

Analisis 4-Hidroksisiklofosfamid dan Asam 3- Hidroksipropil Merkapturat setelah Pemberian Ekstrak Biji Petai Cina pada Tikus Sistitis Hemoragik Terinduksi Siklofosfamid = Analysis of 4-Hydroxycyclophosphamide and 3- Hydroxypropyl Mercapturic Acid after Administration of Leucaena leucocephala (Lam.) de Wit Seed Extract on Cyclophosphamide-Induced Hemorrhagic Cystitis Rats

Sri Wardatun, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=9999920553445&lokasi=lokal>

Abstrak

Siklofosfamid merupakan obat kemoterapi yang secara luas digunakan dalam penanganan berbagai jenis kanker. Sistitis hemoragik pada kandung kemih merupakan salah satu efek samping yang sering muncul dari penggunaan siklofosfamid. Akrolein sebagai metabolit siklofosfamid teridentifikasi sebagai penyebab sistitis hemoragik. Akrolein dalam tubuh akan mengalami metabolisme melalui konjugasi dengan glutathion menghasilkan asam 3-hidroksipropil merkapturat (3-HPMA) yang diekskresikan melalui urin. Senyawa sulfidril diantaranya Mesna dan N-asetilsistein digunakan untuk mencegah terjadinya sistitis hemoragik. Biji petal cina mengandung senyawa sulfidril dan berpotensi digunakan sebagai alternatif untuk mencegah terjadinya sistitis hemoragik melalui induksi produksi dan metabolisme glutathion. Penelitian ini bertujuan untuk menilai potensi ekstrak biji petal cina dalam mencegah terjadinya sistitis hemoragik pada tikus terinduksi siklofosfamid dengan menganalisis senyawa 3-HPMA dalam urin dan 4-hidroksisiklofosfamid dalam plasma pada tikus. Optimasi ekstraksi biji petal cina dilakukan terhadap perendaman dengan akuades dan maserasi menggunakan pelarut etanol 30, 50, 70 dan 96%. Ekstrak hasil optimasi distandarisasi lalu digunakan untuk uji secara in vivo. Sebanyak 30 ekor tikus yang terbagi dalam 3 kelompok digunakan dalam uji ini. Kelompok pertama merupakan kelompok kontrol negatif yang diberikan akuades selama satu minggu. Kelompok kedua diberikan akuades selama satu minggu dan pada hari ketujuh diberikan injeksi siklofosfamid secara intraperitoneal dengan dosis 50 mg/kg. Kelompok ketiga diberikan ekstrak biji petal cina melalui per oral sekali sehari dengan dosis 300 mg/kg selama satu minggu, lalu pada hari ketujuh satu jam setelah pemberian ekstrak terakhir diinjeksi siklofosfamid dengan dosis 50 mg/kg. Darah diambil dari vena ekor tikus pada menit ke 30 dan ke 60 setelah pemberian injeksi siklofosfamid sedangkan urin dikumpulkan selama 24 jam. Analisis 3-HPMA dan 4-hidroksisiklofosfamid dilakukan dengan kromatografi cair kinerja ultra tinggi tandem spektrometri massa (KCKUT-SM/SM). Analisis 3-HPMA menggunakan internal standar 3-HPMA-D3 (asam 3-hidroksipropil merkapturat-Deuterium), dengan fase gerak = 0,1% asam format dalam air:0,1% asam format dalam asetonitril = 90:10 kolom KCKUT BEH C18 (2,1 x 100mm, 1,7µm), laju alir 0,2 mL/menit; waktu analisis 7 menit; deteksi MS pada m/z 221,968>90,993 untuk 3-HPMA dan 225,032>17 untuk 3-HPMA-D3. Analisis 4-hidroksisiklofosfamid menggunakan internal standar heksametilfosforamid dengan fase gerak = 0,1% asam format dalam metanol =50:50; kolom KCKUT BEH C18 (2,1 x 100mm, 1,7µm), laju alir 0,3 mL/menit; waktu analisis 7 menit; deteksi MS pada m/z 333,65>221,01 untuk 4- hidroksisiklofosfamid dan 180,07>134,9 untuk heksametilfosforamid. Hasil penelitian menunjukkan bahwa etanol 70% merupakan pelarut yang menghasilkan ekstrak dengan kadar sulfidril tertinggi dan kadar mimosin terendah pada biji petal cina yang telah direndam selama 24 jam. Ekstrak etanol 70% biji petal cina memenuhi standar mutu ekstrak obat tradisional. Metode analisis 3-

HPMA dalam urin dan 4- hidroksisiklofosfamid dalam plasma menggunakan KCKUT SM/SM telah tervalidasi sesuai acuan FDA, 2018 dan EMA, 2011 dan dapat diterapkan dalam analisis in vivo. Pemberian ekstrak etanol 70% biji petal cina dapat meningkatkan kadar 3-HPMA dalam urin dan tidak mempengaruhi kadar metabolit aktif 4-hidroksisiklofosfamid dalam plasma. Pemberian ekstrak biji petal cina memberikan pengaruh positif pada hasil uji histopatologi kandung kemih dan pada profil hematologi tikus. Ekstrak biji petal cina berpotensi untuk digunakan sebagai alternatif dalam mencegah terjadinya sistitis hemoragik pada penggunaan siklofosfamid.

.....

Cyclophosphamide is a chemotherapy drug that is widely used in the treatment of various types of cancer. Hemorrhagic cystitis in bladder is one of side effects that often arise from using of cyclophosphamide. Acrolein as metabolite of cyclophosphamide was identified causing hemorrhagic cystitis. Acrolein in the body undergoes metabolism through conjugation with glutathione to produce 3-hydroxypropyl mercapturic acid (3- HPMA), which is excreted in urine. Sulfhydryl compounds including Mesna and Nacetylcysteine are used to prevent hemorrhagic cystitis. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit seeds contain sulfhydryl compounds and have the potential to be used as an alternative to avoid the occurrence of hemorrhagic cystitis through production and metabolism of glutathione. This study aims to evaluate potential of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit seeds extract on cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis rats through analyze 3-HPMA in urine and 4-hydroxycyclophosphamide in plasma. The seed extraction was optimized with distilled water soaking treatments and maceration using 30, 50, 70 and 96% ethanol solvent. The optimized extract was standardized and then used for in vivo test. Thirty rats which is divided in 3 groups were used in this study. The first group, a negative control group, was given distilled water for one week. The second group was given distilled water for one week, and on the seventh day, they were given an intraperitoneal injection of cyclophosphamide at a dose of 50 mg/kg. The third group was given seed extract orally once a day at a dose of 300 mg/kg for one week, and then on the seventh day, one hour after administration of the last extract, they were injected with cyclophosphamide at a dose of 50 mg/kg. Blood was taken from rat vein tail 30 and 60 min after administration of the cyclophosphamide injection. Rat urine was collected for 24 h. Analysis of 3-HPMA and 4- hydroxycyclophosphamide was carried out by LCMS/MS. 3-HPMA analysis was conducted using the internal standard 3-hydroxypropyl mercapturic acid-Deuterium (3- HPMA-D3) with the mobile phase = 0.1% formic acid in water: 0.1% formic acid in acetonitrile = 90:10; column UPLC BEH Cis (2.1 x 100mm, 1.7µm); flow rate 0.2 mL/min; analysis time 7 minutes; and MS detection at m/z 221.968> 90.993 for 3- HPMA and 225.032>17 for 3-HPMA-D3. Analysis of 4-hydroxycyclophosphamide was conducted using internal standard hexamethylphosphoramide with a mobile phase = 0.1% formic acid in water: methanol = 50:50; column UPLC BEH Ci8 (2.1 x 100mm, 1.7µm); flow rate 0.3 mL/min; analysis time 7 minutes; and MS detection at m/z was 333.65>221.01 for 4-hydroxycyclophosphamide and 180.07>134.9 for hexamethylphosphoramide. The results show that 70% ethanol produced extracts with the highest sulfhydryl content and the lowest mimosine content in soaked *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit seeds. The 70% ethanol extract of seeds was made of qualified traditional medicinal extracts. The analysis method of 3-HPMA in urine and 4- hydroxycyclophosphamide in plasma using LCMS/MS has been validated according to 2018 FDA guidelines and 2011 EMA guidelines and can be applied to in vivo analysis. Administration of 70% ethanol extract of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit seeds can increase the level of 3-HPMA in urine and does not affect the level of the active metabolite 4-hydroxycyclophosphamide in plasma. Administration of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit

seeds extract had a positive effect on the results of bladder histopathology and hematological profiles. The *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit seed extract has the potential to be used as an alternative to avoid the occurrence of hemorrhagic cystitis in the use of cyclophosphamide.