogen peroksida [16]. Hidrogen peroksida, terlibat dalam aktivasi membran reseptor kinase [22]. Peningkatan HRAS ini menggambarkan pertahanan hidup sel sebagai respon terhadap stress yang disebabkan oleh pemberian *doxorubicin* pada tikus sehat.

Selanjutnya kelompok kontrol *doxorubicin* dibandingkan dengan kelompok perlakuan ekstrak etanol akar pasak bumi dosis 200mg/KgBB juga menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan atau berbeda bermakna. Data persen ekspresi menunjukkan ekspresi HRAS pada kelompok perlakuan dengan dosis 200mg/KgBB lebih kecil dibandingkan dengan kontrol *doxorubicin*

sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol akar pasak bumi dengan dosis 200 mg/kgBB dapat menurunkan ekspresi HRAS pada pemberian *doxorubicin* pada tikus sehat. Kelompok perlakuan dengan dosis 50 mg/KgBB dan 100mg/KgBB dibandingkan dengan kelompok kontrol *doxorubicin* tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. Hal ini menggambarkan bahwa ekstrak etanol akar pasak bumi dengan dosis 50mg/KgBB dan 100mg/KgBB belum mampu meningkatkan ekspresi HRAS secara signifikan. Begitu juga pada kelompok kontrol pelarut dan kelompok kontrol sehat juga tidak menunjukkan perbedaan bermakna, hal ini menggambarkan bahwa pelarut yang digunakan yaitu CMC-Na tidak mempengaruhi sel dan tidak mempengaruhi efek ekstrak etanol akar pasak bumi. Kelompok yang diberikan ekstrak etanol akar pasak bumi saja dengan dosis 200 mg/kgBB menunjukkan ekspresi yang tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol pelarut dan kelompok kontrol sehat. Hal ini menggambarkan bahwa pemberian ekstrak etanol akar pasak bumi pada tikus dalam keadaan sehat tidak begitu berpengaruh pada sel normal. Dalam percobaan ini ekstrak etanol akar pasak bumi berefek menurunkan ekspresi HRAS pada dosis 200 mg/kgBB hanya pada tikus sehat yang diberi *doxorubicin*, yaitu karena terjadinya suatu stress terhadap sel,

sedangkan pada sel normal sendiri tidak berpengaruh.

Dengan penurunan ekspresi HRAS ini, dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol akar pasak bumi dengan dosis 200 mg/kgbb belum mampu meningkatkan kelangsungan hidup sel normal dengan mengurangi efek apoptosis dari *doxorubicin* terhadap sel normal. Tetapi bahkan semakin memacu terjadinya apoptosis pada sel-sel normal. Peningkatan apoptosis ini selain dilihat dari penurunan ekspresi HRAS, juga didukung dari peningkatan ekspresi *caspase-3* [23] dan *caspase-9* [24] pada pemberian bersama *doxorubicin* dengan akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia*, Jack), menunjukkan bahwa ekstrak etanol akar pasak bumi dengan dosis 200 mg/kgBB semakin meningkatkan terjadinya apoptosis (kematian sel) pada sel normal yang diberikan *doxorubicin*. Hal ini dapat dimungkinkan karena adanya beberapa senyawa yang terkandung di dalam ekstrak tersebut dan salah satunya adalah senyawa alkaloid yang bersifat toksik sehingga menghambat kerja enzim yang terlibat dalam metabolisme lipid intraseluler dan mengakibatkan kematian sel (apoptosis) [25]. Selain itu juga adanya senyawa kuasinoid yaitu eurikomanon yang terkandung di dalam ekstrak etanol akar pasak bumi yang telah diketahui memacu terjadinya apoptosis pada sel kanker (26) dimungkinkan

juga dapat memacu terjadinya apoptosis pada sel normal.

Dengan demikian, dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol akar pasak bumi pada dosis 200 mg/kgbb belum mampu untuk meningkatkan kelangsungan hidup sel dengan mengurangi apoptosis pada sel normal pada penggunaan *doxorubicin*, karena ternyata ekspresi HRAS pada kombinasi *doxorubicin* dengan ekstrak etanol akar pasak bumi dengan dosis 200 mg/kgBB semakin menurun saat diberikan pada tikus sehat. Penghambatan aktivitas RAS telah ditunjukkan untuk mengaktifkan respon apoptosis. Ekstrak etanol akar pasak bumi dosis 200 mg/kgBB semakin meningkatkan terjadinya apoptosis pada sel normal dengan parameter penurunan ekspresi HRAS dan peningkatan ekspresi *caspase-3* [23] dan *caspase-9* (24) pada sel normal yang diberi *doxorubicin*.

KESIMPULAN

Ekstrak etanol akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia*, Jack) pada dosis 200 mg/kgBB dapat menurunkan ekspresi HRAS pada tikus sehat yang diberi perlakuan *doxorubicin*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Lewis, R., 2003, *Human Genetics: Concepts and Application*, McGraw-Hill, New York.
2. Jackson, T. L., 2003, Intracellular Accumulation and Mechanism of Action of Doxorubicin in a Spatio-temporal Tumor Model, *J. theor. Biol.*, 220: 201–213.
3. Yuan, J., Chao, Y., Lee, W.P., Li, C.P., Lee, R.C., Chang, F.Y., Yen, S.H., Lee, S.D., and Whang-Peng, J., 2008, Chemotherapy with etoposide, doxorubicin, cisplatin, 5-fluorouracil, and leucovorin for patients with advanced hepatocellular carcinoma, *Med Oncol*, 25: 201-6.
4. Caroline, F., Thorna., Connie, O., Sharon, M., Tina, H., Howard, Mc.L., Teri, E., Kleina., and Russ, B.A., 2011, Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects, *Pharmacogenet Genomics*, 21(7): 440-446.
5. Wang, S., Konorev, E. A., Kotamraju, S., Joseph, J., Kalivendi, S., and Kalyanaraman, B., 2004, Doxorubicin Induces Apoptosis in Normal and Tumor Cells via Distinctly Different Mechanisms, *Journal of Biological Chemistry*, 279 : 24-43
6. Barbier, J., Martin, D., Danielle, B., Gabriel, S., Lise, G., Pierre, de la Grange., and Didier, A., 2007, Regulation of H-ras Splice Variant Expression by Cross Talk between the p53 and Nonsense-Mediated mRNA Decay Pathways, *Molecular And Cellular Biology*, Vol. 27, No. 20: 7315–7333.
7. Wang, G., Zhang, J., Liu, L., Sharma, S., and Dong, Q., 2012, Quercetin Potentiates Doxorubicin Mediated Antitumor Effects against Liver Cancer through p53/Bcl-xl, *PloS ONE* 7(12): e51764. doi:10.1371/journal.pone.0051764.
8. Putri, H., Standie, Nagadi., Yonika, A. L., Nindi, W., dan Adam, H., 2013, Cardioprotective and hepatoprotective effects of Citrus hystrix peels extract on rats model, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(5): 371-375.
9. Yagmurca, M., and O, Bas., 2007, Protective effects of erdosteine on doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats, *Archives of medical research* 38(4): 380-385.
10. Wang, G., Zhang, J., Liu, L., Sharma, S., and Dong, Q., 2012, Quercetin Potentiates Doxorubicin Mediated Antitumor Effects against Liver Cancer through p53/Bcl-xl, *PloS ONE* 7(12): e51764. doi:10.1371/journal.pone.0051764.
11. Lisdawati., Vivi., 2007, Isolasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Lignan dan Asam Lemak dari Ekstrak Daging Buah Phaleria Macrocarp, *Bul. Penel. Kesehatan*, 35, 3: 115 – 124.

12. L.A.M. Siregar, C.L. Keng, B.P. Lim, J. Plant Biotechnol. 2. 2003. 131.
13. Ang, H., and K. Lee., 2002, Effect of *Eurycoma longifolia* on libido in middle-aged male rats, *Abstract Journal of Basic Clinical Physiology Pharmacology*, 13(3): 249-254.
14. Panjaitan, R.G.P., Wasmen, M., Ekowati, H., and Chalrul., 2011, Pengaruh pemberian akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack.) pada fungsi hepar. *Majalah Farmasi Indonesia*, 22(1)15-20 2011. Fakultas Farmasi UGM.
15. Volkova, M., and Raymond, R., 2011, Anthracycline Cardiotoxicity: Prevalence, Pathogenesis and Treatment, *Current Cardiology Reviews*, 7: 214-220.
16. Hole, P.S., Pearn, L., Tonks, A.J., James, P.E., Burnett, A.K., Darley, R.L., and Tonks, A., 2010, Ras-induced reactive oxygen species promote growth factor-independent proliferation in human CD34+ hematopoietic progenitor cells, *Blood*, 115(6): 1238-46.
17. Notoatmodjo. 2012. Promosi Kesehatan dan Perilaku Kesehatan. Jakarta
18. Yang, J., Maity, B., Huang, J., Gao, Z., Stewart, A., Weiss, R.M., Anderson, M.E., and Fisher, R.A., 2013, G-protein inactivator RGS6 mediates myocardial cell apoptosis and cardiomyopathy caused by doxorubicin, *Cancer Res*.
19. King, R. J. B., 2000, *Cancer Biology*, 2nd ed, Pearson Education Limited, London.
20. Ang, H., Y. Hitotsuyanagi, Fukaya, H., and Takeya, K., 2002, Quassinoids from *Eurycoma longifolia*. *Phytochemistry*, 59(8): 833-837.
21. Overmeyer, J.H., and Maltese, W.A., 2011, Death pathways triggered by activated Ras in cancer cells, *Front Biosci*, 16: 1693-1713.
22. Droge, W., 2002, The plasma redox state and ageing, *Division of Immunochemistry, German Cancer Research Center (DKFZ)*, Volume 1(Issue 2): Pages 257-278.
23. Emelda., 2013, Efek Ekstrak Etanol Akar Pasak Bumi (*E.longifolia* Jack.) Terhadap Ekspresi Caspase 3 pada Organ Hati Tikus Galur SD yang Diberikan *Doxorubicin*, *skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.
24. Ningrum, E.C., 2013, Efek Ekstrak Etanol Akar Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*, Jack) Terhadap Ekspresi Caspase-9 Pada Organ Hati Tikus Galur *Sprague Dawley* Yang Diberi Perlakuan *Doxorubicin*, *Skripsi*, Fakultas Farmasi universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.
25. Agungpriyono, D.R., Esti, R., dan Praptiwi, 2008, Uji Toksikopatologi Hati dan Ginjal Mencit pada Pemberian Ekstrak Pauh Kijang (*Irvingia Malayana Oliv ex A. Benn*),

Majalah Farmasi Indonesia, 19(4): 172-177.

26. Nurkhasanah and Azimahtol, H. L. P., 2007, Apoptotic cell death induced by eurycomacone (*Eurycoma longifolia* Jack) on human cervical carcinoma cells (HeLa), *Proceeding of international conference on chemical sciences (ICCS) 2007*, Yogyakarta, Indonesia.