

**Efek Ekstrak Methanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Ekspresi IGF-1 pada Jaringan Hepar Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Model Hepatocarcinoma yang Diinduksi 7,12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum**



Oleh :

**Andreas N. Moekoe**

**0910710032**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2012**

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

Efek Ekstrak Methanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Ekspresi IGF-1 pada Jaringan Hepar Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Model Hepatocarcinoma yang Diinduksi 7,12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)

Oleh :

Andreas N.Moekoe

NIM: 0910710032

Telah diuji pada

Hari : Senin

Tanggal : 8 Oktober 2012

Dan dinyatakan lulus oleh:  
Penguji I

Dr. rer. nat. Tri Yudani Mardining Raras, MApp., Sc.  
NIP. 19651105 199303 2 001

Penguji II/Pembimbing I

Penguji III/Pembimbing II

Prof.Dr.dr. M. Rasjad Indra, Ms  
NIP. 19500525 198002 1 001

dr. Hidayat Sujuti, Ph.D, Sp.M  
NIP.19670123 19960 1 1001

Mengetahui,  
Ketua Program Studi

Prof.Dr.dr. Teguh Wahyu Sardjono,DTM&H.,M.SC.,Sp.Par.K  
NIP. 19520410 198002 1 001

## KATA PENGANTAR

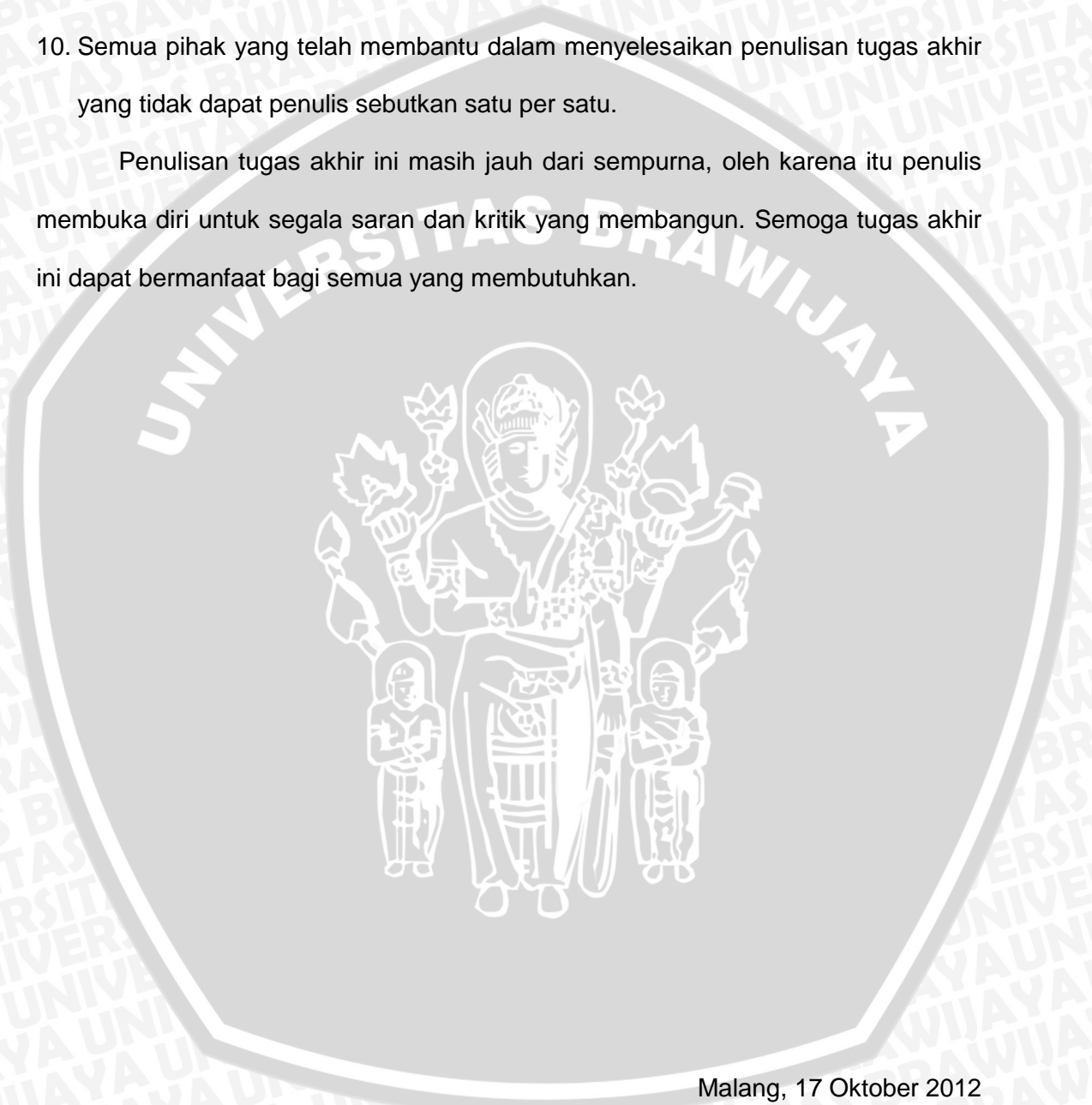
Puji dan syukur penulis nyatakan kepada Tuhan Yesus Kristus yang telah memberikan hikmat dan kemampuan, sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul “Efek Ekstrak Methanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Ekspresi IGF-1 pada Jaringan Hepar Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Model Hepatocarcinoma yang Diinduksi 7,12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)”. Penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada :

1. Dr. dr. Karyono Mintaroem, SpPA. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS. sebagai pembimbing pertama atas kesabaran dan bimbingannya kepada penulis dalam penulisan tugas akhir.
3. dr. Hidayat Sujuti, Ph.D, SpM. sebagai dosen pembimbing kedua atas ketelitian dan bimbingannya kepada penulis dalam penulisan tugas akhir.
4. Dr. rer. nat. Tri Yudani Mardining Raras, Mapp., Sc. sebagai dosen penguji yang telah memberikan waktu dan saran untuk mengoreksi penyelesaian tugas akhir.
5. Seluruh anggota Tim Tugas Akhir FKUB yang telah membantu penyelesaian tugas akhir.
6. Orang tua, keluarga, dan Gembala Sidang GPTKK yang telah memberi dukungan pada penulis dalam penulisan tugas akhir ini dari awal sampai akhir.
7. Staf laboratorium fisiologi, farmakologi, dan patologi anatomi FKUB yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan tugas akhir.
8. Teman-teman satu kelompok payung tugas akhir untuk kebersamaan dan semangat dalam pengerjaan tugas akhir ini.

9. Eileen Erica M atas pengertian dan dukungannya dalam penyelesaian tugas akhir.

10. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan penulisan tugas akhir yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Penulisan tugas akhir ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun. Semoga tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi semua yang membutuhkan.



Malang, 17 Oktober 2012

Penulis



## ABSTRAK

Moekoe, Andreas N. 2012. *Efek Ekstrak Methanol Daun Kelor (Moringa oleifera) terhadap Ekspresi IGF-1 pada Jaringan Hepar Tikus Wistar (Rattus norvegicus) Model Hepatocarcinoma yang Diinduksi 7,12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)*. Tugas Akhir, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS. (2) dr. Hidayat Sujuti, Ph.D, SpM.

Insiden *hepatocellular Carcinoma* (HCC) semakin meningkat di dunia, termasuk di Indonesia. Satu-satunya terapi definitifnya adalah dengan modalitas bedah dan belum memberikan hasil yang cukup memuaskan. Salah satu faktor resiko adalah karsinogen kronis, termasuk *7,12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)* yang sifat karsinogeniknya berkaitan dengan jalur *Insulin Growth Factor-1(IGF-1)*. Daun kelor (*Moringa oleifera*) memiliki kandungan quercetin sebagai antioksidan kuat yang diharapkan dapat menekan sifat karsinogenik sel hepar yang diinduksi DMBA. Tujuan penelitian ini adalah membuktikan bahwa ekstrak methanol daun kelor menurunkan ekspresi IGF-1 jaringan hepar tikus yang diinduksi DMBA. Pada penelitian ini digunakan metode penelitian *experimental* dengan 5 kelompok tikus masing-masing terdiri dari 6 ekor tikus strain wistar (*Rattus norvegicus*). Selama 45 hari pertama setiap kelompok kecuali kontrol negatif diberi DMBA 10 mg/ml/hari. Setelah itu, selama 60 hari kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 diberi ekstrak methanol daun kelor dengan dosis 20, 40, 80 mg/ml/hari. Pengamatan ekspresi IGF-1 jaringan hepar dilakukan dengan metode imunohistokimia. Analisis data dengan ANOVA menunjukkan pemberian ekstrak methanol daun kelor dapat menurunkan ekspresi IGF-1 secara signifikan ( $p < 0,05$ ) dan mendekati normal pada dosis 40 dan 80 mg/ml/hari. Kesimpulan penelitian ini adalah ekstrak methanol daun kelor dapat menurunkan ekspresi IGF-1 jaringan hepar tikus yang diinduksi DMBA dengan dosis optimal 40 mg/ml/hari.

Kata Kunci : *7,12 dimethylbenz[a]anthracene, Hepatocellular Carcinoma, IGF-1, Ekstrak methanol daun kelor*

## ABSTRACT

Moekoe, Andreas N. 2012. *Methanol extract of Drumstick (Moringa oleifera) leaves towards IGF-1 Expression in liver tissue of Hepatocarcinoma modelled Rat (Rattus norvegicus) Induced by 7,12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)*. Final Assignment, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors : (1) Prof. Dr. M. Rasjad Indra, MS. (2) dr. Hidayat Sujuti, Ph.D, SpM.

The raising of Hepatocellular Carcinoma (HCC) incidents are marked in the world, including in Indonesia. Definite therapy of HCC is by surgery modalities although the results aren't satisfying enough. One of the risk factor is chronic carcinogen intoxication, 7,12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) which carcinogenicity related to Insulin Growth Factor-1 (IGF-1) pathway. Drumstick (*Moringa oleifera*) leaves contain quercetin as a potent antioxidant, is expected to suppress carcinogenicity of hepatocyte induced by DMBA. The objective of this study was to verify that methanol extract of drumstick leaves lowers IGF-1 expression of DMBA induced hepatocytes. Using experimental method, 5 groups of rats (*Rattus norvegicus*), each contained of 6 rats. 45 first days all groups except negative control group were induced by 10 mg/ml/day of DMBA. The following 60 days, treatment group 1, 2, and 3 were given 20, 40, 80 mg/ml/day extract of drumstick leaves. IGF-1 expressions of hepatocytes were observed by Immunohistochemistry method. Data were analyzed with ANOVA, showed methanol extract of drumstick leaves lowers IGF-1 expression significantly ( $p < 0.05$ ), moves toward normal in dose of 40 and 80 mg/ml/day. This concludes methanol extract of drumstick leaves lowers hepar tissue IGF-1 expression induced by DMBA and the optimal dose is 40 mg/ml/day.

Keywords : 7,12 dimethylbenz[a]anthracene, Hepatocellular Carcinoma, IGF-1, methanol extract of drumstick leaves

DAFTAR ISI

Halaman

Judul .....	i
Lembar Pengesahan .....	ii
Kata Pengantar .....	iii
Abstrak .....	v
Abstract .....	vi
Daftar Isi .....	vii
Daftar Tabel .....	xi
Daftar Gambar .....	xii
Daftar Lampiran .....	xiii
Daftar Singkatan .....	xiv
<b>BAB 1 PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>6</b>
2.1 Kanker Hepar .....	6
2.1.1 Anatomi dan Histologi .....	6
2.1.2 Epidemiologi.....	7
2.1.3 Patogenesis .....	8



2.1.4 Faktor Resiko .....	9
2.1.5 DMBA .....	10
2.1.6 Stadium .....	11
2.1.7 <i>Sign &amp; Symptom</i> .....	12
2.1.8 Diagnosis .....	12
2.1.9 Terapi .....	14
2.2 <i>Jalur IGF</i> .....	15
2.2.1 IGF-1 .....	16
2.2.2 IGF Receptor .....	16
2.2.3 <i>Insulin Receptor Substrate</i> .....	17
2.2.4 IGF Binding Protein.....	17
2.2.5 IGF-1 dan Karsinogenesis .....	18
2.3 Kelor ( <i>Moringa oleifera</i> ) .....	19
2.3.1 Morfologi .....	20
2.3.2 Manfaat .....	20
2.3.3 Kandungan Gizi .....	21
2.4 Flavonoid sebagai Antioksidan .....	22
2.4.1 Quercetin .....	23
2.4.2 Kaempferol .....	24
2.5. Hubungan Karsinogenesis, IGF-1, dan Quercetin pada Daun Kelor .....	25
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP .....</b>	<b>28</b>



3.1 Penjelasan Kerangka Konsep..... 29

3.2 Hipotesis Penelitian ..... 30

**BAB 4 METODE PENELITIAN..... 31**

4.1 Rancangan Penelitian..... 31

4.2 Populasi Sampel..... 31

4.2.1 Binatang coba, Objek dan Teknik Randomisasi..... 31

4.2.2 Estimasi Jumlah Pengulangan..... 32

4.2.3 Kriteria Inklusi..... 33

4.2.4 Kriteria Eksklusi..... 33

4.3 Variabel Penelitian..... 33

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian..... 34

4.5 Alat dan Bahan Penelitian..... 34

4.5.1 Alat..... 34

4.5.2 Bahan ..... 34

4.6 Definisi Operasional..... 35

4.7 Prosedur penelitian..... 35

4.7.1 Adaptasi..... 36

4.7.2 Induksi DMBA ..... 37

4.7.3 Perlakuan..... 37

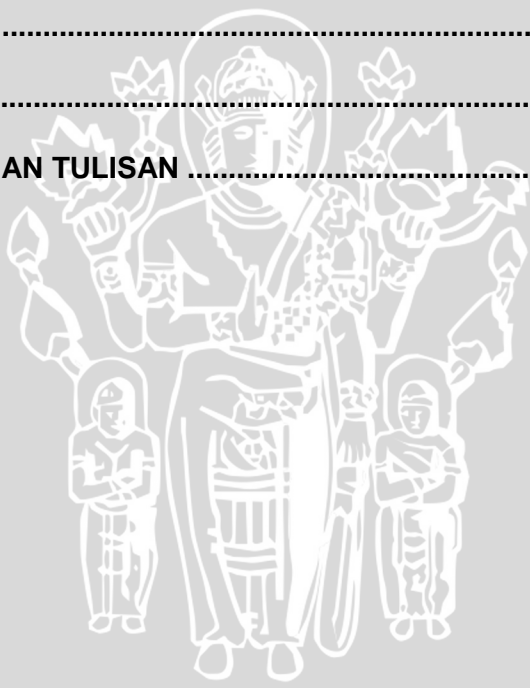
4.7.3.1 Proses Ekstraksi Daun Kelor..... 37

4.7.3.2 Pemeliharaan ..... 37

4.7.3.3 Pembedahan ..... 38

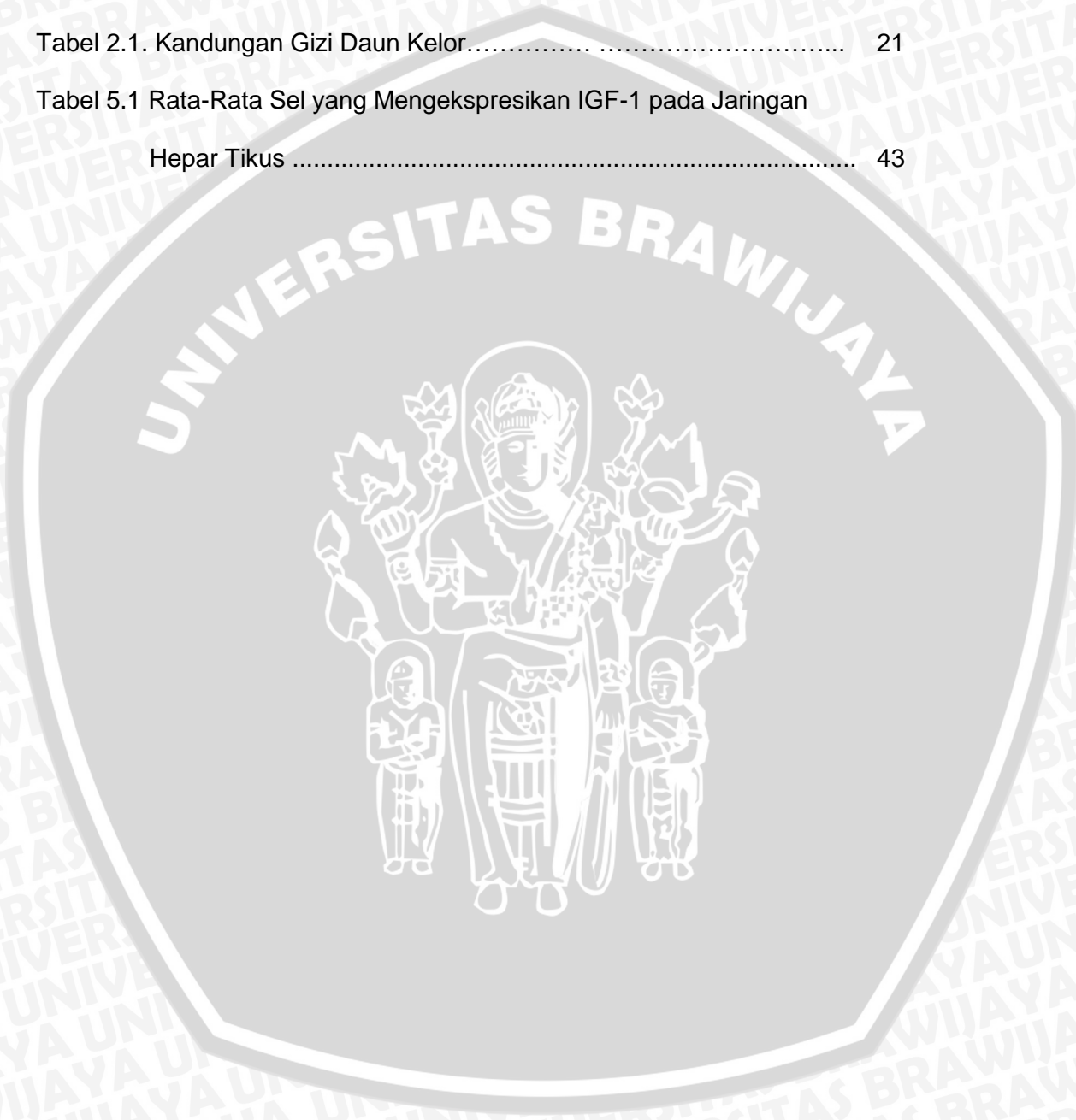


4.7.4.4 Pengecatan IHK .....	38
4.8 Rencana Pengolahan dan Analisis Data.....	39
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA .....</b>	<b>41</b>
<b>BAB 6 PEMBAHASAN .....</b>	<b>48</b>
<b>BAB 7 PENUTUP .....</b>	<b>56</b>
7.1 Kesimpulan .....	56
7.2 Saran .....	56
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>58</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>66</b>
<b>PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN .....</b>	<b>70</b>



### DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1. Kandungan Gizi Daun Kelor.....	21
Tabel 5.1 Rata-Rata Sel yang Mengekspresikan IGF-1 pada Jaringan Hepar Tikus .....	43



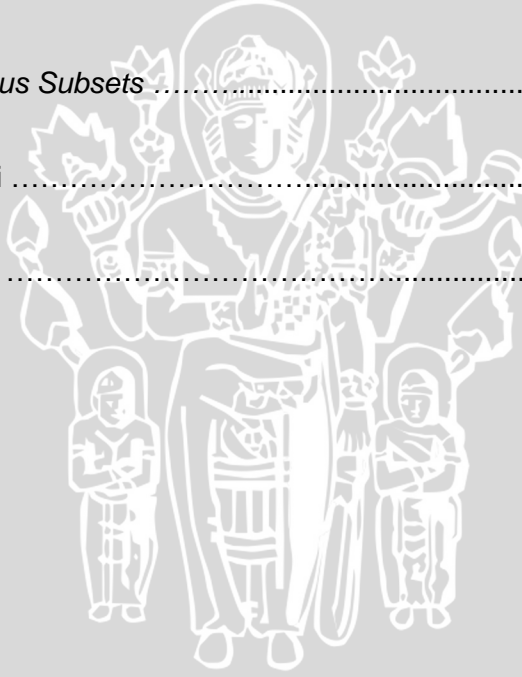
## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2. 1 RAS dan Hepatocarcinogenesis .....	9
Gambar 2. 2 Terapi HCC berdasarkan staging BCLC.....	12
Gambar 2.3 Aktivasi Jalur PI3K oleh IGF-1 .....	26
Gambar 4.1 Alur Penelitian .....	36
Gambar 5.1 Gambaran Jaringan Hepar Tikus dengan Pengecatan IHK ...	42
Gambar 5.2 Jumlah ekspresi IGF-1 oleh sel hepar tikus dengan perlakuan berbagai konsentrasi ekstrak methanol daun kelor .....	44

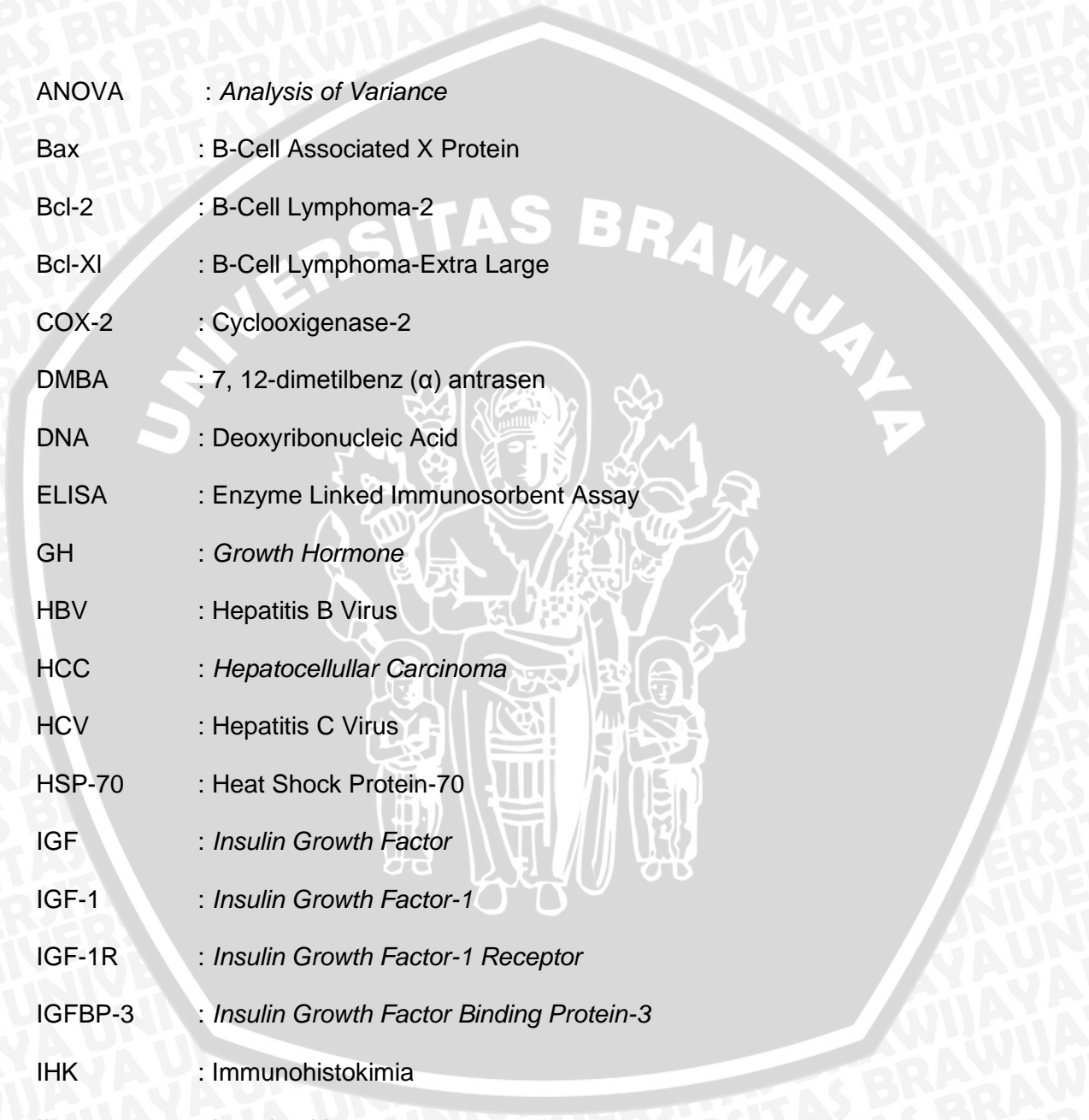


## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Uji Normalitas Data .....	66
Lampiran 2 Uji Homogenitas Data .....	66
Lampiran 3 Uji ANOVA .....	66
Lampiran 4 Uji Post Hoc .....	67
Lampiran 5 <i>Homogenous Subsets</i> .....	68
Lampiran 6 Uji Korelasi .....	68
Lampiran 7 Uji Regresi .....	69

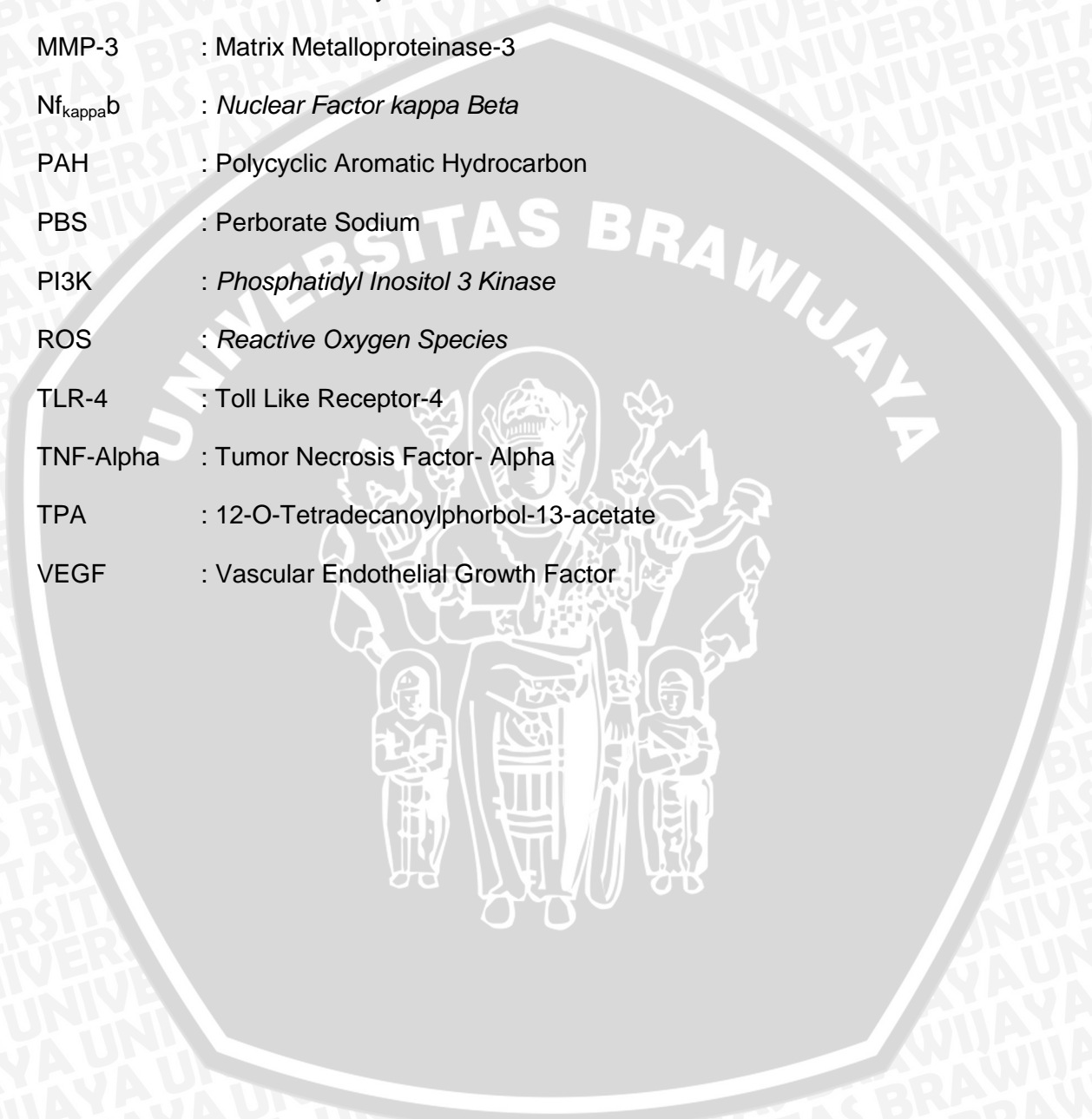


## DAFTAR SINGKATAN



ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
Bax	: B-Cell Associated X Protein
Bcl-2	: B-Cell Lymphoma-2
Bcl-XI	: B-Cell Lymphoma-Extra Large
COX-2	: Cyclooxygenase-2
DMBA	: 7, 12-dimetilbenz ( $\alpha$ ) antrasen
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GH	: <i>Growth Hormone</i>
HBV	: Hepatitis B Virus
HCC	: <i>Hepatocellular Carcinoma</i>
HCV	: Hepatitis C Virus
HSP-70	: Heat Shock Protein-70
IGF	: <i>Insulin Growth Factor</i>
IGF-1	: <i>Insulin Growth Factor-1</i>
IGF-1R	: <i>Insulin Growth Factor-1 Receptor</i>
IGFBP-3	: <i>Insulin Growth Factor Binding Protein-3</i>
IHK	: Immunohistokimia
IL-6	: Inter Leukin-6
iNOS	: inducible Nitric Oxide Synthase
IRS	: Insulin Receptor Substrate

- MAPK : *Mitogen Activated Protein Kinase*
- MDA : Malondealdehyde
- MMP-3 : Matrix Metalloproteinase-3
- Nf<sub>kappa</sub>b : *Nuclear Factor kappa Beta*
- PAH : Polycyclic Aromatic Hydrocarbon
- PBS : Perborate Sodium
- PI3K : *Phosphatidyl Inositol 3 Kinase*
- ROS : *Reactive Oxygen Species*
- TLR-4 : Toll Like Receptor-4
- TNF-Alpha : Tumor Necrosis Factor- Alpha
- TPA : 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate
- VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor



## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kanker, sebuah keganasan merupakan salah satu penyakit yang paling mengancam dalam dunia kesehatan. *Hepatocellular carcinoma* (HCC) termasuk kanker paling mematikan dan sering dijumpai. Sekitar empat belas ribu sampai delapan belas ribu kasus baru muncul di US tiap tahunnya (Manzione *et al.*, 2008) Prevalensi kanker hepar di dunia terus bertambah, termasuk di Indonesia. Tiga perempat kasus terjadi di negara Asia (Omata *et al.*, 2010). Angka insidensi di Amerika Utara, Selatan, Eropa Utara, Tengah, dan Australia adalah 3 sampai 7 kasus per 100.000 populasi. Frekuensi tertinggi ditemukan di Taiwan, Mozambik, dan Cina Tenggara, yaitu 150 per 100.000 per tahun pada pria. Di seluruh dunia, HCC terutama mengenai laki-laki dengan perbandingan 3:1 di daerah dengan insidensi rendah dan 8:1 di insidensi tinggi. Di Indonesia sendiri prevalensi HCC adalah 10-15 orang dari 100.000 penduduk. (Fauzi, 2012)

Angka kejadian HCC berkaitan dengan tingginya prevalensi infeksi HBV, alkoholisme, dan penyakit hati kronis lainnya. (Kumar *et al.*, 2004). Selain itu, etiologi HCC yang lain adalah intoksikasi kronis karsinogen (Ferenci *et al.*, 2010). Salah satu karsinogen yang dapat menginduksi kanker adalah senyawa DMBA 7,12-dimetilbenz ( $\alpha$ ) antrasen (DMBA), zat kimia yang termasuk dalam *polycyclic aromatic hydrocarbon* (PAH). Karsinogen ini sering dipakai untuk menyebabkan tumor pada



hewan coba (Currier, *et al*, 2005). Secara alami, DMBA dapat ditemukan di alam sebagai hasil dari proses pembakaran yang tidak sempurna, seperti dalam asap tembakau, asap pembakaran kayu, bensin, minyak, batubara atau asap pembakaran daging (Budi dan Widyarini, 2010). PAH merupakan kelompok polutan organik utama di lingkungan hidup yang diketahui sebagai bahan sitotoksik, mutagenik, immunosupresif. Kontaminasi DMBA biasa terjadi melalui makanan atau peroral, inhalasi maupun kontak kulit. Induksi kanker hepar dengan DMBA tersebut erat kaitannya dengan jalur *Insulin Growth Factor* (IGF), yaitu melalui kerusakan oksidatif DNA.

Salah satu perubahan komponen seluler dari karsinogenesis pada jalur IGF terjadi pada ligan. Ligan-ligan dari IGF ini merangsang proliferasi seluler dan menghambat apoptosis pada jaringan yang jauh atau berfungsi lokal sebagai *paracrine* atau *autocrine* (Stuver, *et al.*, 2000). Onkogen seperti Src kinase dan Akt kinase menstimulasi ekspresi gen IGF-1R. Kaskade tersebut nantinya akan menghasilkan diferensiasi dan proliferasi sel dan anti-apoptosis yang merupakan sifat dari kanker (Wu dan Zhu, 2011). Kerusakan oksidasi karena DMBA nantinya menyebabkan mutasi pada gen p53 yang akan meregulasi ekspresi IGF-1 di jaringan melalui *Insulin Growth Factor Binding Protein 3* (IGFBP3), sehingga ekspresi IGF-1 meningkat, dan protein-protein lain yang ada di jalur IGF-1 untuk memunculkan sifat proliferasi sel dan anti-apoptosis, misalnya *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK), dan *Phosphatidyl Inositol 3 Kinase* (PI3K) juga meningkat.

Adapun terapi untuk pasien yang mengalami kanker hepar bervariasi mulai dari kemoterapi, reseksi, ablasi, bahkan sampai transplantasi, tergantung pada

stadium berapa kanker hepar tersebut. Umumnya dari seluruh kasus kanker hati, hanya 5-15% kasus yang dapat dilakukan tindakan operasi reseksi dan memuaskan. Sisanya tidak dapat dilakukan reseksi hati karena sudah mengalami sirosis atau fungsi hatinya sudah menurun (Jurnalmedika, 2011). Karena terapi dengan modalitas bedah belum memuaskan, mulai dikembangkan modalitas herbal sebagai terapi kanker.

Banyak gagasan yang dapat kita teliti sebagai terapi dengan modalitas herbal. Salah satunya adalah dari kelor (*Moringa oleifera*), spesies monogenerik famili Moringaceae, yang berasal dari jalur sub-Himalayan yaitu India, Pakistan, Bangladesh, dan Afganistan. Karena kecepatan tumbuhnya yang sangat tinggi dan juga manfaatnya di bidang kesehatan dan industri, maka kelor (*Moringa oleifera*) telah banyak dibudidayakan di negara-negara tropis, termasuk di Indonesia (Fahey, 2005). Daun kelor diketahui mengandung berbagai substansi yang bermanfaat seperti karbohidrat, kalsium, protein, anti-oksidan (seperti *quercetin* dan karotenoid), dan lain-lain. Efek anti-oksidan yang dimiliki oleh kelor seringkali dikaitkan dengan potensi tanaman ini sebagai anti-kanker. Salah satu golongan flavonoid yaitu *quercetin* merupakan antioksidan yang banyak terdapat di daun kelor. *Quercetin* secara signifikan mencegah proliferasi berlebihan dari sel kanker, dalam hal ini proliferasi yang disebabkan oleh IGF-1.

Oleh karena itu, muncul sebuah gagasan dari pernyataan-pernyataan yang ada di atas. DMBA menginduksi karsinogenesis dan faktor risiko terjadinya HCC. IGF-1 adalah salah satu faktor penting dari karsinogenesis yang dapat memunculkan sifat proliferasi dan antiapoptosis. Sedangkan, *quercetin* dari daun

kelor dapat menghambat aktivitas IGF-1, sehingga sel kanker akan dihambat proliferasinya dan dapat mengalami apoptosis. Maka dilakukan penelitian untuk mengetahui sejauh mana kandungan quercetin pada ekstrak daun kelor dapat menghambat proses karsinogenesis yaitu proliferasi sel hepatosit yang diinduksi DMBA.

### 1.2 Rumusan Masalah

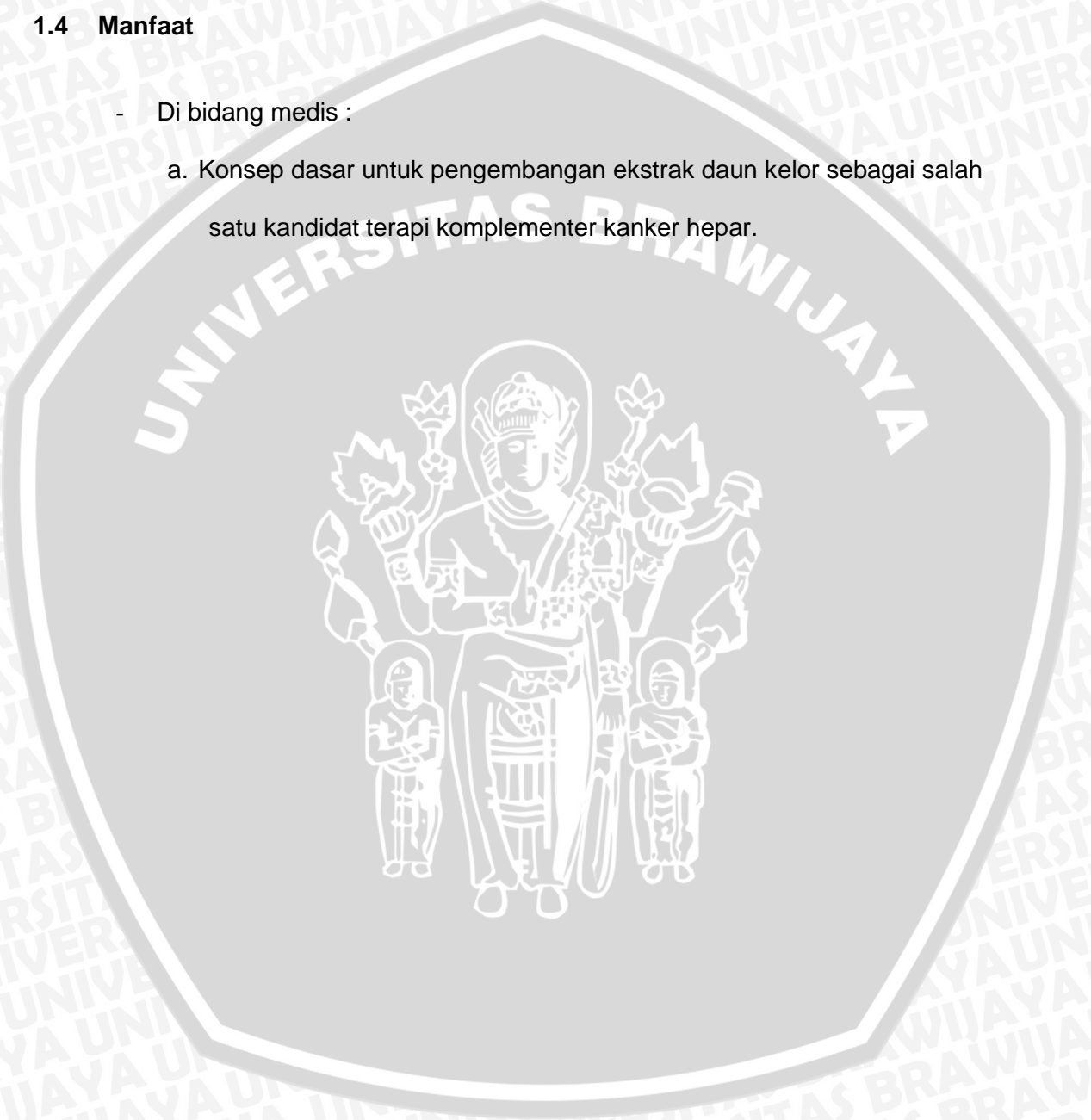
1. Apakah pemberian ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan ekspresi IGF-1 pada jaringan hepar tikus (*Rattus norvegicus*) wistar yang diinduksi 7,12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)?
2. Berapakah dosis optimal dari ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) yang diperlukan untuk menurunkan ekspresi IGF-1 pada jaringan hepar tikus (*Rattus norvegicus*) wistar yang diinduksi 7,12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)?

### 1.3 Tujuan Penelitian

1. Tujuan umum: Membuktikan pemberian ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan ekspresi IGF-1 pada jaringan hepar tikus (*Rattus norvegicus*) wistar yang diinduksi 7,12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA).
2. Tujuan khusus: Menentukan dosis optimal dari ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) yang diperlukan untuk menurunkan ekspresi IGF-1 pada jaringan hepar tikus (*Rattus norvegicus*) wistar yang diinduksi 7,12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA).

#### 1.4 Manfaat

- Di bidang medis :
  - a. Konsep dasar untuk pengembangan ekstrak daun kelor sebagai salah satu kandidat terapi komplementer kanker hepar.



## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Kanker Hepar

Kanker hepar adalah bentuk keganasan yang terjadi di hepar, yang paling sering adalah tipe hepatocellular carcinoma (HCC). Kebanyakan dari kasus HCC adalah kasus sekunder karena infeksi virus hepatitis B atau C ataupun sirosis terutama karena alkohol (kumar *et al*, 2003). HCC adalah kanker keenam yang paling sering terjadi di seluruh dunia, dan ketiga yang terbanyak menyebabkan kematian (Omata *et al*, 2010).

##### 2.1.1 Anatomi dan Histologi

Hepar adalah organ visceral yang terbesar dan terletak pada regio hypochondrium kanan dan regio epigastric, memanjang ke regio hypochondrium kiri. Hepar dipisahkan menjadi lobus kanan yang besar dan lobus kiri yang kecil, dari superior oleh ligamen falsiformis, dari posteroinferior oleh fossa yang berbentuk huruf H. Porta hepatica berisi duktus hepatica komunis di anterior, arteri hepatica di tengah, vena porta di posterior, juga nervus autonom (coeliacus sebagai simpatis, vagus parasimpatis), dan limfe terdapat disini (Ellis, 2006). Struktur utama hepar adalah sel hepatosit, sel epitelial yang berkelompok dalam lempeng yang saling berhubungan dan menyusun dua pertiga massa hepar. Portal space, area yang

terletak di pucuk lobulus mengandung jaringan ikat, duktus empedu, limfe, nervus, pembuluh darah. Ada tiga sampai enam *space* tiap lobulus yang berisi venul, arteriol, ductus dan limfe. Seluruh nutrisi diabsorpsi lewat usus menuju hepar melalui vena porta kecuali kilomikron yang diabsorpsi lewat pembuluh limfe. Eliminasi bahan toksik terjadi di empedu, sekresi eksokrin dari hepar yang penting untuk pencernaan lemak (Junqueira dan Carneiro, 2005).

### 2.1.2 Epidemiologi

Prevalensi HCC sejalan dengan angka hepatitis karena virus, dimana seringkali terasosiasi dengan HBV dan HCV. Infeksi kronis HBV adalah penyebab utama HCC pada negara Afrika dan Asia kecuali Jepang. HCV predominan menyebabkan HCC di negara-negara Eropa dan Jepang.

Selain itu, HCC memiliki variasi yang lebar terhadap lokasi geografis. Regio dengan insiden tinggi adalah sub-Sahara, Asia Timur, dan Asia Tenggara. Angka insidensi di Amerika Utara, Selatan, Eropa Utara, Tengah, dan Australia adalah 3 sampai 7 kasus per 100.000 populasi, sedangkan frekuensi tertinggi ditemukan di Taiwan, Mozambik, dan Cina Tenggara, yaitu 150 per 100.000 per tahun pada pria. Di Indonesia sendiri prevalensi HCC adalah 10-15 orang dari 100.000 penduduk (Fauzi, 2012)

Di seluruh dunia, HCC terutama mengenai laki-laki dengan perbandingan 3:1 di daerah dengan insidensi rendah dan 8:1 di insidensi tinggi. Di setiap daerah, orang berkulit hitam memiliki angka serangan yang lebih besar daripada kulit putih. Di daerah insidensi rendah, HCC umumnya timbul pada dekade ketiga hingga

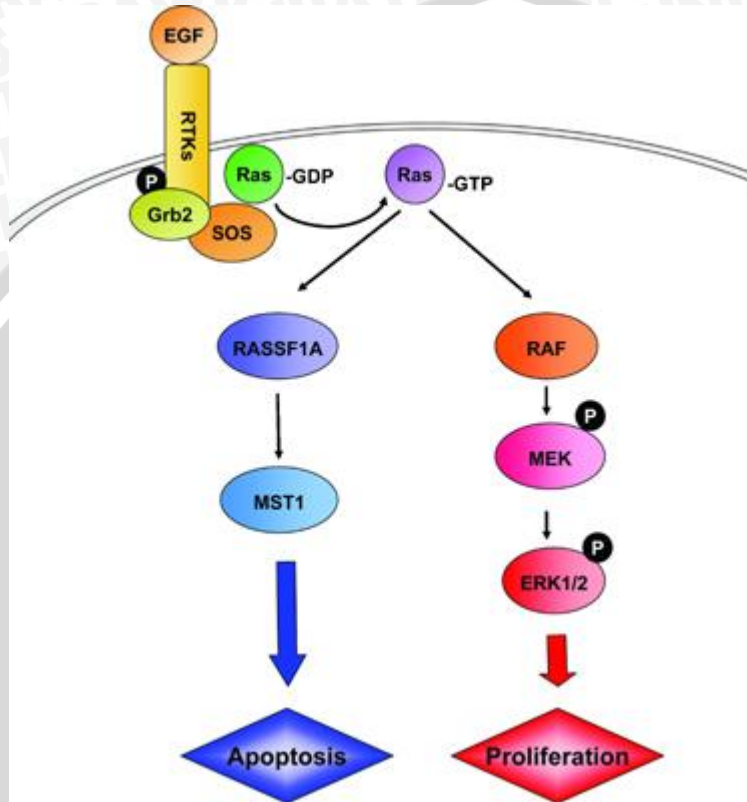
kelima sedangkan pada daerah insidensi rendah pada dekade enam hingga tujuh (Kumar *et al*, 2004). Di Asia Afrika dan beberapa negara Eropa Timur, hepatitis B kronis adalah penyebab utama HCC, jauh melebihi angka yang disebabkan HCV. Ada 300 juta orang yang terinfeksi HBV, dan 120 juta berasal dari Cina. (Ferenci, 2010)

### 2.1.3 Patogenesis

Pada jalur IGF, IGF-1 yang berikatan dengan reseptornya dapat mengaktifasi protein Akt. Akt yang teraktivasi akan memicu proses fosforilasi beberapa substrat yang akhirnya menyebabkan reaksi stimulasi dan inhibisi. Yang terstimulasi adalah NfkappaB, yang dapat masuk dalam nukleus dan menstimulasi transkripsi onkogen seperti myc. Sebaliknya, yang terinhibisi adalah caspase 9 yang normalnya adalah gen proapoptosis, sehingga sel menjadi lebih rentan untuk terus berproliferasi. Sinyal IGF dapat ditingkatkan dengan peningkatan produksi ligan, peningkatan IGF-1R atau penurunan IGFBP (Grimberg, 2003). Sel yang normal memiliki protein p53 yang berfungsi mengatur IGF-1, namun jika protein tersebut bermutasi, regulasi IGF-1 akan menjadi gagal dan jumlah IGF-1 dalam jaringan akan meningkat (Feng, 2011).

Ras dikenal untuk mengatur fungsi seluler yang beragam termasuk pertumbuhan sel, kelangsungan hidup dan migrasi. Fungsi pro-apoptosis Ras tergantung pada efektor *RAS-association domain family* (RASSF1). RASSF1 langsung berinteraksi dengan Ras aktif, yang kemudian mengaktifkan *activates mammalian sterile 20-like kinase-1* (MST1) dan menginduksi apoptosis. Dalam hal

ini, RASSF1A dapat berfungsi sebagai *gatekeeper* terhadap aktivitas onkogenik Ras (lihat gambar 2.1).



Gambar 2.1. RAS dan Hepatocarcinogenesis (Liver International, 2007)

#### 2.1.4 Faktor Resiko

Faktor resiko HCC adalah sebagai berikut:

- Infeksi kronis HBV dan HCV.
- Nutrisional dan **toksik**: alkohol, obesitas (*nonalcoholic fatty liver disease*), aflatoxin (*cofactor with HBV*), rokok, **karsinogen secara kronis**.



- Genetik: tyrosinosis, hemochromatosis (*iron overload*),  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency.
- HBV / HCV kronis.
- Alcoholic cirrhosis.
- Nonalcoholic steatohepatitis.
- Diabetes
- Cirrhosis (Ferenci et al, 2010)

#### 2.1.5 DMBA

DMBA adalah zat kimia yang termasuk dalam *polycyclic aromatic hydrocarbon* (PAH). Karsinogen ini sering dipakai untuk menyebabkan tumor pada hewan coba (Currier, *et al*, 2005). Oksidasi DMBA oleh enzim P450 hepar menghasilkan metabolit yang membentuk formasi kovalen dengan DNA dan memodifikasinya, seringkali menyebabkan tumor kulit dan payudara, namun juga bisa menyebabkan kanker lain (sigmaaldrich, 2009). DMBA menimbulkan karsinogenesis melalui kerusakan oksidatif jaringan dan sel yang dimediasi radikal bebas. Produksi besar-besaran ROS karena stress oksidatif pada sistem dapat menginduksi kerusakan rantai dan dapat memodifikasi basa DNA sehingga terjadi mutagenesis dan karsinogenesis, pada aktivasi metabolitnya memproduksi karsinogen pokok, yaitu *dihydrodiol epoxide*, yang dapat memediasi transformasi neoplastik dengan menginduksi kerusakan DNA, membentuk ROS berlebihan, serta memediasi proses inflamasi kronis (Manoharan *et al.*, 2009).

Stres oksidatif adalah hasil dari ketidakseimbangan antioksidan sehingga menyebabkan adanya ROS yang berlebihan, dan menyebabkan karsinogenetik, inflamasi, infeksi, dan penyakit kardiovaskuler dan neurologis. Dalam keadaan yang normal, tubuh dilengkapi mekanisme pertahanan untuk membuang ROS dan memproteksi sel dari kerusakan oksidatif. Namun jika enzim detoksifikasi kewalahan, jenuh, dan dalam keadaan yang tidak baik karena rendahnya asupan antioksidan, inflamasi, penuaan, ekspos pada radiasi atau asap rokok, dapat menimbulkan munculnya enzim seperti *cyclooxygenase-2*, *lipoxigenase*, dan *inducible nitric oxide synthase* sehingga memicu kerusakan seluler (Nair *et al*, 2003). Secara alami DMBA dapat ditemukan di alam sebagai hasil dari proses pembakaran yang tidak sempurna, seperti dalam asap tembakau, asap pembakaran kayu, asap pembakaran gas, bensin, minyak, batubara atau daging (Budi dan Widyarini, 2010). Glandula mammae ternyata bukan merupakan satu-satunya organ target akibat paparan DMBA yang diberikan secara oral, memperlihatkan bahwa metabolit dari DMBA yang diberikan secara oral dapat berefek pada organ lain dalam tubuh terutama pada organ saluran pencernaan (Muto *et al*, 2003).

### 2.1.6 Stadium

Kanker hepar memiliki beberapa stadium perkembangan yaitu stadium 1, kanker berukuran tidak lebih dari 2 cm dan belum menyebar. Stadium ini pasien kanker hepar dapat beraktivitas dan hidup secara normal stadium 2, kanker mempengaruhi pembuluh darah di hepar atau terdapat lebih dari satu tumor di hepar, stadium 3A, kanker berukuran lebih dari 5 cm dan telah menyebar ke pembuluh darah di dekat hepar, stadium 3B, kanker telah menyebar ke organ

terdekat seperti lambung namun belum mencapai limfonodus, stadium 3C, kanker berada dalam berbagai ukuran dan telah mencapai limfonodus, stadium 4, kanker telah menyebar ke organ yang jauh dari hepar misal paru-paru. Saat stadium ini pasien kanker hepar sudah tidak dapat beraktivitas lagi (Bruix dan Sherman., 2005). Adapun morfologinya mungkin tampak sebagai tumor unifokus yang biasanya masif, multifokus yang terdiri dari nodus dengan ukuran bervariasi, atau infiltratif difus yang menyebar luas. Semua pola di atas berpotensi menginvasi pembuluh darah. Secara histologis, HCC memperlihatkan lesi dengan diferensiasi yang baik seperti hepatosit normal yang tersusun dalam sangkar kecil, ataupun diferensiasi buruk yang terdiri dari tumor raksasa yang berinti banyak (Kumar *et al*, 2004).

#### **2.1.7 Sign & symptom**

Di Indonesia, khususnya Jakarta, manifestasi klinis sangat bervariasi dari asimtomatik hingga yang tandanya sangat jelas dan gejala gagal hati. Harus diwaspadai jika ada keluhan rasa penuh di abdomen disertai lesu dan penurunan berat badan dengan atau tanpa demam. Temuan lain adalah adanya hepatomegali dengan atau tanpa *bruit* hepatic, splenomegali, asites, ikterus, demam, dan atrofi otot (Sudoyo *et al*, 2009)

#### **2.1.8 Diagnosis**

Diagnosis pasti kanker merupakan langkah penting sebelum indikasi pengobatan. Dalam sebagian besar penyakit keganasan, diagnosis didasarkan pada sampling biopsi, tapi pengembangan teknik pencitraan yang lebih baik dan marker

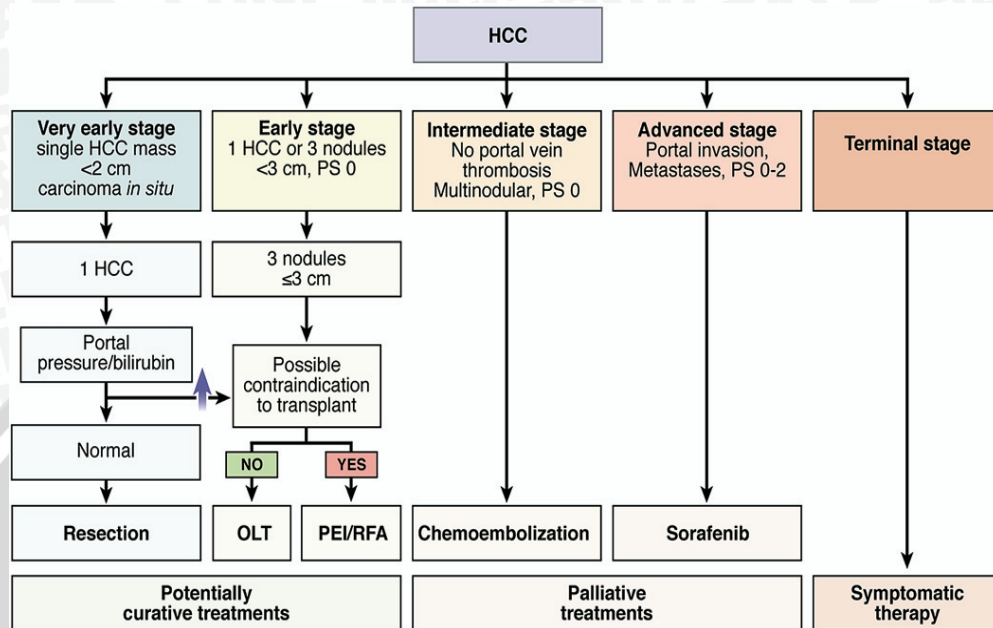
tumor spesifik menyebabkan pendirian diagnosis keganasan dalam ketiadaan konfirmasi patologi menjadi mungkin. Kriteria diagnostik noninvasif relevan untuk pengelolaan pasien dengan dugaan HCC ketika nodul terdeteksi adalah ukurannya yang kecil. HCC kecil awal biasanya terdiri dari hepatosit yang *well-differentiated* (Liaw, et al, 2004) dan ini merubah diagnosis pasti dari melalui pemeriksaan sampel FNB menjadi tantangan patologi. Membaca hasil membutuhkan keahlian khusus, dan meskipun demikian, adalah umum untuk mengasumsikan tingkat *false negative* yang tinggi dari laporan. Dengan demikian, beberapa studi di mana *false negative* tidak diamati harus dilihat dengan hati-hati (van Zonneveld, et al, 2004) .

Diagnosis HCC dapat dibuat dengan mendeteksi hepatosit yang bertransformasi menuju keganasan di biopsi hati atau dengan menunjukkan ciri-ciri radiologis dalam lesi hati setelah aplikasi media kontras, yang menegaskan *hyperperfusion* arteri tumor. Tumor kecil harus dipantau dalam interval jangka pendek (setiap 3 bulan) atau langsung diselidiki oleh biopsi untuk mengklarifikasi signifikansinya Secara makroskopis, kanker hepar terlihat sebagai massa soliter atau multipel. Nodul tumor berbentuk bulat atau oval, berwarna abu-abu atau hijau, berbatas tegas tapi tidak berkapsul. Secara mikroskopis sel kanker menyerupai hepatosit, membentuk trabekula, dapat mengandung pigmen empedu, dan pada bentuk yang tidak terdiferensiasi dapat berbentuk diskohesif, pleomorfik, anaplastik dan besar. Sering terlihat nekrosis karena vaskularisasinya buruk. (Spengler, 2005).

### 2.1.9 Terapi

Terapi bedah menawarkan satu-satunya pengobatan kuratif untuk HCC (Bruix et al, 2000). Terapi bedah dibedakan berdasarkan stadiumnya (gambar 2.2). Studi terbaik mengenai pengobatan kanker hati adalah salah satu yang membandingkan karakteristik dan hasil setelah reseksi pada pasien dengan HCC dirawat di pusat-pusat di Amerika Serikat, Perancis dan Jepang (Esnaola, et al, 2003). Sebanyak 169 pasien dirawat di Amerika Serikat, 187 di Perancis dan 230 di Jepang. 20%, 38% dan 74% dari pasien memiliki HCV di Amerika Serikat, Perancis dan Jepang, masing-masing. Selain itu, 65% pasien di Jepang, 52% di Perancis dan 23% di Amerika Serikat memiliki fibrosis yang parah / sirosis ( $P < 0,001$ ). Tidak ada perbedaan dalam 1 dan 5 tahun kematian di antara tiga negara (Marrero, 2010).

Terapi dengan modalitas herbal telah diusahakan dengan campuran yang terdiri dari tanaman obat dan dipelajari sebagai agen anti HCC selama beberapa tahun. Selain studi tentang target molekuler karsinogenesis, telah diupayakan kemungkinan terapi dari zat yang ada pada tanaman obat. Yang sering dicoba adalah campuran yang biasanya dicampur dengan komposisi yang tidak tentu. Hasilnya adalah perbedaan yang mencolok dari percobaan klinis dan eksperimental. Untuk itu, perlu diteliti lagi zat aktif yang berfungsi sebagai antikanker, penyederhanaan substansi pokok sehingga dalam klinisnya dapat dijadikan sebuah standar (Li dan Martin, 2010).



**Gambar 2.2. Terapi HCC berdasarkan staging BCLC (El Serag et al, 2008)**

PS, performance status; OLT, orthotopic liver transplantation; PEI, percutaneous ethanol injection; RFA, radiofrequency ablation.

## 2.2 Jalur IGF

Jalur IGF telah diteliti memiliki fungsi penting dalam metabolisme energi dan pembaharuan sel sebagai respon dari adanya nutrisi. Jalur ini aktif di saat Growth Hormone (GH) aktif dan menstimulasi pembentukan IGF-1 dari hepar, sebab IGF merupakan mediator utama GH di jaringan. IGF juga membantu dalam proliferasi sel, migrasi dan transformasi menjadi keganasan. Jalur ini memiliki empat komponen penting (Wu dan Zhu, 2011).

### 2.2.1 IGF

IGF memiliki dua ligan yang bersifat homolog terhadap insulin, yaitu IGF-1 dan IGF-2. Namun, ligan-ligan tersebut memiliki perbedaan dari insulin dalam hal domain tambahan, yang nantinya akan menunjukkan perannya dalam karsinogenesis (LeRoith dan Roberts, 2003). Mayoritas IGF-1 disintesis di hepar dalam pengaruh *Growth Hormones (GH)*, hormon yang berpengaruh dalam pertumbuhan postnatal. IGF-1 dapat berfungsi sebagai *autocrine*, *paracrine*, ataupun *endocrine* faktor pertumbuhan (Scharf *et al*, 2001). Sejalan dengan kanker, semakin berkurang jumlah IGF-1, semakin berkurang juga peluang seseorang terkena kanker (Khandwala *et al*, 2000). Sebaliknya dengan penambahan IGF-1, proteksi tubuh terhadap kanker menjadi berkurang. (Vatten *et al*, 2004). IGF-2 memiliki homologi 60% dengan IGF-1 (Pollak, 2008). Mirip dengan IGF-1, diproduksi di hepar dan dapat berfungsi sebagai *autocrine*, *paracrine*, ataupun *endocrine*, namun jumlahnya menurun drastis setelah kelahiran (LeRoth dan Roberts, 2003).

### 2.2.2 IGF Receptor

Ligan IGF akan berikatan dengan reseptor-reseptornya. Ada reseptor IGF-1(IGF-1R), IGF-2(IGF-2R), reseptor insulin (IR), dan IR sekaligus IGF-1R (IGF-1R/IR). IGF-1 dan IGF-2 berikatan dengan IGF-1R dengan afinitas kuat, IGF-2R hanya berikatan dengan IGF-2 (Pollak, 2008). IGF-1 dapat berikatan dengan IR hanya jika diberikan dengan dosis yang sangat tinggi, karena ikatan dengan IGF-1R memiliki afinitas 100 kali lebih besar daripada dengan IR. Pada IGF-1R/IR, ikatan

dengan ligan IGF-1 lebih sering daripada dengan insulin sendiri (leRoth dan Roberts, 2003).

IGF-1R lebih bersifat sebagai anti-apoptosis dengan menghambat kerja gen p53, reseptor ini juga bersifat sebagai pemicu mobilitas sel. Hal inilah yang nantinya akan memicu sebuah karsinogenesis (Pollak, 2008). Sedangkan IGF-2R kurang diketahui kerjanya dan hanya dianggap sebagai tempat pembuangan ligan-ligan IGF (Pollak *et al*, 2004).

### **2.2.3 Insulin Receptor Substrate**

*Insulin Receptor Substrate (IRS)* dan Shc protein, adalah komponen ketiga dari aksis IGF. Berfungsi sebagai sinyal yang mengaktifasi IGF-1R. banyak tipe IRS, tapi yang paling penting adalah IRS-1 dan IRS-2. IRS dan Shc nantinya akan merekrut protein tambahan MAPK, dan PI3K, yang menghasilkan diferensiasi sel, proliferasi dan anti apoptosis (Pollak, 2008).

### **2.2.4 IGF Binding protein**

Komponen terakhir adalah *IGF Binding Protein (IGFBP)*. Ada 6 tipe IGFBP yang memiliki afinitas kuat dengan IGF-1 dan IGF-2. IGFBP 1-4 berikatan dengan IGF-1 dan IGF-2 dengan afinitas sama, sedangkan IGFBP 5 dan 6 lebih berafinitas terhadap IGF-2 (Wu dan Zhu, 2011).



### 2.2.5 IGF-1 dan Karsinogenesis

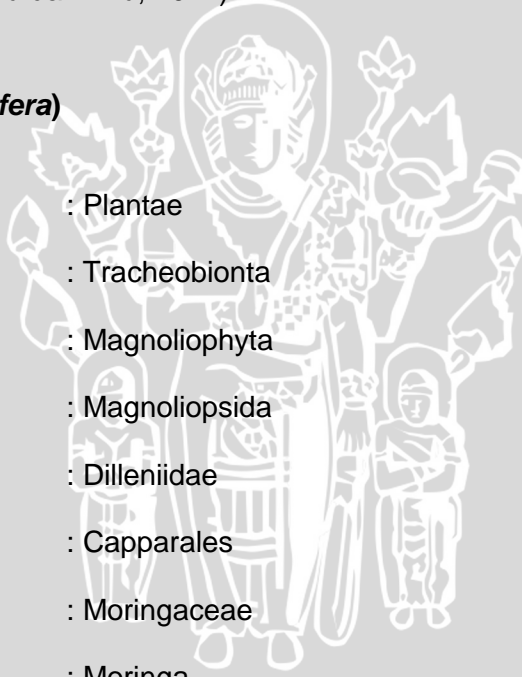
Karsinogenesis melibatkan baik kelangsungan hidup sel dan kemampuan untuk meloloskan diri dari *cell cycle arrest* dan mekanisme apoptosis yang normalnya berfungsi mencegah pertumbuhan sel yang berlebihan. Stimulasi faktor pertumbuhan seperti IGF-1 dibutuhkan untuk dapat melewati titik restriksi di stase G<sub>1</sub>, dimana sel seharusnya sudah berhenti melakukan pembelahan. Cyclin D1 dan *Cyclin dependent kinase 4*(CDK4) adalah protein yang memungkinkan hal tersebut (Diehl, 2002).

IGF-1 yang berikatan dengan reseptor mengaktifasi MAPK kemudian protein Akt. Akt yang teraktivasi akan memicu proses fosforilasi beberapa substrat yang akhirnya menyebabkan reaksi stimulasi dan inhibisi. Yang terstimulasi adalah IKK alfa yang nantinya akan mengaktifasi NfκB, yang dapat masuk dalam nukleus dan menstimulasi transkripsi onkogen seperti myc. Sebaliknya, yang terinhibisi adalah caspase 9 yang normalnya adalah gen proapoptosis, sehingga sel menjadi lebih rentan untuk terus berproliferasi. Sinyal IGF dapat ditingkatkan dengan peningkatan produksi ligan, peningkatan IGF-1R atau penurunan IGFBP yang secara kompetitif menghambat ikatan IGF dengan reseptor (Grimberg, 2003).

Selanjutnya, ada bentuk adaptasi untuk terus bertumbuh dalam massa tumor, dimana nutrisi semakin terbatas. Kerja IGF adalah dengan menginduksi agen angiogenesis yaitu *vascular endothelial agent* (VEGF). Induksi VEGF oleh IGF-1 dapat dilihat di kanker colon (Bustin *et al*, 2002), paru atau tiroid (Tang *et al*, 2006). Ciri khas lain dari keganasan adalah kemampuan untuk invasi lokal dan metastasis, termasuk perubahan sel dan interaksi dengan sekitar. IGF-1 menyebabkan motilitas

sel meningkat dengan aktivasi cathepsin yang meluruhkan *basement membrane*, selain itu aktivasi IGF-1R menyebabkan integrin yang adalah molekul yang memberikan sinyal ke intrasel mengalami relokalisasi ke bagian sel yang aktif membelah. PI3K dan MAPK yang telah dibahas sebelumnya juga berkontribusi dengan peran masing-masing separasi sel dengan *adherent junction* sehingga sel menjadi lebih motil dan memicu migrasi sel (Grimberg, 2003). IGF-1 juga memiliki jalur MAPK, yang nantinya dapat memicu aktivasi RAS, sebuah onkogen yang berperan dalam HCC (Wu dan Zhu, 2011).

### 2.3 Kelor (*Moringa oleifera*)



Kingdom	: Plantae
Sub kingdom	: Tracheobionta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub kelas	: Dilleniidae
Ordo	: Capparales
Famili	: Moringaceae
Genus	: Moringa
Species	: <i>Moringa oleifera lam</i> (Foidl, 2001).

Kelor (*Moringa oleifera*) adalah tanaman yang paling banyak dibudidayakan di jalur sub-Himalayan di India, Pakistan, Bangladesh, dan Afghanistan. Pohon yang tumbuh secara cepat ini pertama kali dibudidayakan oleh bangsa Romawi kuno, Yunani, dan Mesir, dimana sekarang sangat banyak dan secara alami berlokasi di

daerah tropis. Sebuah pohon tahunan dengan kayu yang kurang bernilai, tapi selalu dipakai dalam pengobatan tradisional dan industri. Kelor udah menjadi tanaman yang penting di India, Ethiopia, Filipina, dan Sudan, juga di Afrika Barat, Timur dan Selatan, Asia tropis( termasuk Indonesia), Amerika Latin, Karibia, Florida, dan kepulauan Pasifik. Setiap bagian dari kelor dapat dikonsumsi manusia Kelor adalah sumber dari protein, Ca, Fe, vitamin C dan carotenoid yang baik, sehingga pantas untuk dibudidayakan di negara berkembang yang menghadapi masalah gizi (Fahey, 2005).

### **2.3.1 Morfologi**

Kelor termasuk jenis tumbuhan perdu yang dapat memiliki ketinggian batang 7 -11 meter dan diameter batangnya kira-kira 30 cm dengan mahkota bunga berbentuk payung terbuka. Batang kayunya getas (mudah patah) dan cabangnya jarang tetapi mempunyai akar yang kuat. Daunnya berbentuk bulat telur dengan ukuran kecil-kecil bersusun majemuk dalam satu tangkai. Kelor dapat berkembang biak dengan baik pada daerah yang mempunyai ketinggian tanah 300-500 meter di atas permukaan laut. Pengembangbiakannya dapat dengan cara stek Setiap pohon dapat menghasilkan 15.000-25.000 benih per tahun. Daun dan buah kelor ini dapat dimakan (Foidl, 2001).

### **2.3.2 Manfaat**

Sebagai salah satu bahan obat tradisional karena efek kuratifnya, validasi ilmiah dari kegunaan populer ini mulai berkembang untuk mendukung paling tidak

beberapa pernyataan. Dalam literatur ilmiah kelor memiliki sifat antibiotik, antitripanosoma, hipotensi, antispasmodik, antiulcer, anti inflamasi, hipokolesterolemi, dan hipoglikemi. Bahkan dapat dipakai memurnikan air karena sifat antibiosis dan sedimentasinya, juga mengurangi titer serkaria dari Schistosoma (Fahey, 2005). Dengan metode HPLC (High Performace Liquid Chromatography) diekstrak dengan pelarut methanol, didapatkan 1,62% quercetin dan 0,673% kaempferol dari berat kering daun kelor sebelum diekstrak.(Coppin, 2008)

### 2.3.3 Kandungan Gizi

Tabel 2.1. Kandungan Gizi Daun Kelor ( Broin, 2007)

Nutrient	Mean value for 100g Dry Matter
Proteins (g)	29 ± 6
Minerals (g)	11 ± 2.2
Fat (g)	8 ± 2.5
Carbohydrates (g)	38 ± 7
Fibers (g)	10 ± 3
Calcium (mg)	1924 ± 288
Copper (mg)	1.0 ± 0.2
Iron (mg)	28 ± 6
Potassium (mg)	1384 ± 420
Magnesium (mg)	422 ± 52
Phosphorus (mg)	267 ± 49
Manganese (mg)	8.4 ± 2.4
Zinc (mg)	2.5 ± 0.6
Vitamin A (IU)	15620 ± 6475
Vitamin C* (mg)	773 ± 91

Kandungan gizi kelor (lihat tabel 2.1) adalah sebagai berikut:

- a. Protein dua kali lebih banyak dibanding yogurt. Biasanya hanya produk hewani seperti daging, telur, dan susu yang mengandung asam amino esensial. Ternyata daun kelor juga mengandung asam amino esensial.
- b. Vitamin C tujuh kali lebih banyak daripada jeruk. Vitamin C berperan sebagai antioksidan dan membantu sistem imun tubuh.
- c. Kalium tiga kali lebih banyak dibanding pisang. Kalium adalah kation yang penting untuk sistem saraf dan kardiovaskuler.
- d. Vitamin A empat kali lebih banyak dibanding wortel. Vitamin A bertindak sebagai suplemen terhadap mata, kulit, jantung, diare, dan banyak penyakit lain.
- e. Kalsium empat kali lebih banyak dibanding susu. Kalsium berperan membentuk tulang dan gigi yang kuat, dan membantu mencegah osteoporosis (Pace, 2004).

Selain itu, ekstrak metanol dari daun kelor mengandung asam klorogenik, rutin, quercetin glukosida, dan kaempferol rhamnoglucosida. Quercetin dan Kaempferol adalah senyawa-senyawa flavonoid yang bersifat sebagai antioksidan (Atawodi *et al*, 2009).

#### **2.4 Flavonoid sebagai Antioksidan**

Flavonoid adalah campuran polyphenol yang banyak terdapat di alam, dan dikategorikan tergantung struktur kimia ke dalam flavonol, flavon, flavanon,

isoflavon, catechin, anthocyanidin dan chalcon. Flavonoid memiliki efek terhadap kesehatan manusia, berupa antialergi, antiinflamasi, antiplatelet, dan antioksidan (Atawodi *et al*, 2009).

Antioksidan adalah sebuah grup zat yang memiliki kerja proteksi sel terhadap efek destruktif dari reaktif oksigen, misalnya superoxide, peroxy radikal, hydroxyl radikal, dan peroxy nitrite. Ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan akan menimbulkan stress oksidatif yang menyebabkan kerusakan seluler. Kerusakan tersebut dikaitkan dengan kanker, penuaan, aterosklerosis, iskemi, inflamasi, dan neurodegeneratif. Flavonoid membantu memberikan proteksi bersamaan dengan vitamin antioksidan dan enzim, menjadi efek pertahanan antioksidan dalam tubuh. Antioksidan yang biasa dikenal adalah vitamin C, vitamin E, selenium, dan karotenoid. Flavonoid dalam tanaman memiliki efek yang sama dengan antioksidan tersebut. Quercetin, adalah antioksidan diet yang paling banyak, sehingga bisa disebut sebagai antioksidan yang poten (Buhler dan Miranda, 2000). Dalam daun kelor, terdapat sekitar 232,5 mg/kg berat kering quercetin, sedangkan kandungan kaempferol dan flavonoid lainnya masih belum terdeteksi jumlahnya (Miean dan Mohamed, 2000).

#### **2.4.1 Quercetin**

Quercetin adalah antioksidan yang tergabung dalam kelompok flavonoid, pigmen tanaman yang memberi buah, bunga, dan sayuran warna mereka. Antioksidan memiliki sifat menahan efek merusak dari partikel yang disebut radikal bebas. Dimana radikal bebas tersebut merusak membran sel, mengubah DNA,

bahkan sampai menyebabkan kematian sel. Quercetin bertindak mirip dengan antihistamin dan antiinflamasi, juga dapat memproteksi terhadap penyakit jantung dan kanker, selain itu dapat menstabilkan sel yang bersifat cenderung melepaskan histamin (Ehrlich, 2011).

Ditemukan dalam bawang, anggur, sayuran hijau, dan lain-lain, quercetin memiliki efek antiproliferatif terhadap sel-sel keganasan. Dalam laporan terakhir, quercetin menghambat proliferasi sel kanker prostat tikus dengan berinteraksi dengan jalur IGF-1. IGFBP3 adalah kelompok protein yang berafinitas tinggi dengan IGF, dan mampu memodifikasi aksi mitogen dari IGF dengan meregulasi aksesnya ke dalam reseptor IGF-1 (Vijayababu, 2006).

#### 2.4.2 Kaempferol

Kaempferol (3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one) adalah flavonoid yang banyak ditemukan pada tanaman pangan ( brokoli, teh, kubis, kacang, bawang, tomat, strawberi, dan anggur) dan tanaman-tanaman obat ( ginkgo biloba, equisetum, *Moringa oleifera*, *Sophora japonica* dan propolis). Beberapa studi epidemiologi mengatakan ada asosiasi positif konsumsi makanan mengandung kaempferol dengan penurunan resiko penyakit seperti kanker dan kardiovaskular (Calderón-Montaño, 2011). Kaempferol, diketahui memiliki efek antiinflamasi dengan supresi ekspresi iNOS, COX-2, MMP3 dan blok aktivasi TLR-4. Selain itu, kaempferol juga menghambat LPS-diinduksi-aktivasi NF- $\kappa$ B, p38 MAPK, C-Jun kinase, dan fosforilasi AKT (Park *et al.*, 2011).

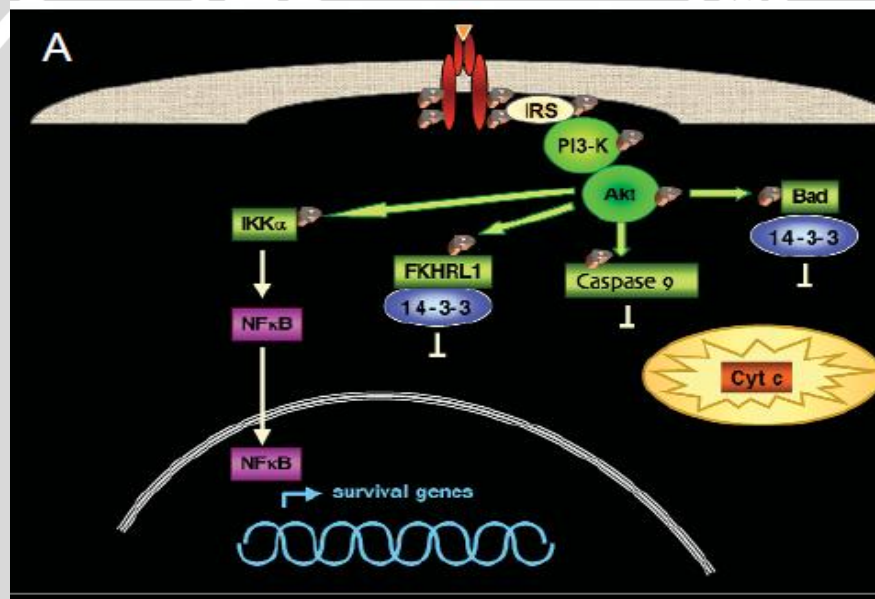
## 2.5 Hubungan karsinogenesis, IGF-1, dan quercetin pada daun kelor

Karsinogenesis dimulai dengan beberapa langkah dimana kerusakan genetik dan epigenetik secara bertahap terakumulasi dan menghasilkan ketidakteraturan homeostasis (Gorgoulis *et al*, 2005). Induksi kanker oleh DMBA menimbulkan karsinogenesis melalui kerusakan oksidatif jaringan dan sel yang dimediasi radikal bebas. Produksi besar-besaran ROS karena stress oksidatif pada sistem dapat menginduksi kerusakan rantai dan dapat memodifikasi basa DNA sehingga terjadi mutagenesis dan karsinogenesis, pada aktivasi metabolitnya memproduksi karsinogen pokok, yaitu *dihydrodiol epoxide*, yang dapat memediasi transformasi neoplastik dengan menginduksi kerusakan DNA, membentuk ROS berlebihan, serta memediasi proses inflamasi kronis (Manoharan *et al.*, 2009).

Kerusakan tersebut akan menjadi tumor invasif melalui proses dan interaksi dengan bermacam-macam *growth factor* dan reseptornya (Yang *et al*, 2011). Sel yang normal memiliki protein p53 yang berfungsi mengatur IGF-1, namun jika protein tersebut bermutasi, regulasi IGF-1 akan menjadi gagal dan jumlah IGF-1 dalam jaringan akan meningkat (Feng, 2011). Seiring berkembangnya kanker, apoptosis di jaringan sekitar meningkat dengan maksud untuk membatasi ekspansi dari sel kanker (Yang dan Winslet, 2011). Namun, level yang tinggi dari *growth factor*, termasuk IGF-1 menjadi kunci dalam kerusakan genetik untuk menghindari proses apoptosis tersebut dan akhirnya berkembang bebas menjadi kanker. Sistem IGF-1 juga menjadi kunci dari proliferasi dan antiapoptosis dari banyak keganasan, sehingga berperan penting dalam resistensi terhadap agen-agen kemoterapi (Pollak *et al*, 2004).



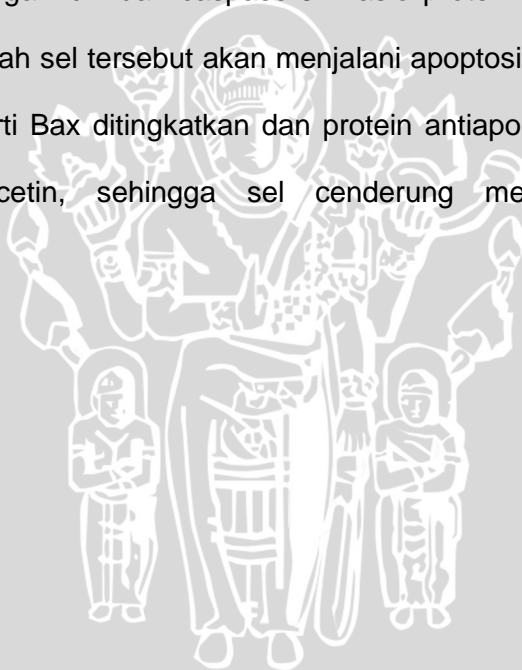
IGF dapat memediasi evakuasi sel kanker dari apoptosis dengan jalur MAPK dan PI3K. Jalur MAPK dan PI3K menyebabkan sifat proliferasi dan antiapoptosis (Le Roith dan Robert, 2003). Dalam Jalur MAPK, IGF-1 dapat mengaktivasi RAS yang berperan dalam patogenesis HCC, sedangkan pada jalur PI3K yang selanjutnya mengaktivasi Akt, akan memfosforilasi beberapa substrat (lihat gambar 2.3). Fosforilasi tersebut yang nantinya akan menghindarkan sel kanker dari apoptosis.



**Gambar 2.3. Aktivasi Jalur PI3K oleh IGF-1 (Grimberg, 2003)**

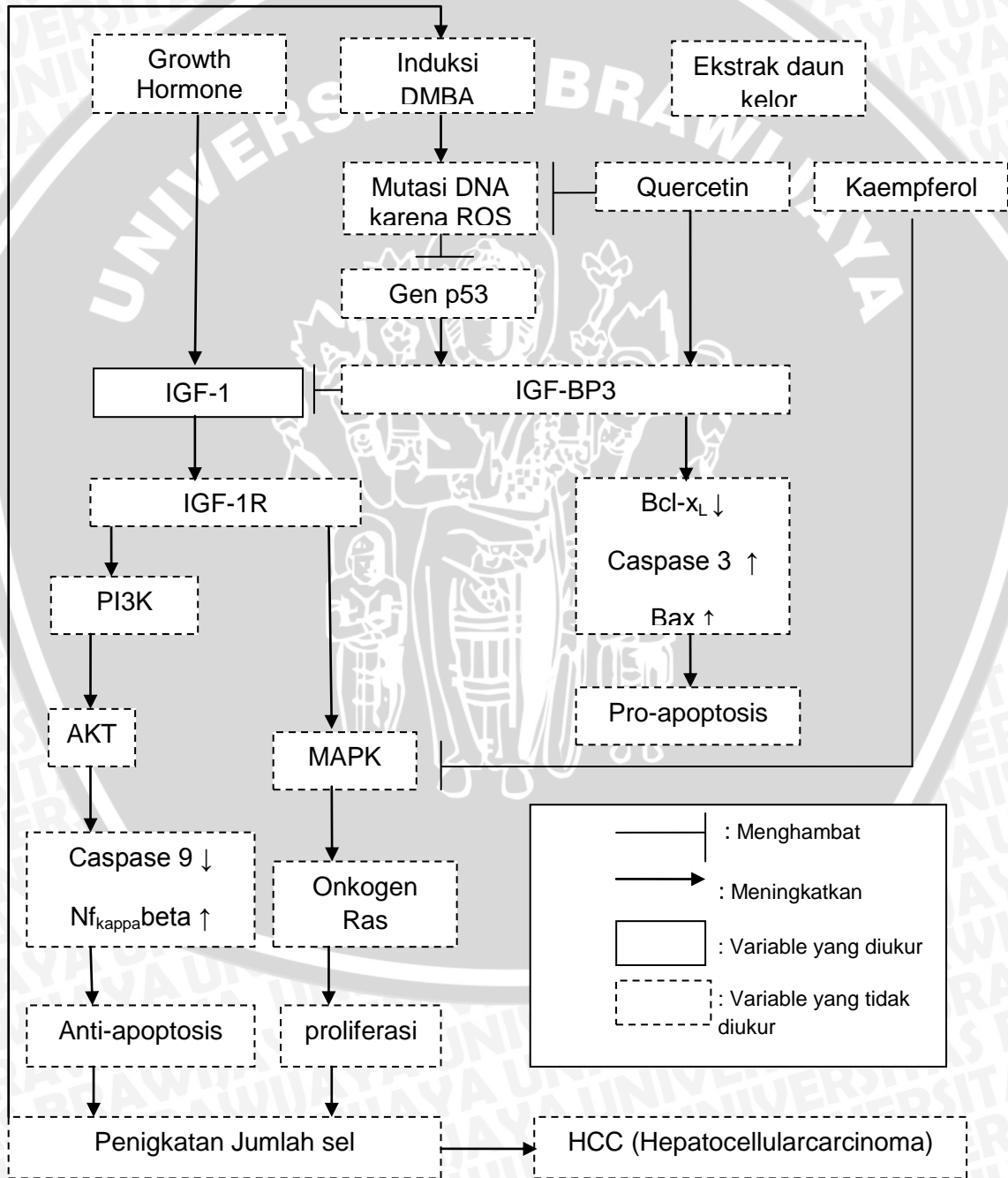
Quercetin, flavonoid dari daun kelor bersifat sebagai antioksidan. Antioksidan dapat menetralkan radikal bebas dan mengurangi efek destruktifnya (Ehrlich, 2011), sehingga kerusakan sel termasuk kerusakan DNA oleh karena reaksi oksidatif dapat dicegah. Selanjutnya, karsinogenetik karena ROS dapat diminimalisir, sel kanker dapat dihambat pertumbuhannya. Selain itu, quercetin menghambat proliferasi sel kanker prostat tikus dengan berinteraksi dengan jalur IGF-1 (Wang, 2003). IGF1BP3

adalah kelompok protein yang berafinitas tinggi dengan IGF-1, dan mampu memodifikasi aksi mitogen dari IGF dengan meregulasi aksesnya ke dalam reseptor IGF-1R, meskipun masih merupakan keambiguan bagaimana caranya. Jika IGF-1 dapat diturunkan kerjanya pada sel kanker, apoptosis tidak dapat dihindari lagi dan sel kanker dapat dihancurkan oleh mekanisme pertahanan tubuh. Efek dari quercetin juga berperan pada induksi apoptosis melalui peran IGFBP3. Peningkatan sekresi IGFBP3 oleh quercetin dikaitkan dengan peningkatan ekspresi dari sifat proapoptosis dari keluarga Bcl2 dan caspase-3. Rasio protein proapoptosis penting untuk menentukan apakah sel tersebut akan menjalani apoptosis atau tidak. Protein untuk proapoptosis seperti Bax ditingkatkan dan protein antiapoptosis seperti Bcl-x<sub>L</sub> diturunkan oleh quercetin, sehingga sel cenderung mengalami apoptosis (Vijayababu *et al*, 2006).



BAB 3

KERANGKA KONSEP



### 3.1 Penjelasan Kerangka Konsep

Induksi DMBA akan menghasilkan stress oksidatif yang tinggi dan mampu merusak DNA. Pada DNA yang mengalami kerusakan akan terjadi perubahan pada transkripsinya dan menghasilkan mutasi pada sel. Mutasi tersebut jika terjadi pada sel yang aktif membelah akan menghasilkan sel mutan yang berpotensi menjadi kanker.

Sel mutan tersebut cenderung berinteraksi dengan *growth factor* yang akan menunjang proses karsinogenesis, selain itu, dapat menghasilkan mutan p53 yang nantinya dapat menyebabkan kegagalan jaringan meregulasi kadar *growth factor*. Salah satu dari *factor* tersebut adalah IGF-1, yang dipengaruhi oleh GH. Gen p53 meregulasi ketersediaan IGF-1 jaringan dengan IGFBP3. Saat IGF-1 berikatan dengan reseptornya, akan timbul kaskade-kaskade aktivasi protein, yang terutama adalah PI3K dan MAPK. PI3K nantinya akan mengaktivasi protein Akt yang memiliki sifat anti apoptosis, dengan cara meningkatkan ekspresi Nf<sub>kappa</sub> beta (sebuah substrat yang berfungsi menghindarkan sel kanker dari apoptosis), dan menurunkan caspase-9. Sedangkan MAPK akan meningkatkan sifat proliferasi dengan jalur Ras, yang merupakan onkogen manusia. Hal ini akan mengakibatkan sel memiliki sifat anti apoptosis dan proliferasi, yang merupakan sifat dari sel kanker, memicu terjadinya HCC.

Quercetin, salah satu flavonoid yang paling dominan di dalam daun kelor, mampu menghambat karsinogenesis dengan 3 cara. Yang pertama, dengan menghambat stress oksidatif itu sendiri. Dalam tubuh ada antioksidan yang berperan menetralsir zat oksidatif, sebuah zat yang digunakan sel inflamasi untuk melawan

patogen-patogen. Jika ada ketidakseimbangan antara oksidatif dan antioksidan, akan terjadi stress oksidatif yang akan merusak DNA dan menghasilkan mutasi pada DNA.

Cara kedua, adalah lewat meningkatkan IGFBP3, sebuah protein yang berikatan dengan ligan IGF-1 dan berfungsi sebagai inhibitor dari IGF-1 untuk menempel pada reseptor dan teraktivasi. Hal ini memungkinkan IGFBP3 untuk menurunkan IGF-1 jaringan.

Cara ketiga berkaitan dengan IGFBP3, yang dapat menginduksi apoptosis. Melalui aktivasi dari protein dan enzim apoptosis seperti Bcl-x<sub>L</sub>, Bax, dan caspase-3. Dengan meningkatkan apoptosis, maka sifat anti apoptosis dari sel kanker dan karsinogenesis dapat dihambat. Selain itu, ditemukan adanya kaempferol dari daun kelor yang juga merupakan antioksidan, dan dapat menurunkan ekspresi MAPK.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Quercetin dari ekstrak methanol daun kelor dapat menurunkan ekspresi IGF-1 pada jaringan hepar tikus wistar yang diinduksi DMBA.

## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Rancangan eksperimental yang digunakan adalah rancangan eksperimen sederhana (*post test control group design*) dimana subyek dibagi menjadi 5 kelompok (I sampai dengan V) secara random. Tiap kelompok terdiri dari 6 tikus. Kelompok I adalah tikus yang tidak diberi diet mengandung DMBA (kontrol negatif), kelompok II tikus diberi diet mengandung DMBA saja (kontrol positif), sedangkan kelompok III sampai dengan V (3 kelompok) diberi diet mengandung DMBA dengan ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dalam berbagai dosis.

### 4.2 Populasi Sampel

#### 4.2.1 Binatang Coba, Objek dan Teknik Randomisasi

Binatang coba dalam penelitian ini adalah tikus jenis *Rattus norvegicus* galur wistar yang dipelihara di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pemeliharaan dilakukan dalam kandang yang dijaga kebersihannya.

Objek penelitian yang dipakai adalah tikus wistar jenis kelamin jantan, dewasa dengan umur  $\pm$  2 bulan. Teknik randomisasi untuk pengelompokan

perlakuan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) atau *Randomized Completely Design* (RCD) mengingat baik hewan coba, bahan pakan, dan bahan penelitian lainnya dapat dikatakan homogen. Pada rancangan ini dimungkinkan setiap hewan coba berpeluang sama untuk mendapat kesempatan sebagai sampel baik dalam kelompok perlakuan maupun dalam kelompok kontrol.

#### 4.2.2 Estimasi Jumlah Pengulangan

Dalam penelitian ini terdapat 5 perlakuan, maka jumlah binatang coba untuk masing-masing perlakuan dapat dicari dengan rumus  $[(np-1) - (p-1)] \geq 16$  dengan  $n$  = jumlah pengulangan tiap perlakuan;  $p$  = jumlah perlakuan. Dari sejumlah sampel ini akan diuji dengan level signifikansi 95%.

$$[(np-1) - (p-1)] \geq 16$$

$$[(5n-1) - (5-1)] \geq 16$$

$$(5n-1) - 4 \geq 16$$

$$(5n-1) \geq 20$$

$$5n \geq 21$$

$$n \geq 4.2$$

Dari rumus tersebut, jika banyak perlakuan adalah 5 maka jumlah pengulangan yang dibutuhkan untuk tiap-tiap kelompok perlakuan adalah 4.

Sedangkan 2 ekor sisanya untuk cadangan. Jadi untuk 5 kelompok dibutuhkan sebanyak 30 tikus. (Solimun, 2001)

#### **4.2.3 Kriteria Inklusi**

Tikus yang dimasukkan dalam penelitian ini adalah strain wistar, dengan umur kira-kira 2 bulan, berjenis kelamin jantan, berat badan kurang lebih 200 gram, dan dalam keadaan sehat selama penelitian.

#### **4.2.4 Kriteria Eksklusi**

Tikus yang selama penelitian tidak mau makan, tikus yang kondisinya menurun, sakit dalam masa persiapan atau adaptasi.

#### **4.3 Variabel Penelitian**

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian per oral ekstrak methanol daun kelor dengan dosis 20, 40, 80 mg. Pemberian per oral ekstrak methanol daun kelor dengan sonde dilakukan selama 60 hari (Parvathy and Umamaheswari, 2007) tiap pagi hari jam 10. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah jumlah ekspresi IGF-1 dalam jaringan hepar. Variabel kendali adalah variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti agar objek penelitian selalu terkendali dan dalam keadaan homogen. Variabel kendali dalam penelitian ini meliputi:

1. Kriteria inklusi
2. Pemberian diet DMBA
3. Pemberian per oral ekstrak methanol daun kelor dengan sonde



#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Eksperimen ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Desember 2011 sampai dengan Maret 2012.

#### 4.5 Alat dan Bahan Penelitian

##### 4.5.1 Alat

1. Alat Pemeliharaan Binatang Coba

Kandang dari kotak plastik, tutup kandang dari anyaman kawat, botol air, rak tempat menaruh kandang

2. Alat Pembuat Makanan Binatang Coba

Baskom plastik, timbangan, sarung tangan, gelas ukur

3. Alat Pengambilan Sampel

Seperangkat alat bedah, spuit 5 ml, seperangkat tabung reaksi, kapas

4. Alat Pemeriksaan kadar IGF-1 hepar

Dengan metode IHK.

##### 4.5.2 Bahan

1. Bahan Makanan Tikus

Pakan tikus dewasa per ekor per hari adalah 50 gram. Dalam penelitian ini terdapat satu macam pakan tikus yaitu diet normal untuk kelima kelompok perlakuan. Adapun komposisi pakan normal akan dijelaskan sebagai berikut.

- a. Pakan normal yang terdiri dari comfeed PARS 53% (dengan kandungan air 12 %, protein 11 %, lemak 4 %, serat 7 %, abu 8 %,

Ca 1,1 %, fosfor 0,9 %, antibiotika, coccidiostat 53 %) dan tepung terigu 23,5 %, dan air 23,5 %.

2. Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*)

3. Bahan Pemeriksaan IHK

Jaringan Hepar tikus

#### 4.6 Definisi Operasional

1. Pemberian per oral ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*)

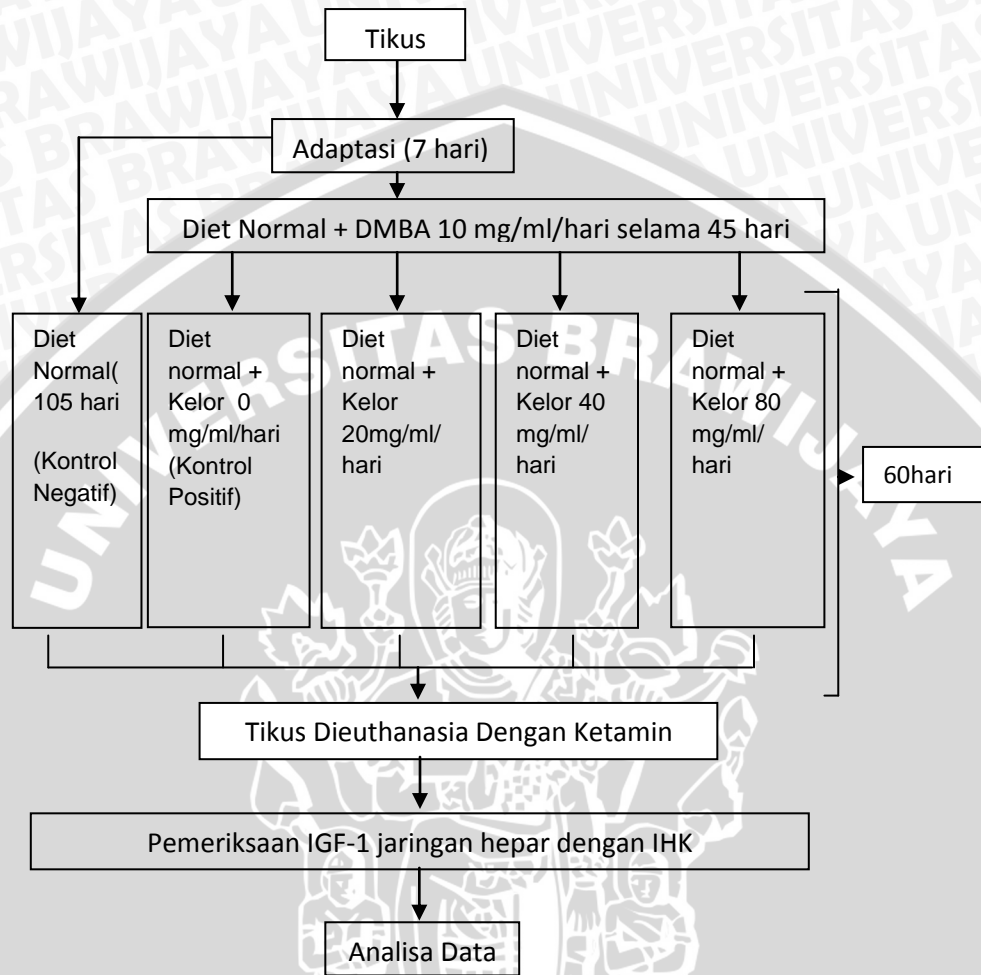
Perlakuan (Intervensi) adalah pemberian suplementasi ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) 0, 20, 40, 80 mg/hari dengan cara dimasukkan per oral dengan sonde (Indra, 2011).

2. IGF-1

Ekspresi IGF-1 dalam jaringan hepar diukur dengan metode IHK dari setiap tikus.

#### 4.7 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh pengetahuan mengenai efek ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap kadar IGF-1 hepar tikus (*Rattus norvegicus*) wistar dengan diet DMBA. Alur penelitian dapat dijelaskan melalui bagan berikut



**Gambar 4.1. Alur Penelitian**

#### 4.7.1 Adaptasi

Selama proses adaptasi, semua kelompok tikus diberi pakan standart (normal) yang terdiri dari comfeed PARS, tepung terigu, dan air. Masing-masing tikus mendapatkan 50 gram dari campuran bahan tersebut dan diberikan secara *ad libitum*.

#### 4.7.2 Induksi DMBA

Tikus wistar diberi 10 mg/hari DMBA per oral (sonde). Pemberian DMBA dilakukan selama 30 hari. Setelah 30 hari, 1 ekor tikus yang diberi DMBA tanpa ekstrak *Moringa oleifera* dibedah untuk melihat adanya perkembangan karsinogenesis pada jaringan hepar. (Indra, 2011)

#### 4.7.3 Perlakuan

##### 4.7.3.1 Proses Ekstraksi Daun Kelor (Sultana, 2009)

Proses ekstraksi menggunakan 42 gram tepung daun kelor (*Moringa oleifera*) kemudian rendam dengan methanol sampai volume 900 ml, dikocok 30 menit lalu di biarkan semalam. Ambil lapisan atas campuran metanol dengan zat aktif. Tunggu sampai aliran metanol berhenti menetes pada labu penampung (1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu). Hasil yang diperoleh kira-kira sepertiga dari bahan alam kering. Simpan dalam freezer.

##### 4.7.3.2 Pemeliharaan

Dalam masa ini, kelima kelompok tikus mendapat perlakuan yang berbeda. Tikus wistar yang ada dibagi menjadi 5 kelompok. Kelima kelompok tikus mendapat perlakuan yang berbeda. Untuk kelompok I (kontrol negatif), tikus hanya diberi pakan normal (standar) saja. Kelompok perlakuan II hingga V diberi diet dan induksi DMBA sebanyak 10 mg/hari dengan sonde per oral tiap jam 10 pagi selama 45 hari. Setelah itu, kelompok II diberi diet normal tanpa pemberian ekstrak methanol daun kelor. Sedangkan, kelompok III diberi ekstrak methanol daun kelor dengan disonde

per oral dengan dosis 20 mg/ml + diet normal per hari. Kelompok IV diberi ekstrak methanol daun kelor dengan disonde per oral dengan dosis 40 mg/ml + diet normal per hari. Kelompok V diberi ekstrak methanol daun kelor dengan disonde per oral dengan dosis 80 mg/ml + diet normal per hari. Semua ekstrak daun kelor di atas diberikan selama 60 hari, sedangkan pakan normal selama 105 hari. (Indra, 2011)

#### 4.7.3.3 Pembedahan

Pemeriksaan kadar IGF-1 dalam penelitian ini menggunakan jaringan hepar. Penelitian ini merupakan penelitian payung, yang meneliti efek ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar yang diinduksi 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) dengan parameter yang berbeda-beda, antara lain: TNF- $\alpha$ , IL-6, HSP-70, caspase-3, dan lain-lain. Karena itu, setelah 60 hari pemberian per oral daun kelor semua tikus dibunuh dengan cara disuntik ketamin. Kemudian abdomen dibuka, sebagian jaringan hepar diambil untuk diperiksa jumlah IGF-1. Sedangkan bangkai tikus yang sudah tidak dipakai dikubur dengan aman oleh petugas laboratorium.

#### 4.7.4 Pengecatan IHK (Yu, 2008)

Pertama jaringan yang akan dipakai didiseksi, sekitar 3-6 mikrometer, dan dideparafinisasi 2x, 5 menit masing dalam *xylene* 100%. Jaringan dihidrasi dengan 100% ethanol selama 3 menit, lalu dengan 80, 50, 30 %, masing-masing 3 menit. Slide ditutup dengan *blocking solution* lalu didiamkan 5 menit dengan suhu ruang, setelah itu dilepas. *Diluted primary antibody solution* diberikan untuk menutupi

sampel sepenuhnya. Slide diletakkan pada kontainer pelembab dan diinkubasikan selama semalam dalam lemari pendingin. Slide dicuci dengan PBS 3x selama 5 menit. Slide diinkubasikan dalam methanol menggunakan 0,3% hidrogen peroksida selama 30 menit dalam suhu ruangan. Slide dicuci kembali dengan PBS 3x selama 5 menit. Slide ditutup dengan Horse Radish Peroxidase conjugate diluted 1/300 to 1/600 dengan PBS kemudian diinkubasikan selama 45 menit dalam kontainer pelembab. Slide dicuci kembali dengan cara sama menggunakan PBS. Slide diinkubasikan dengan suhu ruang selama 5 menit, sehingga jika dilihat di bawah mikroskop terlihat warna coklat pada sel yang mengandung IGF-1. Slide dicuci dengan 2x air kran. Slide diberi *counterstain* dengan maeyer hematoxilin. Slide didehidrasikan sampel selama 2 menit 30% ethanol, 70% ethanol, 100% ethanol dan 100% *xylene*. Slide dicek di bawah mikroskop.

#### 4.8 Rencana Pengolahan dan Analisis Data

Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut.

1. Uji normalitas data: menunjukkan bahwa sebaran data penelitian ini normal ( $p > 0,05$ ). Karena itu, untuk penyajian digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Untuk uji hipotesisnya, digunakan uji parametrik.
2. Uji homogenitas varian: menunjukkan bahwa data yang diperoleh memiliki varian yang homogen ( $p = 0,053$ ), karena itu analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.

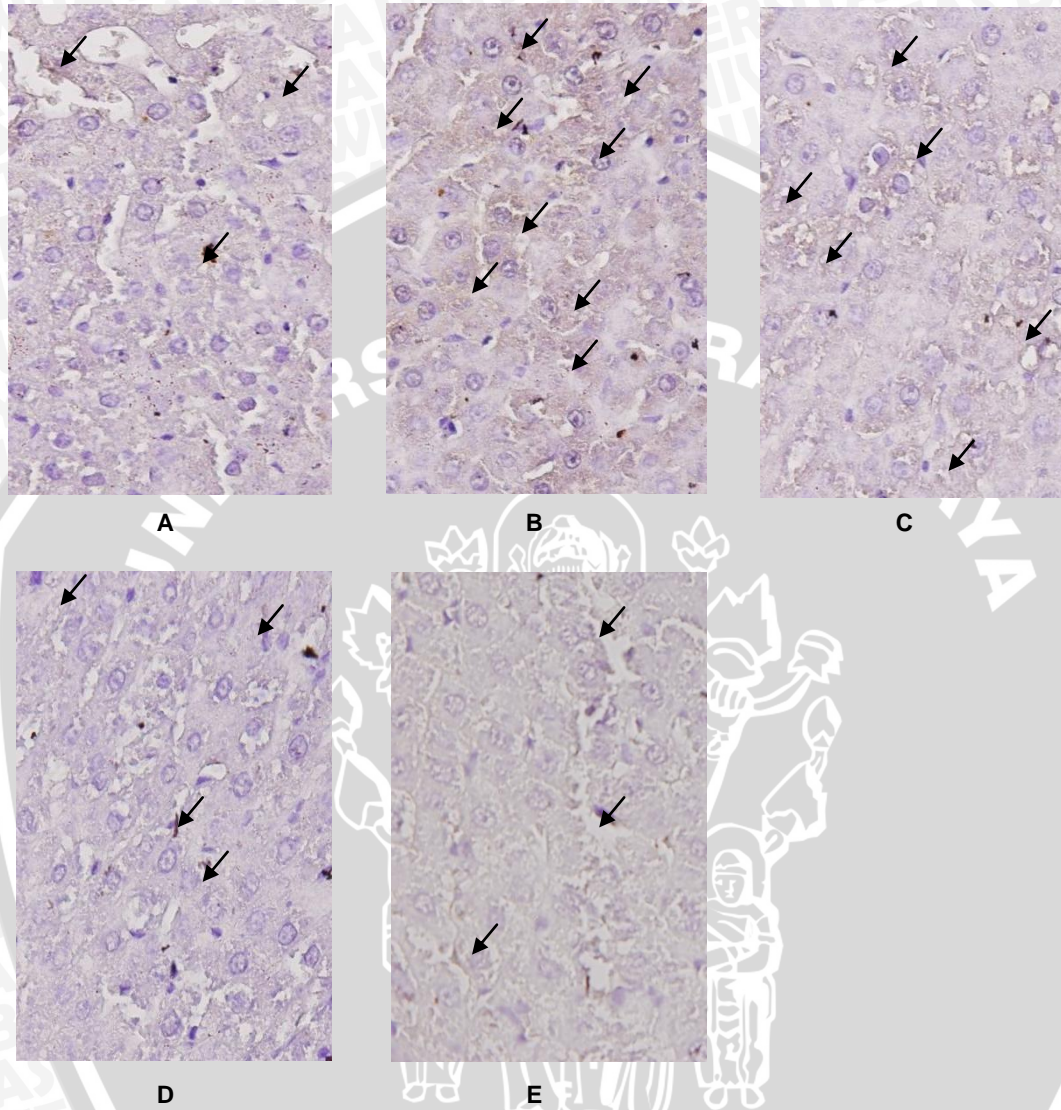
3. Uji *One-way* ANOVA: didapatkan nilai rata-rata kadar IGF-1 jaringan hepar dari kelima populasi memang berbeda ( $p=0,000$ ). Dengan demikian terdapat minimal 2 kelompok yang berbeda signifikan.
4. *Post Hoc test* (uji Tuckey HSD): Uji *Post Hoc* yang digunakan adalah uji Tuckey HSD dengan tingkat kemaknaan 95% ( $p < 0,05$ ).
5. *Correlation and regression test* : untuk menentukan variabel tergantung yang punya nilai normal setelah variabel bebas terukur.



**BAB 5****HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA**

Penelitian ini mengamati ekspresi IGF-1 pada jaringan hepar tikus dengan metode IHK. Kelompok dari tiap perlakuan dibedakan atas dosis pemberian ekstrak methanol daun kelor. Pada tiap-tiap kelompok perlakuan peneliti mengeksklusi 2 hasil kecuali pada kontrol positif karena rencana awal yang menggunakan 4 sampel pada tiap kelompok. 2 sampel dari kelompok kontrol positif telah dieutanasia dan dibedah lebih awal untuk melihat progresifitas kanker, namun ternyata belum nampak secara makros adanya kanker hepar selain munculnya perlemakan pada sampel.



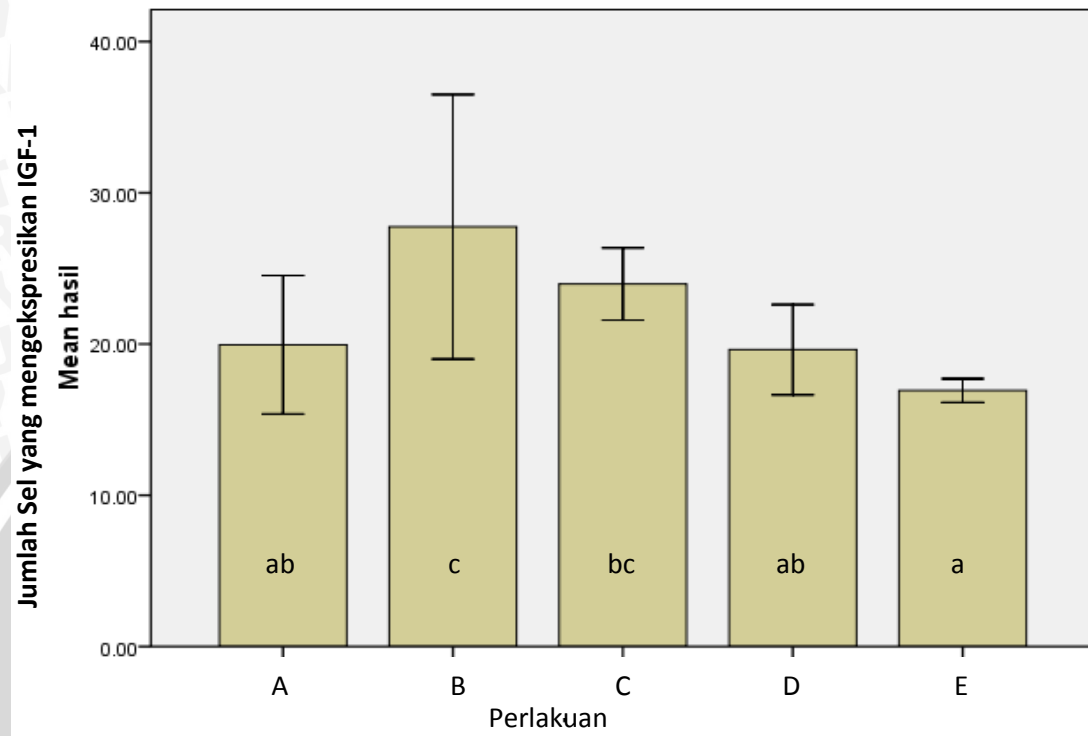


**Gambar 5.1** Gambaran Jaringan Hepar Tikus dengan Pengecatan IHK  
 A = Kontrol Negatif; B = Kontrol Positif (DMBA 10 mg/ml/hari); C= Perlakuan 1 (DMBA 10 mg/ml/hari + Kelor 20 mg/ml/hari); D = Perlakuan 2 (DMBA 10 mg/ml/hari + Kelor 40 mg/ml/hari); E = Perlakuan 3 (DMBA 10 mg/ml/hari + Kelor 80 mg/ml/hari). Bercak coklat yang ditunjuk berarti terdapat ekspresi IGF-1 pada jaringan hepar tikus dengan intensitas berbeda-beda setiap kelompok menunjukkan perbedaan intensitas sel yang mengekspresikan IGF-1 di jaringan hepar tikus.

**Tabel 5.1 Rata-Rata Sel yang Mengekspresikan IGF-1 pada Jaringan Hepar Tikus**

	Jumlah sel yang mengekspresikan IGF-1
Kontrol Negatif (K-)	19,95±2,88
Kontrol Positif (K+)	27,75±5,50
Perlakuan 1 (P1)	23,975±1,50
Perlakuan 2 (P2)	19,625±1,88
Perlakuan 3 (P3)	16,925±0,50





**Gambar 5.2** Jumlah ekspresi IGF-1 oleh sel hepar tikus dengan perlakuan berbagai konsentrasi ekstrak methanol daun kelor.

Tikus diberi perlakuan dengan 3 macam konsentrasi ekstrak methanol daun kelor. Sel yang mengekspresikan IGF-1 diamati dengan cara pengecatan IHK. A adalah tikus tanpa DMBA dan ekstrak methanol daun kelor. B adalah tikus dengan DMBA 10mg/ml/hari dan ekstrak methanol daun kelor. C adalah tikus dengan DMBA 10mg/ml/hari dan dosis kelor 20 mg/ml/hari. D adalah tikus dengan DMBA 10mg/ml/hari dan dosis kelor 40 mg/ml/hari. E adalah tikus dengan DMBA 10mg/ml/hari dan dosis kelor 80 mg/ml/hari. Notasi berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ )

Pada tabel 5.1 didapatkan rata-rata jumlah ekspresi IGF-1 pada jaringan hepar tikus tiap perlakuan, yaitu untuk kelompok kontrol negatif 19,95, kontrol positif 27,75, perlakuan 1 (dosis kelor 20 mg/ml/hari) 23,975, perlakuan 2 (dosis kelor 40 mg/ml/hari) 19,625, perlakuan 3 (dosis kelor 80 mg/ml/hari) 16,925. Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan dianalisis dengan menggunakan program komputer SPSS 16 untuk Windows 7.

Dengan program ini pertama-tama dilakukan uji normalitas data (lampiran 1). Untuk menguji normalitas distribusi data digunakan Shapiro-Wilk. Karena nilai p pada semua kelompok  $> 0.05$ , maka data ini normal.

Kemudian dilakukan uji homogenitas (lampiran 2) untuk mengetahui perbedaan varians antara kelompok data yang dibandingkan dan untuk mengetahui apakah varians data adalah sama. Untuk menguji homogenitas varian ini digunakan *Levene test*. Dari hasil *Levene test* tampak bahwa data berasal dari populasi-populasi yang memiliki varian sama ( $p=0,052$ ).

Karena hasil penelitian memiliki distribusi normal, dan varian homogen, maka dapat dilakukan uji *One-way ANOVA*. Uji ANOVA (Analysis of Variance) (Lampiran 3) dilakukan untuk menguji apakah kelima kelompok memiliki rata-rata (*mean*) yang sama. Dari hasil tes tersebut didapatkan nilai rata-rata jumlah ekspresi IGF-1 dari kelima populasi memang berbeda ( $p<0,05$ ). Jadi ada paling sedikit 2 kelompok yang berbeda secara signifikan.

Analisis dilanjutkan dengan *Post hoc test (Least Significant Difference)* untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan secara signifikan dari hasil tes ANOVA di atas. Untuk menilai hal tersebut digunakan *Tukey HSD test* (Lampiran 4). Dari uji *Tukey HSD Test* didapatkan perbedaan rata-rata jumlah ekspresi IGF-1 yang signifikan antara kelompok kontrol negatif dengan kontrol positif, kontrol positif dengan kelompok perlakuan 2 (dosis ekstrak methanol daun kelor 40mg/ml/hari) dan 3(dosis ekstrak methanol daun kelor 80mg/ml/hari), kelompok perlakuan 1(dosis

ekstrak methanol daun kelor 20mg/ml/hari) dengan kelompok perlakuan 3(dosis ekstrak methanol daun kelor 80mg/ml/hari).

Untuk melengkapi hasil dari uji *Tukey* digunakan *Homogeneous Subsets* (Lampiran 5) untuk mencari subset mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata (*Mean Difference*) yang tidak berbeda secara signifikan. Pada subset 1 menunjukkan tiga kelompok, yaitu kelompok perlakuan 2 (dosis ekstrak methanol daun kelor 40mg/ml/hari), kelompok perlakuan 3 (dosis ekstrak methanol daun kelor 80mg/ml/hari) dan kontrol negatif. Pada subset 2 terdapat tiga kelompok, yaitu kelompok perlakuan 2 (dosis ekstrak methanol daun kelor 40mg/ml/hari), kontrol negatif, dan kelompok perlakuan 1 (dosis ekstrak methanol daun kelor 20mg/ml/hari). Sedangkan pada subset 3 terdapat dua kelompok, yaitu kelompok perlakuan 1 (dosis ekstrak methanol daun kelor 20mg/ml/hari) dan kontrol positif. Hal ini menunjukkan ada 3 subset dengan perbedaan rata-rata yang bermakna.

Dari gambar 5.6 dapat dilihat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol negatif dan kontrol positif. Antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan juga ada beberapa perbedaan yang signifikan. Kelompok kontrol positif dengan perlakuan 2 (dosis ekstrak methanol daun kelor 40mg/ml/hari) menunjukkan adanya penurunan jumlah ekspresi IGF-1 yang signifikan. Kelompok kontrol positif dan perlakuan 3 (dosis ekstrak methanol daun kelor 80mg/ml/hari) juga menunjukkan penurunan yang bermakna. Sedangkan antara kelompok kontrol positif dan perlakuan 1 (dosis ekstrak methanol daun kelor 20mg/ml/hari) ada penurunan namun kurang signifikan.

Selanjutnya dilakukan uji korelasi *Pearson* (lampiran 6) untuk melihat hubungan antara perlakuan dan jumlah ekspresi IGF-1. Hasil yang didapat adalah signifikan ( $p=0,000$ ) dengan hasil korelasi  $-0,913$ , artinya 91,3% pemberian ekstrak methanol daun kelor berpengaruh pada penurunan jumlah ekspresi IGF-1.

Dengan uji regresi linier (lampiran 7) didapatkan  $R$   $0,913$ , menunjukkan hubungan variabel bergantung dan variabel bebas cukup tinggi. *Adjusted R square*  $0,834$  menyatakan bahwa 83,4% penurunan IGF-1 dipengaruhi quercetin.



## BAB 6

## PEMBAHASAN

*Hepatocellular carcinoma* (HCC) termasuk kanker paling mematikan dan sering dijumpai. Di Indonesia sendiri prevalensi HCC adalah 10-15 orang dari 100.000 penduduk (Fauzi, 2012). Salah satu etiologi HCC yang adalah intoksikasi kronis karsinogen (Ferenci *et al*, 2010). DMBA, zat kimia yang bersifat karsinogenik dapat ditemukan di alam sebagai hasil dari proses pembakaran yang tidak sempurna, seperti dalam asap tembakau, asap pembakaran kayu, bensin, minyak, batubara atau asap pembakaran daging (Budi dan Widyarini, 2010). Kontaminasi DMBA biasa terjadi melalui makanan atau peroral, inhalasi maupun kontak kulit. Induksi kanker hepar dengan DMBA tersebut erat kaitannya dengan jalur *Insulin Growth Factor* (IGF), yaitu melalui kerusakan oksidatif DNA. Ligan-ligan dari IGF ini merangsang proliferasi seluler dan menghambat apoptosis (Stuver, *et al.*, 2000), melalui kaskade fosforilasi yang nantinya akan menghasilkan diferensiasi dan proliferasi sel dan anti-apoptosis yang merupakan sifat dari kanker (Wu dan Zhu, 2011). Umumnya dari seluruh kasus kanker hati, hanya 5-15% kasus yang dapat dilakukan tindakan operasi reseksi dan memuaskan. Sisanya tidak dapat dilakukan reseksi hati karena sudah mengalami sirosis atau fungsi hatinya sudah menurun (Jurnalmedika, 2011). Salah satu modalitas herbal yang dapat dikembangkan adalah dari kelor (*Moringa oleifera*), Efek anti-oksidan yang dimiliki oleh kelor seringkali dikaitkan dengan potensi tanaman ini sebagai anti-kanker. Salah satu golongan

flavonoid yaitu quercetin merupakan antioksidan yang banyak terdapat di daun kelor. Penelitian ini mengamati apakah ekstrak methanol daun kelor yang mengandung quercetin dapat menekan progresifitas perubahan biomolekuler yang terjadi pada jaringan hepar tikus yang diinduksi DMBA.

Dalam penelitian ini didapatkan hubungan antara dosis ekstrak methanol daun kelor dengan jumlah ekspresi IGF-1 pada jaringan hepar tikus. Pada gambar 5.1 dapat dilihat bahwa pada tikus yang diinduksi DMBA terdapat peningkatan ekspresi IGF-1 dibanding tikus yang hanya mendapat diet normal, yaitu 27,75 dari awalnya 19,95. Artinya, DMBA dapat dipakai untuk menginduksi karsinogenesis pada hepar tikus. Selanjutnya, pada tikus yang diberi ekstrak kelor dengan dosis 20, 40, 80 mg/ml/hari, ada penurunan rata-rata jumlah ekspresi IGF-1 yaitu masing-masing 23,975; 19,625; 16,925. Hal ini berarti ekstrak methanol daun kelor dapat menekan ekspresi IGF-1 jaringan hepar pada tikus yang diinduksi DMBA. Dan dosis yang optimal dalam penelitian ini adalah 40 mg/ml/hari, sebab pada pemberian dosis 40 mg/ml/hari jumlah ekspresi IGF-1 jaringan sudah dapat turun mendekati normal. Pada dosis 80 mg/ml/hari jumlah ekspresi IGF-1 memang turun tapi masih dalam rentang normal. Terkait kerja quercetin sebagai antioksidan, hal ini dapat dijelaskan dengan teori kerja antioksidan yang dikemukakan oleh Boots (2006), bahwa kerja antioksidan non-enzim adalah secara langsung bereaksi dengan radikal bebas. Lewat proses ini antioksidan tersebut mendonorkan elektron ataupun proton pada radikal bebas sehingga membentuk bentuk yang lebih stabil. Namun hal ini akan membuat antioksidan tersebut mengalami oksidasi, sedangkan antioksidan hanya dapat bekerja dalam bentuknya yang tereduksi. Sehingga untuk dapat berfungsi



sebagai antioksidan kembali, bentukan tersebut harus dikonversi kembali menjadi bentuk awal yaitu bentukan tereduksi. Maka dalam tubuh harus terbentuk suatu jaringan kerja antioksidan yang bekerja mereduksi satu sama lain sehingga mengurangi terjadinya reaktivitas dari oksidasi antioksidan dan meningkatkan kembali antioksidan yang tereduksi, untuk menjaga keseimbangan oksidatif. Namun jika dilihat dari efek langsung quercetin meningkatkan IGFBP3, masih ada kemungkinan bahwa ekspresi IGF-1 akan turun secara *dose dependent*. Dalam hal ini perlu diteliti lebih lanjut tentang komponen-komponen antioksidan endogen apa yang mendukung kerja antioksidan khususnya quercetin dan efek kerusakan yang terjadi oleh quercetin yang telah teroksidasi jika tidak direduksi oleh antioksidan endogen lain.

Hasil serupa juga didapatkan pada penelitian oleh Vijayababu *et al.* (2006), namun mereka menggunakan kanker prostat sebagai acuan, dan pemberian quercetin dengan dosis 25, 50, 75, 100 $\mu$ M. Pada penelitian tersebut didapatkan hasil serupa, yaitu quercetin berfungsi menurunkan kadar IGF-1, IGF-2, IGF-1R dan meningkatkan ekspresi IGFBP-3. Giuliani *et al.* (2010) juga menuliskan hasil yang serupa dalam penelitiannya terhadap sel tiroid dengan quercetin dosis 1,25; 2,5; 5; 10; 20  $\mu$ M. Dikatakan bahwa quercetin dapat menurunkan pertumbuhan sel tiroid melalui inhibisi jalur PI3K-Akt kinase, dimana keduanya adalah jalur yang menimbulkan sifat anti-apoptosis pada sel yang mengalami keganasan (Le Roith dan Robert, 2003). Ada perbedaan yang cukup besar pada konsentrasi dosis yang dipakai pada penelitian-penelitian tersebut dengan penelitian kami, karena penelitian-penelitian tersebut murni menggunakan konsentrasi quercetin, sedangkan

penelitian kami menggunakan ekstrak methanol daun kelor yang mengandung quercetin.

Adapun dosis yang dipakai dalam penelitian dapat dikonversi dari dosis terhadap tikus ke dalam dosis terhadap manusia. Menurut penelitian Reagan-Shaw *et al* (2007), konversi tersebut melibatkan perhitungan berat rata-rata dan *body surface area* (BSA). Dalam penelitiannya ditemukan bahwa faktor konstanta untuk manusia adalah 37 untuk manusia dewasa dengan berat badan 60 kg dan BSA 1,6 m<sup>2</sup> dan untuk tikus adalah 6 dengan berat badan 0,15 kg dan BSA 0,025 m<sup>2</sup>. Dengan demikian dosis 20 mg/ml/hari untuk tikus dapat dikonversi menjadi  $20 \times 6/37 = 3,24$  mg/ml/hari. Sedangkan dosis 40 dan 80 mg/ml/hari dapat dikonversi menjadi masing-masing 6,48 mg/ml/hari dan 12,96 mg/ml/hari. Sedangkan untuk hewan coba yaitu tikus wistar (*rattus norvegicus*), memiliki panjang umur maksimal 3,8 tahun, tetapi dengan restriksi kalori yang baik dapat meningkat menjadi 4,6 tahun (Turturro *et al.*, 1999).

Induksi kanker dengan DMBA dimulai dengan metabolisme agen karsinogenesis, dalam hal ini adalah DMBA, menjadi reaktan elektrolit yang berikatan secara kovalen pada DNA sel. Munculnya ROS dan perubahan pada DNA tersebut mempunyai implikasi yang kuat dalam proses karsinogenesis pada umumnya (Vijayabaskaran *et al.*, 2010). Salah satu efek yang dapat dilihat dari inisiasi DMBA adalah peroksidasi lemak, termasuk diene terkonjugasi, lipid hidroperoksida dan MDA (Khan *et al.*, 2012). ROS menyebabkan modifikasi oksidatif basa DNA yang memicu mutasi gen menjadi karsinogenik. Hidroksi radikal dapat

menimbulkan mutasi titik yang selanjutnya akan memunculkan mutasi pada gen p53 (Pizzimenti *et al.*, 2010).

Sel yang normal memiliki protein p53 yang berfungsi mengatur jalur IGF-1. Sebenarnya p53 memiliki fungsi utama pertahanan dan pengawasan dari *germline* terhadap adanya kekurangan nutrisi pada sel dan kerusakan DNA. Misalnya dengan cara mengatur reseptor IGF-1. (Levine *et al.*, 2006). Regulasi p53 terhadap jalur IGF-1 antara lain dengan menginduksi ekspresi IGFBP3, yaitu protein yang mengikat IGF-1 dan mencegahnya untuk berikatan dengan reseptor IGF-1 dan secara langsung mematikan jalur IGF-1 dan menurunkan jumlah IGF-1 dalam jaringan (Feng, 2010 dan Wu dan Zhu, 2010). Namun jika protein tersebut bermutasi, regulasi IGF-1 akan menjadi gagal dan jumlah IGF-1 dalam jaringan akan meningkat (Feng, 2011 dan Maier *et al.* 2004). Selain itu, mutasi gen p53 mempunyai efek memperpanjang lama hidup dengan meniadakan sinyal pemendekan telomerase, dibuktikan bahwa tikus dengan protein p53 yang hiperaktif memiliki sifat resisten terhadap kanker namun lama hidup yang pendek dan sel yang memiliki fenotip penuaan dini (*early senescence*) (Maier *et al.* 2004). Pada penelitian lain, overekspresi dari IGF-1 pada kelenjar mammae menginduksi pertumbuhan dan hiperplasia epitel sehingga meningkatkan kecenderungan untuk terjadinya tumorigenesis yang spontan ataupun lewat induksi DMBA. Proliferasi sel karena IGF-1 menimbulkan peningkatan jumlah sel target karsinogen dan meningkatkan tumorigenesis oleh DMBA (deOstrovich, 2012). Dengan kata lain, muncul *vicious cycle* dimana DMBA meningkatkan ekspresi IGF-1 dan IGF-1 pada akhirnya juga akan meningkatkan kecenderungan untuk terjadi tumorigenesis karena DMBA.

Pemberian ekstrak daun kelor dapat menurunkan jumlah ekspresi IGF-1 dalam jaringan hepar tikus. Hal ini disebabkan aktivitas dari quercetin dalam ekstrak daun kelor yang memiliki sifat antioksidan dapat menangkal kerusakan DNA sel yang mengalami dampak radikal bebas. Dari kelompok flavonoid, quercetin paling poten untuk menangkal reaksi ROS termasuk  $O_2^-$  (Cushnie dan Lamb, 2005), dan RNS termasuk NO dan  $ONOO^-$  (Heijnen *et al*, 2001). Selain itu, quercetin juga menjadi penangkal yang bagus terhadap peroksidasi lemak (Boots *et al.*, 2006). Seperti yang telah kita ketahui peningkatan jumlah ekspresi IGF-1 disebabkan mutasi DNA termasuk gen p53 oleh ROS yang pada akhirnya menimbulkan peningkatan regulasi *growth factor* untuk proliferasi sel, termasuk IGF-1. Maka, dengan berkurangnya efek ROS oleh antioksidan quercetin, mutasi sel dapat diturunkan dan jumlah IGF-1 juga diturunkan.

Selain quercetin, senyawa flavonoid antioksidan tertinggi dalam daun kelor adalah kaempferol (Gerd, 2008). Kaempferol, diketahui memiliki efek antiinflamasi dengan supresi ekspresi iNOS, COX-2, MMP3 dan blok aktivasi TLR-4. Selain itu, kaempferol juga menghambat LPS-diinduksi-aktivasi NF-kB, p38 MAPK, C-Jun kinase, dan fosforilasi AKT (Park *et al.*, 2011). Dengan kata lain dapat menghambat ROS lewat menurunkan iNOS dan ekspresi TNF-alpha lewat modulasi NF-kappaB dan MAPK (Kim *et al.*, 2007). Jadi, ada probabilitas bahwa penurunan jumlah ekspresi IGF-1 jaringan juga disebabkan oleh adanya kaempferol dalam ekstrak daun kelor yang bertindak sebagai antioksidan dan mencegah kerusakan oleh ROS. Selain itu, kaempferol memiliki efek yang serupa dengan quercetin, yaitu modulasi MAPK dan fosforilasi AKT namun perbedaannya adalah kaempferol

menghambat secara langsung sedangkan quercetin melalui downregulasi dari IGF-1 itu sendiri.

IGF-1 erat kaitannya dengan GH, jalur IGF memiliki fungsi penting dalam metabolisme energi dan pembaharuan sel sebagai respon dari adanya nutrisi (Wu dan Zhu, 2011). Salah satu contoh peranan IGF-1 adalah media di adaptasi otot terhadap perubahan beban dengan kesimpulan bahwapada penambahan beban myofiber meningkatkan ekspresi IGF-1. Bekerja sebagai *growth factor autocrine* dan *paracrine*, IGF-1 menstimulasi proses anabolik myofiber. Sebagai *paracrine* IGF-1 juga menstimulasi sel-sel sekitar untuk memasuki fase proliferasi yang pada akhirnya mengalami fusi dengan myofiber sehingga mempertahankan myofiber myonuclei ratio pada myofiber yang membesar (Adams, 1998). Namun pemberian IGF-1 yang berlebih dapat meniadakan proteksi terhadap karsinogenesis sekalipun dengan adanya restriksi kalori (Vatten *et al*,2002). Karena keterkaitannya dengan GH, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan metode penelitian yang sama pada umur tikus yang berbeda, terutama pada masa-masa maturitas seksual untuk mengetahui apakah ada perubahan hasil penelitian karena GH juga dipengaruhi oleh umur dan fungsi seksual, selain itu apakah pemakaian ekstrak methanol daun kelor jangka panjang dapat menekan pertumbuhan tikus.

Dengan penurunan jumlah ekspresi IGF-1 dalam tubuh hingga batas normal, maka kaskade jalur-jalur lain di bawah IGF-1 seperti PI3K dan MAPK akan menurun juga. Jalur PI3K adalah jalur yang memiliki banyak output enzim, protein, dan faktor yang merancang sifat sel menjadi antiapoptosis. Hal ini diwujudkan lewat penurunan aktivitas caspase-9 dan peningkatan aktivitas Nfkappa-B, dimana

caspase 9 adalah salah satu faktor apoptosis dan Nfkappa-B adalah faktor *cell survival*. Sedangkan jalur MAPK memunculkan sifat proliferaatif sel lewat kaskade onkogen Ras yang selanjutnya akan memodulasi proses translasi DNA sel. Lewat dua jalur besar tersebut timbul sifat karsinogenesis sel, yaitu antiproliferaatif dan apoptosis. Dengan penurunan jumlah IGF-1 jaringan, maka kedua jalur besar tersebut juga akan mengalami penurunan, sehingga sifat karsinogenesis dapat diturunkan pula. Selain itu, efek quercetin juga meningkatkan sifat pro apoptosis lewat upregulasi Bax protein dan caspase 3. Jadi lewat proses menurunkan jumlah IGF-1 dan sifat pro apoptosis dengan ekstrak methanol daun kelor pada kelompok perlakuan, proses karsinogenesis yang sedang berlangsung dapat disupresi. Dapat dilakukan penelitian serupa dengan metode ELISA sehingga kadar IGF-1 dalam serum bisa diukur dan dibandingkan antara IGF-1 yang terikat protein plasma sehingga tidak dapat masuk ke jaringan dan *free IGF-1* yang dapat masuk ke jaringan, juga agar dapat dikonversikan dari kadar IGF-1 dalam serum tikus ke serum manusia. Pada penelitian ini digunakan DMBA sebagai inisiator, belum ada data yang mengatakan apakah dampak kerusakan sel oleh DMBA tersebut adalah reversibel atau tidak, namun pada penelitian Terzaghi *et al* (1983) yang menggunakan DMBA sebagai inisiator dan 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) sebagai promotor karsinogenesis, didapati bahwa tanpa pengobatan terhadap promotor, beberapa fenotip yang mengalami perubahan sel dengan sendirinya dapat berubah kembali menjadi normal dan/atau berhenti berreplikasi. Pada akhirnya, perlu diadakan *clinical trial* sehingga ekstrak methanol daun kelor dapat dipakai sebagai obat pada manusia.

**BAB 7****PENUTUP****7.1 Kesimpulan**

1. Pemberian ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan ekspresi IGF-1 pada jaringan hepar tikus (*Rattus norvegicus*) wistar yang diinduksi 7,12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA).
2. Dosis optimal dari ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) yang diperlukan untuk menurunkan ekspresi IGF-1 pada jaringan hepar tikus (*Rattus norvegicus*) wistar yang diinduksi 7,12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) adalah 40 mg/ml/hari.

**7.2 Saran**

1. Perlu dilakukan penelitian untuk mengukur penurunan kadar IGF-1 pada serum tikus (*Rattus norvegicus*) wistar yang diinduksi 7,12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) setelah pemberian ekstrak methanol daun kelor, dengan metode ELISA agar dapat dikonversikan ke kadar IGF-1 pada serum manusia.
2. Perlu dilakukan penelitian untuk membuktikan teori bahwa kinerja antioksidan eksogen (misalnya quercetin) juga memerlukan antioksidan endogen, dengan cara menilai ekspresi IGF-1 jaringan hepar tikus (*Rattus norvegicus*) wistar yang

diinduksi DMBA dengan pemberian ekstrak methanol daun kelor pada dosis lebih dari 80 mg/ml/hari.

3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan metode penelitian yang sama pada umur tikus yang berbeda, terutama pada masa-masa maturitas seksual untuk mengetahui apakah ada perubahan hasil penelitian karena hormon juga dipengaruhi oleh umur dan fungsi seksual.
4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut, pada tikus (*Rattus norvegicus*) wistar yang diinduksi DMBA setelah pemberian ekstrak methanol daun kelor apakah ada penekanan secara berlebihan pada aksis GH-IGF-1 sehingga tikus tidak dapat tumbuh secara maksimal.
5. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dalam tahap-tahap *drugs approval*, melalui tahap preklinis yaitu tes pada populasi hewan coba selama 6,5 tahun untuk mengetahui *safety*, *biological activity* dan formulasi obat, fase 1 yaitu tes pada 20-100 manusia sehat selama 1,5 tahun untuk menentukan *safety* dan dosis, fase 2 yaitu tes pada 100-500 pasien selama 2 tahun untuk evaluasi *efficacy* dan mencari efek samping, dan tahap 3 yaitu tes pada 1000-5000 pasien selama 3,5 tahun untuk menetapkan *efficacy*, dan monitor efek dari penggunaan yang lama.



## Daftar Pustaka

- Adams GR. 1998. Role of insulin-like growth factor-I in the regulation of skeletal muscle adaptation to increased loading. Department of Physiology and Biophysics, University of California, Irvine, USA. *Exercise and Sport Sciences Reviews* [1998, 26:31-60]
- Atawodi SE, Atawodi JC, Idakwo GA, Pfundstein B, Haubner R, Wurtele G, Bartsch H, and Owen RW.2010. Journal of Medicinal Food. June 2010, 13(3): 710-716. doi:10.1089/jmf.2009.0057. *Evaluation of the polyphenol content and antioxidant properties of methanol extracts of the leaves, stem, and root barks of Moringa oleifera Lam.(abstract)*
- Boots AW. 2006. *Health Effects of Quercetin : from Mechanism to Nutraceutical*.Thesis. Universitaire Pers Maastricht.
- Boots AW, Haenen GR, Bast A. 2008. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol.* 2008 May 13;585(2-3):325-37(abstract)
- Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, Christensen E, Pagliaro L, Colombo M, Rodés J, et al. J Hepatol 2001; 35:421-430. *Clinical management of hepatocellular carcinoma: conclusions of the Barcelona- 2000 EASL conference* IDIBAPS: Barcelona.
- Bruix S, Sherman, M. 2005. Hepatology, 42, 5. *Management of Hepatocellular Carcinoma*
- Budi MRT, Widyarini S.2010. *Dampak Induksi Karsinogenesis Glandula Mammarum dengan 7, 12-dimetilbenz(a)antrasen terhadap Gambaran Histopatologis Lambung Tikus Sprague Dawley*.UGM:Jogjakarta
- Buhler D, Miranda C.2000. Antioxidant Activities of Flavonoids. 2000. <http://lpi.oregonstate.edu/f-w00/flavonoid.html>
- Bustin SA, Dorudi S, Phillips SM, Feakins RM, Jenkins PJ. 2002. Tumour Biol 2002;23:130-8. *Local expressions of insulin-like growth factor-I affects angiogenesis in colorectal cancer.* (abstract)
- Calderón-Montaña JM, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C, López-Lázaro M. 2011. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev Med Chem.* 2011 Apr;11(4):298-344. Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, no 2, 41012, Sevilla, Spain.

- Coppin. 2008. A Study Of The Nutritional And Medicinal Values Of *Moringaoleifera* Leaves From Sub-Saharan Africa: Ghana, Rwanda, Senegal And Zambia. M.Sc. thesis, Rutgers University-Graduate School-New Brunswick, New Brunswick.
- Currier N , Solomon SE, Demicco EG, Chang DLF, Farago M, Ying H, et al. 2005. Toxicologic Pathology. *Oncogenic Signaling Pathways Activated in DMBA-Induced Mouse Mammary Tumors.*, 33:726–737, 2005. David C. Seldin, 650 Albany Street, Boston, Massachusetts 02118
- Cushnie TP dan Lamb AJ. 2005. *Antimicrobial activity of Flavonoids.* Int J Antimicrob Agents. 26:343-356
- de Ostrovich KK, Lambertz I, Colby JK, Tian J, Rundhaug JE, Johnston D, Conti CJ, DiGiovanni J, Fuchs-Young R. 2008. Paracrine overexpression of insulin-like growth factor-1 enhances mammary tumorigenesis in vivo. *Am J Pathol.* 173(3):824–834.
- Diehl JA. 2002. *Cancer Biol Ther* 2002; 1:226-31. *Cycling to cancer with cyclin D1.*
- Ehrlich SD. 2011. NMD. *Quercetin.* <http://www.umm.edu/altmed/articles/quercetin-000322.htm>
- El Serag HB, Marrero JA, Rudolph LK, Reddy R. 2008. *Gastroenterology* 134:1752–1763. *Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma.*
- Ellis H. 2006. Clinical Anatomy p93. *The gastrointestinal adnexae: liver, gall-bladder and its ducts, pancreas and spleen.* Blackwell Publishing: Victoria
- Esnaola NF, Mirza N, Lauwers GY. 2003. *Ann Surg*; 238:711-719 Comparison of clinicopathologic characteristics and outcomes after resection in patients with hepatocellular carcinoma treated in the United States, France and Japan. Pubmed Central: USA
- Fahey JW. 2005. *Trees for Life Journal* 1:5. *Moringa oleifera: A Review of The Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophylatic Properties Part 1.* Johns Hopkins School of Medicine: Maryland
- Fauzi A. 2012. *Epidemi-Prevalensi Penyakit Hepatitis Virus di Indonesia : Mencegah Lebih Baik Daripada Mengobati.* *Epidemi.* Pondok Indah Healthcare Group : Jakarta

- Feng Z. 2010. p53 Regulation of the IGF-1/AKT/mTOR Pathways and the Endosomal Compartment. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 February; 2(2): a001057
- Ferenci P, Fried M, Labrecque D, Bruix J, Sherman M, Omata M, *et al.* 2010. Journal of Clinical Gastroenterology. *Hepatocellular Carcinoma (HCC): A Global Perspective.* 4 - pp 239-245.
- Foidl N, Makkar HPS, Becker K. 2001. The Miracle Tree/ The Multiple Attributes of Moringa .*The Potential of Moringa oleifera for Agricultural and Industrial Uses.* CTA: USA.
- Gerd B, Sansbury LB, Albert PS, Cross AJ, Kahle L, Ashby J, Slattery ML, Caan B, Paskett E, Iber F, Kikendall JW, Lance P, Daston C, Marshall JR, Schatzkin A, Lanza E. 2008. *Dietary Flavonoids and Colorectal Adenoma Recurrence in the Polyp Prevention Trial.* Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention. Frederick:Laboratory of Cancer Prevention, National Cancer Institute-Frederick 17(6): 1344–1353.
- Giuliani C, Noguchi Y, Harii N, Napolitano G, Tatone D, Bucci I, Piantelli M, Monaco F, Kohn LD. 2008. The Flavonoid Quercetin Regulates Growth and Gene Expression in Rat FRTL-5 Thyroid Cells. *Endocrinology* 149(1):84–92
- Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Venere M, Ditullio RA Jr, Kastrinakis NG, Levy B, Kletsas D, Yoneta A, Herlyn M, Kittas C, Halazonetis TD. 2005. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* J;434:907–13
- Grimberg A. 2003. Mechanism by which IGF-1 May Promote Cancer. *Landes Bioscience . Cancer Biology and Therapy* 2:6, 630-635.
- Heijnen CG, Haenen GR, van Acker FA, van der Vijgh WJ, Bast A. 2001. Flavonoids as Peroxynitrite Scavengers : The Role of The Hydroxyl Groups. *Toxicol in vitro* 15:3-16
- Indra MR, Hernowati TE, Satuman. 2011. *Pengaruh Ekstrak Daun Kelor (Moringa Oleifera) Terhadap Efek Karsinogenik Polutan 7,12 Dimethyl Benz(A)Nthracene (Dmba) Pada Tikus Wistar Melalui Penghambatan Aktifitas Telomerase Dan Induksi Apoptosis.* UB:Malang

- Jed W. Fahey.2005. Trees for Life Journal 2005, 1:5. *Moringa oleifera: A Review of the Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophylactic Properties.*
- Junqueira LC, Carneiro J. 2005. Basic Histology Text and Atlas 11<sup>th</sup> edition. *Hepatology.* McGrawHill:New York
- Jurnalmedika.2011.Jurnalmedika Edisi No 10 Vol XXXVII. *Kolaborasi Biomarker dan Pencitraan dalam Diagnosis Karsinoma Hepatoselular*
- Kew MC. 2011. Journal of Gastroenterology and Hepatology Foundation. *Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma.* Blackwell Publishing :Victoria (abstract)
- Khan A, Thapliyal RP, Chauhan SK. 2012. Antioxidant Impacts of *Boerhaavia diffusa* & Black caraway Oil on Conjugated Diene, Lipid Hydroperoxidation & MDA Content in DMBA-Induced Hypercholesterolemia in Rats. *Int J of Pharmacy and Pharmaceutical Science* 4(3):600-607
- Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE.2000. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev*, 21:215-244. Vol 2 (4): 214-222
- Kim HK, Park HR, Lee JS, Chung TS, Chung HY, Chung J. 2007. Down-regulation of iNOS and TNF-alpha expression by kaempferol via NF-kappaB inactivation in aged rat gingival tissues. *Biogerontology* 8(4):399-408. Epub 2007 Feb 3. Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Pusan National University, Busan, 602-739, Korea.
- Kumar V, Cotran R, Robbins SL.2004. Buku Ajar Patologi Edisi 7 hal 211. *Hepatocarcinoma.* Jakarta: penerbit buku kedokteran EGC
- Kumar V, Fausto N, Abbas A.2003. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease* (7th ed.). Saunders. pp. 914-7.
- LeRoith D, Roberts CT Jr.2003. The insulin-like growth factor system and cancer. National Institutes of Health: Bethesda. *Cancer Lett* 10;195(2):127-37
- Levine AJ, Feng Z, Mak TW, You H, Jin S. 2006. Coordination and Communication between the p53 and IGF-1-AKT-TOR Signal Transduction Pathways. *Genes & Dev.* 20 :267-275

- Li Y, Martin RCG. 2010. Herbal Medicine and Hepatocellular Carcinoma: Applications and Challenges. University of Louisville School of Medicine: Louisville
- Liu S, Chan KW, Wang B, Qiao L. 2011. The American Journal of Gastroenterology. Fibrolamellar Hepatocellular Carcinoma
- Maier B, Gluba W, Bernier B, Turner T, Mohammad K, Guise T, Sutherland A, Thorner M, Scrable H. 2004. Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes & Dev.* 18: 306-319
- Manoharan S, Balakrishnan S, Menon V P, Alias L M, Reena A R. 2009. Chemopreventive efficacy of curcumin and piperine during 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. Singapore Med: Singapore. Singapore Med. J. **50** (2) : 139 (abstract)
- Manziona L, Grimaldi AM, Romano R, Ferrara D, Dinota A. 2008. Oncology Reviews Hepatocarcinoma: from pathogenic mechanisms to target therapy.
- Marrero JA, El-Serag HB. 2010. Hepatology. *Alpha-fetoprotein should be included in the hepatocellular carcinoma surveillance guidelines of the american association for the study of liver diseases.* University of Michigan: Michigan
- Marrero JA, Kudo M, Bronowicki JP. 2010. The challenge of prognosis and staging for hepatocellular carcinoma. University of Michigan: Michigan. *Oncologist* 4:23-33
- Mélanie BROIN. 2007. Moringanews Network. *The nutritional value of Moringa oleifera Lam. leaves: what can we learn from figures?*
- Miean KH, Mohamed S. 2004. Moringa oleifera: Flavonoid (Myricetin, Quercetin, leaf extracts on human multiple myeloma cell lines. Academic Journal: Chennai
- Miean KH, Mohamed S. 2001. Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants. University Putra Malaysia :Serdang *Selangor. J Agric Food Chem* 49(6):3106-12
- Muto T, Takasaki S, Takahashi H, Hana H, Kanai Y, Wakui S. 2003. Initial changes of hepatic glycogen granules and glycogen phosphorylase  $\alpha$  after exposure to 7, 12-dimethylbenz ( $\alpha$ )anthracene in rats. *Japan Toxicol Pathol* 16(2): 153-160. (abstract)
- Nair U, Bartsch H, Nair J. 2003. Prevention of degenerative diseases; clues from studies investigating oxidative stress. Oxford Univ Press: Brussels. *Mutagenesis*, **18**:477-483

Omata M, Lesmana LA, Tateishi R, Chen PJ, Lin SM, Yoshida H, *et al.*,2010. Asian Pacific Association for the Study of the Liver consensus recommendations on hepatocellular carcinoma. 2010 *Hepatology* 4(2): 439–474.

Park SE, Sapkota K, Kim S, Kim H, Kim SJ.2011. Kaempferol acts through mitogen-activated protein kinases and protein kinase B/AKT to elicit protection in a model of neuroinflammation in BV2 microglial cells. *Br J Pharmacol.* 2011 Oct;164(3):1008-25. Department of Biotechnology, Chosun University, Gwangju, Korea. (abstract)

Parvathy MVS, Umamaheswari A.2007.Cytotoxic effect of moringa oleifera. *Trends in medical research* 2(1):44-50

Pizzimenti S, Toaldo C, Pettazzoni P, Dianzani MU, Barrera G. 2010. The “Two-Faced” Effects of Reactive Oxygen Species and the Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxynonenal in THE Hallmarks of Cancer. *Cancers* 2,338-363

Pollak M, Schernhammer ES, Hankinson SE. 2004. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nature Rev Cancer*, 4:505-518.

Pollak M.2008. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nature Rev Cancer*, 8:915-928.

Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N.2007. Dose translation from animal to human studies. *FASEB J.* 22, 659–66.

Sakowski SA, Schuyler AD, Feldman EI. 2009. Insulin-like growth factor-I for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler.* 2009 April; 10(2): 63–73.

Scharf JG, Dombrowski F, Ramadori G.2001. The IGF axis and hepatocarcinogenesis. *Mol Pathol J*, 54:138-144

Solimun. 2001. *Diktat Metodologi Penelitian LKIP dan PKM Kelompok Agrokompleks*. Malang: Universitas Brawijaya.

Spengler U. Hepatology-A Clinical Textbook chap 21:305-306.2005. *Diagnosis, Prognosis & Therapy*

Stuver SO, Kuper H, Tzonou A, Lagiou P, Spanos E, Hsieh CC, *et al.* 2000. Insulin-Like Growth Factor 1 In Hepatocellular Carcinoma And Metastatic Liver Cancer In Men. *Int J Cancer* 87(1):118-21.Harvard school of public health:Boston

- Sultana B, Anwar F, Ashraf M. 2009. *Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts*. *Molecules* 2009, 14, 2167-2180. Molecules Open Access
- Tang SH, Yang DH, Huang W, Zhou M, Zhou HK, Lu XH, Ye G. 2006. Differential promoter usage for insulin-like growth factor-II gene in Chinese hepatocellular carcinoma with hepatitis B virus infection. *Cancer Detect Prev* 2006, 30:192-203.
- Terzaghi M, Klein Szanto A, Nettesheim P. 1983. *Effect of the promoter 12-O-tetradecanolyphorbol-13- acetate on the evolution of carcinogen-altered cell populations in tracheas initiated with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene*. *Cancer Res* 43 :1461-1466.
- Turturro A, Witt WW, Lewis S, Hass BS, Lipman RD, Hart RW. 1999. Growth curves and survival characteristics of the animals used in the Biomarkers of Aging Program. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1999 Nov;54(11):B492-501. Division of Biometry and Risk Assessment, National Center for Toxicological Research, Food and Drug Administration, Jefferson, Arkansas 72079-9502, USA.
- Vatten LJ, Nilsen ST, Odegard RA, Romundstad PR, Austgulen R. 2002. Insulin-like growth factor-I and leptin in umbilical cord plasma and infant birth size at term. *Pediatrics*, 109:1131-1135.
- Vijayababu MR, Arunkumar A, Kanagaraj P, Arunakaran J. 2006. *Effects of quercetin on insulin-like growth factors (IGFs) and their binding protein-3 (IGFBP-3) secretion and induction of apoptosis in human prostate cancer cells*. University of Madras: *Chennai Journal of Carcinogenesis* 2006, 5:10
- Vijayabaskaran M, Yuvaraja KR, Babu G, Sivakumar P, Perumal P, Jayakar B. 2010. Hepatoprotective And Antioxidant Activity Of *Symplocos Racemosa* Bark Extract On Dmba Induced Hepatocellular Carcinoma In Rats. *Inter J Curr Trends Sci Tech*, 1(3): 147–158
- Wong CM, Ng IOL. 2007. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver International* Vol 28, 2, p 160-174
- Wu J, Zhu AX. 2011. Targeting insulin-like growth factor axis in hepatocellular carcinoma. *Biomed Central. Journal of Hematology & Oncology* 2011, 4:30

Yang SY, Winslet M.2011. The IGF system in carcinogenesis and its implication for cancer therapy. *Multimed. Current Oncology J (18) :6*

Yu L, Saile K, Swartz CD, He H, Zheng X, Kissling GE, Di X, Lucas S, Robboy SJ, Dixon D. 2008. Differential Expression of Receptor Tyrosine Kinases (RTKs) and IGF-I Pathway Activation in Human Uterine Leiomyomas. *Mol Med. 2008 May-Jun; 14(5-6): 264–275.*





**Lampiran 1 Uji Normalitas Data**

Tests of Normality							
Perlakuan		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
hasil	kontrol negatif	.188	4	.	.980	4	.904
	kontrol positif	.217	4	.	.918	4	.524
	Kelor 20 mg/ml/hari	.177	4	.	.995	4	.980
	Kelor 40 mg/ml/hari	.260	4	.	.899	4	.427
	Kelor 80 mg/ml/hari	.306	4	.	.777	4	.066

a. Lilliefors Significance Correction

**Lampiran 2 Uji Homogenitas Data**

**Test of Homogeneity of Variances**

hasil

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.024	4	15	.052

**Lampiran 3 Uji Anova**

**ANOVA**

hasil	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	287.727	4	71.932	8.078	.001
Within Groups	133.562	15	8.904		
Total	421.289	19			

Lampiran 4 Uji Post Hoc

Multiple Comparisons

hasil  
Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol negatif	kontrol positif	-7.80000*	2.11000	.016	-14.3155	-1.2845
	Kelor 20 mg/ml/hari	-4.02500	2.11000	.355	-10.5405	2.4905
	Kelor 40 mg/ml/hari	.32500	2.11000	1.000	-6.1905	6.8405
	Kelor 80 mg/ml/hari	3.02500	2.11000	.617	-3.4905	9.5405
kontrol positif	kontrol negatif	7.80000*	2.11000	.016	1.2845	14.3155
	Kelor 20 mg/ml/hari	3.77500	2.11000	.415	-2.7405	10.2905
	Kelor 40 mg/ml/hari	8.12500*	2.11000	.012	1.6095	14.6405
	Kelor 80 mg/ml/hari	10.82500*	2.11000	.001	4.3095	17.3405
Kelor 20 mg/ml/hari	kontrol negatif	4.02500	2.11000	.355	-2.4905	10.5405
	kontrol positif	-3.77500	2.11000	.415	-10.2905	2.7405
	Kelor 40 mg/ml/hari	4.35000	2.11000	.286	-2.1655	10.8655
	Kelor 80 mg/ml/hari	7.05000*	2.11000	.031	.5345	13.5655
Kelor 40 mg/ml/hari	kontrol negatif	-.32500	2.11000	1.000	-6.8405	6.1905
	kontrol positif	-8.12500*	2.11000	.012	-14.6405	-1.6095
	Kelor 20 mg/ml/hari	-4.35000	2.11000	.286	-10.8655	2.1655
	Kelor 80 mg/ml/hari	2.70000	2.11000	.707	-3.8155	9.2155
Kelor 80 mg/ml/hari	kontrol negatif	-3.02500	2.11000	.617	-9.5405	3.4905
	kontrol positif	-10.82500*	2.11000	.001	-17.3405	-4.3095
	Kelor 20 mg/ml/hari	-7.05000*	2.11000	.031	-13.5655	-.5345
	Kelor 40 mg/ml/hari	-2.70000	2.11000	.707	-9.2155	3.8155

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

**Lampiran 5 Homogenous Subsets**

**hasil**

Tukey HSD

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
kelor 80 mg/ml/hari	4	16.9250		
kelor 40 mg/ml/hari	4	19.6250	19.6250	
kontrol negatif	4	19.9500	19.9500	
kelor 20 mg/ml/hari	4		23.9750	23.9750
kontrol positif	4			27.7500
Sig.		.617	.286	.415

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

**Lampiran 6 Uji Korelasi**

**Correlations**

		perlakuan	hasil
perlakuan	Pearson Correlation	1	-.913**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	12	12
hasil	Pearson Correlation	-.913**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	12	12

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Lampiran 7 Uji Regresi

Model Summary<sup>b</sup>

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.913 <sup>a</sup>	.834	.817	1.40846

a. Predictors: (Constant), perlakuan

b. Dependent Variable: hasil

ANOVA<sup>b</sup>

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	99.405	1	99.405	50.110	.000 <sup>a</sup>
	Residual	19.838	10	1.984		
	Total	119.243	11			

a. Predictors: (Constant), perlakuan

b. Dependent Variable: hasil



## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Andreas N Moekoe

NIM : 0910710032

Program Studi : Program Studi Pendidikan Dokter

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 17 Oktober 2012

Yang membuat pernyataan

Andreas N Moekoe

NIM. 0910710032