

**PENGARUH EKSTRAK METANOL DAUN KELOR (*Moringa oleifera*)
TERHADAP PENGHAMBATAN AKTIVASI NF- κ B PADA HEPAR
TIKUS WISTAR MODEL *HEPATOCELLULAR CARCINOMA (HCC)*
YANG DIINDUKSI DMBA (*7,12 dimethylbenz(a)anthracene*)**

TUGAS AKHIR

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



Oleh :
KATARINA TRI OKTAVIANA
0910710089

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2012**

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**PENGARUH EKSTRAK METANOL DAUN KELOR (*Moringa oleifera*)
TERHADAP PENGHAMBATAN AKTIVASI NF- κ B PADA HEPAR
TIKUS WISTAR MODEL *HEPATOCELLULAR CARCINOMA (HCC)*
YANG DIINDUKSI DMBA (7,12 *dimethylbenz(a)anthracene*)**

Oleh :

Katarina Tri Oktaviana

NIM: 0910710089

Telah diuji pada

Hari : Jumat

Tanggal : 23 November 2012

Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I

Dr. dr. Tinny Endang H., SpPK (K)

NIP. 19521225 198002 2 001

Penguji II/Pembimbing I

Penguji III/Pembimbing II

Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS.

NIP.19500525 198002 1 001

Dr. dr. Retty Ratnawati, MSc.

NIP. 19550201 198503 2 001

Mengetahui:

Ketua Jurusan Kedokteran

Prof. Dr. dr. Teguh W. Sardjono, DMT&H, MSc, SpParK

NIP: 19520410 198002 1 001

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yesus Kristus atas segala kasih karunia dan berkat-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul “Pengaruh ekstrak metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap penghambatan aktivasi NF- κ B pada hepar tikus wistar model *Hepatocellular carcinoma (HCC)* yang diinduksi DMBA (7,12 dimethylbenz(a)anthracene)” untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar sarjana kedokteran.

Pada penulisan tugas akhir ini, saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Dr. dr. Karyono Mintaroem, SpPA selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS selaku dosen pembimbing pertama atas segala kesabaran, saran dan ketelitiannya agar terselesainya tugas akhir ini.
3. Dr. Dr. Retty Ratnawati, MSc selaku dosen pembimbing kedua atas saran yang bermanfaat bagi terselesainya tugas akhir ini.
4. Dr. dr. Tinny Endang H, SpPK (K) selaku penguji tugas akhir atas ketelitiannya yang luar biasa dan masukan-masukan yang sangat membangun sehingga tugas akhir ini dapat terselesaikan dengan baik.
5. Segenap Anggota Tim Pengelola Tugas Akhir Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
6. Segenap Staf Laboratorium Fisiologi Kedokteran, terutama Mas Harris mbak Umi, Pak Satuman, mbak Kiky, mas Didin, dan Mas Budi, untuk segala bantuan yang sangat berharga dalam proses pembuatan tugas akhir ini.

7. Rekan sepenelitian Kelor yaitu, Anis, Yolan, mbak Firdah, Mayya, Hendra, Mucus, Heidi-Hilda, Aan, Riza, Ivan, Cia, Ayaz, dan Radhit untuk kerja sama yang telah terjalin selama masa penelitian dan proses pembuatan tugas akhir ini.
8. Papa dan mama yang telah mendukung penulis baik dalam doa, maupun dukungan materiil dan moril.
9. Kedua kakak penulis, Mas Yafet dan Mbak Elis, yang telah mendukung penulis dalam pembuatan tugas akhir ini.
10. Teman-teman GH yaitu, mbak Lia, mbak Meta, Ela, Dian, Dina, Onix, Eillen, dan lain-lain yang membantu dan menemani serta memberi semangat mulai dari persiapan hingga terselesainya ujian TA.
11. Kepada semua pihak yang telah membantu penyelesaian tugas akhir ini baik secara langsung maupun tidak langsung.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun. Semoga penulisan tugas akhir ini dapat berguna bagi yang membutuhkan.

Malang, 23 November 2012

Penulis

ABSTRAK

Oktaviana, Katarina, Tri. 2012. *Pengaruh ekstrak metanol Daun Kelor (Moringa oleifera) terhadap penghambatan aktivasi NF- κ B pada hepar tikus wistar model Hepatocellular carcinoma (HCC) yang diinduksi DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene)*. Tugas Akhir, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS. (2) Dr. dr. Retty R., MS.

NF- κ B adalah faktor transkripsi yang mengatur ekspresi gen yang melibatkan beberapa proses yang memerankan peranan penting dalam perkembangan dan progresi kanker seperti proliferasi dan apoptosis. Ekstrak metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) mengandung flavonoid yang berperan sebagai antioksidan dan antiinflamasi yang dapat menghambat progresivitas kanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap aktivasi NF- κ B pada jaringan hepar tikus Wistar yang diinduksi 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA). Penelitian ini menggunakan studi eksperimental, dilakukan pada 30 ekor tikus Wistar jantan yang dibagi secara random menjadi 5 kelompok. Kelompok I adalah tikus diberi diet normal saja (kontrol negatif) selama 105 hari, kelompok II tikus diberi DMBA 10 mg/hari selama 45 hari kemudian diet normal 60 hari, sedangkan kelompok III sampai dengan V (3 kelompok) diberi DMBA selama 45 hari, selanjutnya diberi asupan ekstrak metanol Daun Kelor selama 60 hari dengan dosis berbeda yaitu 20, 40, dan 80 mg/ml secara per oral dengan sonde setiap hari sekali. Parameter yang diukur adalah jumlah NF- κ B yang teraktivasi. Analisis data menggunakan metode *One Way ANOVA* dilanjutkan uji *Post Hoc Tukey*, menunjukkan bahwa pemberian ekstrak metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) berpengaruh terhadap aktivasi NF- κ B secara signifikan ($p < 0,05$). Kesimpulan penelitian ini adalah pemberian ekstrak metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) mampu menghambat aktivasi NF- κ B pada jaringan hepar tikus Wistar yang diinduksi DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene) dengan dosis respon 20 mg/ml.

Kata Kunci: ekstrak metanol daun kelor, NF- κ B, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA).

ABSTRACT

Oktaviana, Katarina, Tri. 2012. *The Effect of Moringa oleifera leaves (Kelor Leaves) Methanol Extract to Inhibit NF- κ B Activation in Wistar Rat Liver Hepatocellular Carcinoma (HCC) Models Induced with DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene)*. Final Assignment, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS. (2) Dr. dr. Retty R., MS.

NF- κ B is a transcription factor that regulates expression of gene involved in many processes that play a key role in the development and progression of cancer such as proliferation and apoptosis. Methanol extract of *Moringa oleifera* leaves (Kelor Leaves) contains flavonoid that has role as antioxidant and antiinflammatory to inhibit cancer progression. The objective of this research is understanding the administration effect of *Moringa oleifera* leaves (Kelor Leaves) methanol extract to NF- κ B activation in the Wistar Rat Liver induced with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA). This study used true experimental design in 30 Wistar rats male divided randomly into 5 groups. Group I contained rats given only normal diet (negative control) for 105 days, group II was rats given DMBA 10 mg/day for 45 days, after that given normal diet for 60 days, while group III until V were given a normal diet and DMBA 10 mg/day for 45 days and later given methanol extract of *Moringa oleifera* leaves with different doses (20, 40, 80 mg/ml) for 60 days orally with sonde. Parameter calculation in this research is the amount of NF- κ B activation. The data analysis done by the method of one-way ANOVA followed Tukey Post Hoc, showed that administration of *Moringa oleifera* leaves methanol extract decreased the amount of NF- κ B activation significantly ($p < 0,05$). The conclusion of this study is methanol extract of *Moringa oleifera* leaves is able to inhibit NF- κ B activation in Wistar rat liver induced DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene) at 20 mg/ml response dose of *Moringa oleifera* leaves methanol extract.

Key words: Methanol extract of *Moringa oleifera* leaves, NF- κ B, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA).

DAFTAR ISI

Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Kata Pengantar	iii
Abstrak	v
Abstract	vi
Daftar Isi	vii
Daftar Tabel	x
Daftar Gambar	xi
Daftar Lampiran	xiii
Daftar Singkatan	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Hepatocellular Carcinoma</i>	5
2.1.1 Morfologi Hati dan Pengertian <i>Hepatocellular Carcinoma</i>	5
2.1.2 Patofisiologi <i>Hepatocellular Carcinoma</i>	6
2.1.3 Faktor Risiko	7
2.1.4 Gejala dan <i>staging HCC</i>	8
2.1.5 Preventif dan terapi <i>HCC</i>	10
2.2 Kelor (<i>Moringa oleifera</i>)	12
2.2.1 Morfologi Kelor	12
2.2.2 Klasifikasi	13
2.2.3 Manfaat secara umum	13
2.2.4 Kandungan pada Kelor.....	14
2.2.5 Kandungan Gizi pada Kelor	14
2.3 DMBA	15
2.4 Proses Inflamasi dan Peranan NF- κ B	15

2.4.1	Proses Inflamasi.....	15
2.4.2	NF-κB	16
2.4.3	Hubungan kanker dan Inflamasi Kronis yang Melibatkan NF-κB	18
2.5	Hubungan Flavonoid Sebagai Antioksidan dan Anti-inflamasi pada <i>Moringa oleifera</i> dalam Menghambat Progresi kanker.....	20

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1	Kerangka Konsep.....	23
3.2	Penjelasan Kerangka Konsep.....	24
3.3	Hipotesis Penelitian.....	25

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1	Rancangan Penelitian.....	26
4.2	Binatang Coba.....	26
4.2.1	Binatang coba, Objek dan Teknik Randomisasi.....	26
4.2.2	Estimasi Jumlah Pengulangan.....	27
4.2.3	Kriteria Inklusi.....	27
4.2.4	Kriteria Eksklusi.....	28
4.3	Variabel Penelitian.....	28
4.4	Lokasi dan Waktu Penelitian.....	28
4.5	Alat dan Bahan Penelitian.....	29
4.5.1	Alat.....	29
4.5.2	Bahan Penelitian.....	29
4.6	Definisi Operasional.....	30
4.7	Prosedur penelitian.....	30
4.7.1	Adaptasi.....	31
4.7.2	Induksi 7,12 dimethylbenz(a)anthracene	32
4.7.3	Perlakuan.....	32
4.7.3.1	Pemeliharaan.....	32
4.7.3.2	Pembedahan.....	32
4.7.3.3	Metode Pelaksanaan IHK	33
4.8	Cara Pemeriksaan Mikroskop	34
4.9	Pengolahan dan Analisis Data	34

BAB 5 HASIL DAN ANALISIS

5.1 Hasil Penelitian	36
5.2 Analisa Data	41

BAB 6 PEMBAHASAN 44

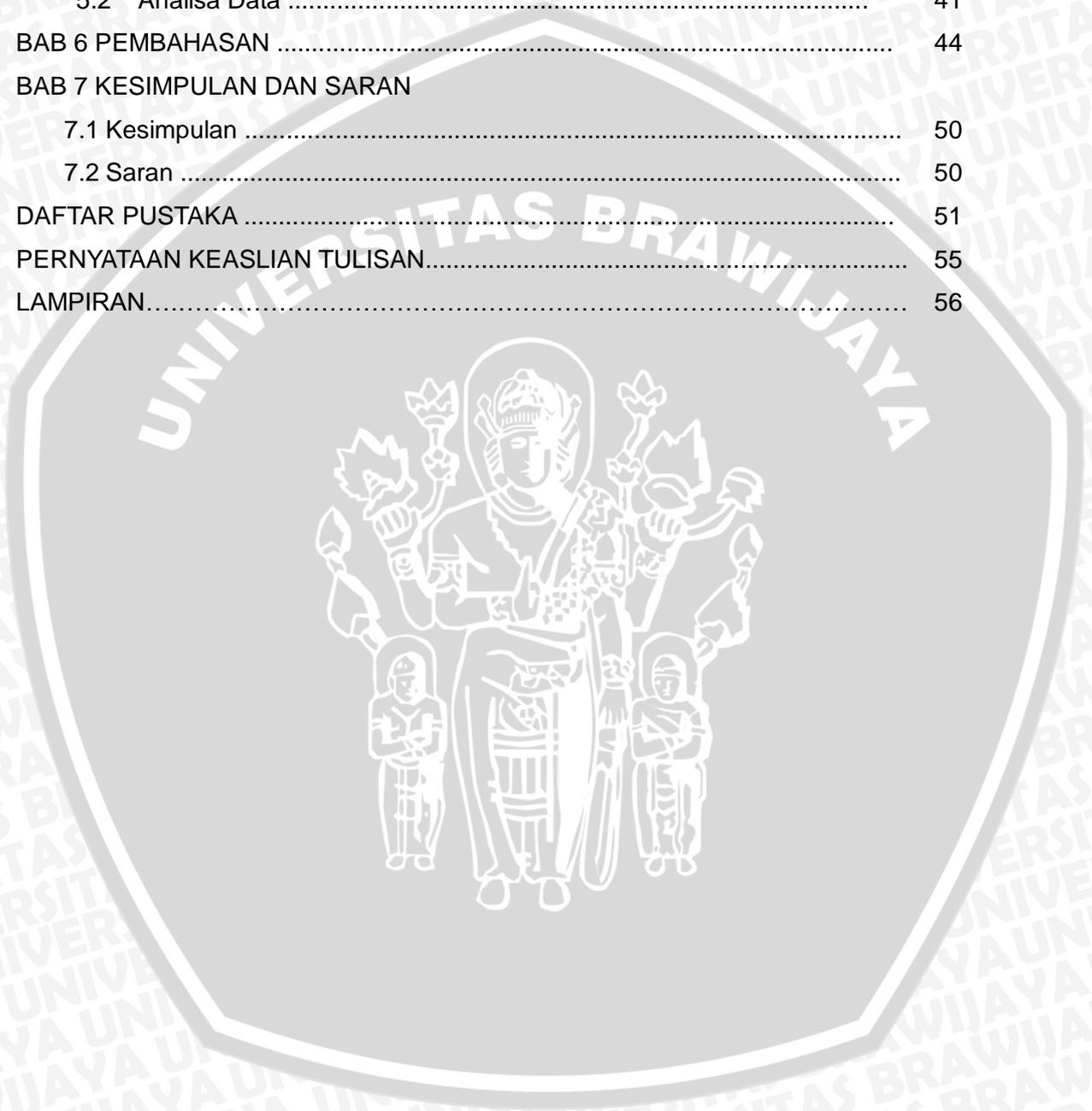
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan	50
7.2 Saran	50

DAFTAR PUSTAKA 51

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN..... 55

LAMPIRAN..... 56



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 BCLC Staging.....	9
Tabel 2.2 PS: Performance Status.....	9
Tabel 2.3 Okuda Staging.....	10
Tabel 2.4 Modalitas Terapi <i>HCC</i>	10
Tabel 5.1 Rata-rata Jumlah NF-κB.....	37

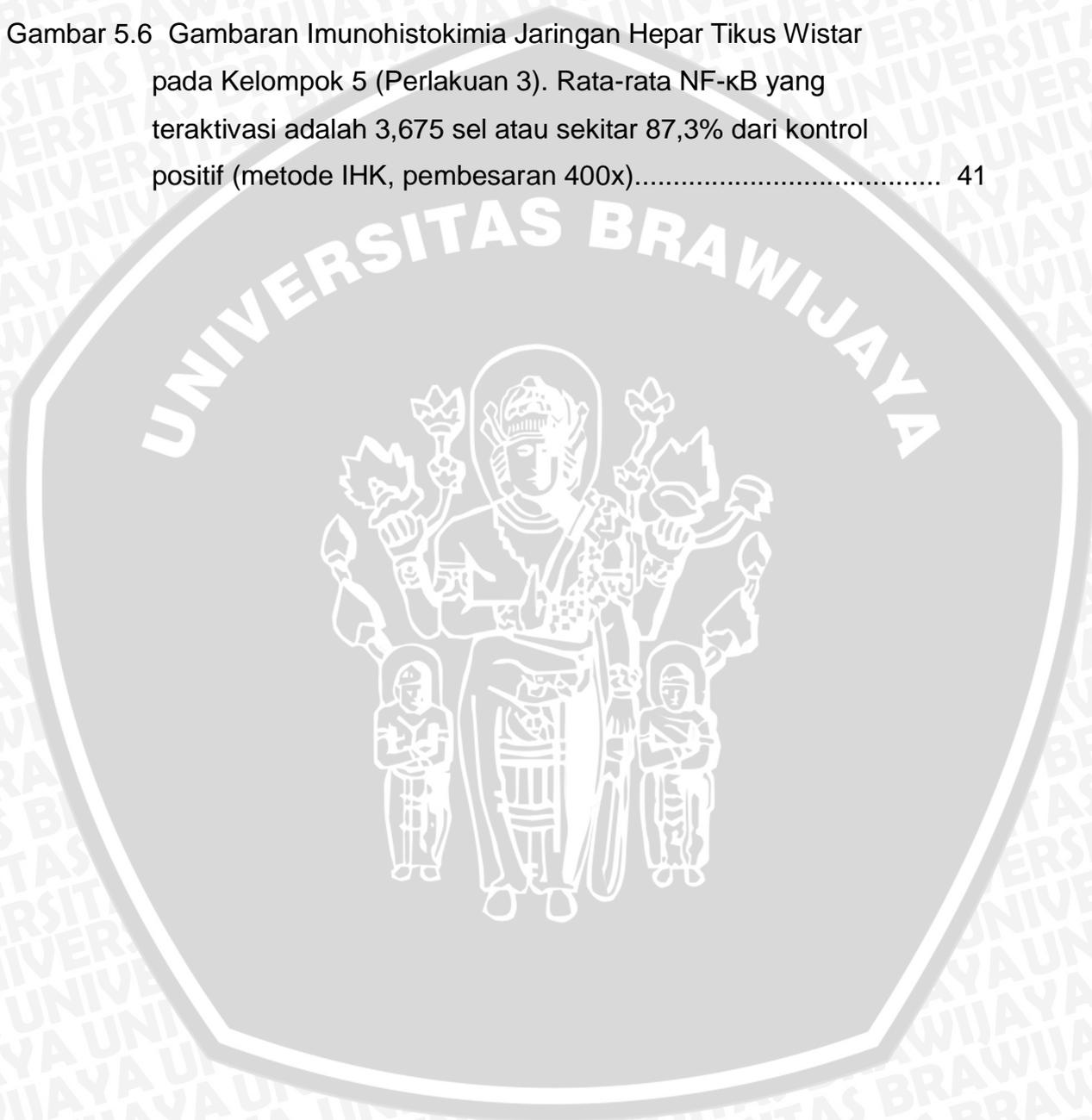


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur dasar lobulus hati.....	6
Gambar 2.2 Target molekuler dalam produk herbal selama perkembangan <i>HCC</i>	11
Gambar 2.3 Kelor.....	12
Gambar 2.4 Jalur Klasik dan Alternatif aktivasi NF- κ B.....	18
Gambar 2.5 Perbedaan inflamasi dan peranannya dalam tumorigenesis.....	18
Gambar 5.1 Grafik Hubungan Antara Kelompok Perlakuan dan Rata-rata Jumlah NF- κ B p50.....	37
Gambar 5.2 Gambaran Imunohistokimia Jaringan Hepar Tikus Wistar pada Kelompok 1 (Kontrol Negatif). Rata-rata NF- κ B yang teraktivasi adalah 3,3 sel (metode IHK, pembesaran 400x).....	39
Gambar 5.3 Gambaran Imunohistokimia Jaringan Hepar Tikus Wistar pada Kelompok 2 (Kontrol Positif). Rata-rata NF- κ B yang teraktivasi adalah 29 sel (metode IHK, pembesaran 400x).....	39
Gambar 5.4 Gambaran Imunohistokimia Jaringan Hepar Tikus Wistar pada Kelompok 3 (Perlakuan 1). Rata-rata NF- κ B yang teraktivasi adalah 7,125 sel atau menurunkan 75,4% dari kontrol positif (metode IHK, pembesaran 400x).....	40
Gambar 5.5 Gambaran Imunohistokimia Jaringan Hepar Tikus Wistar	

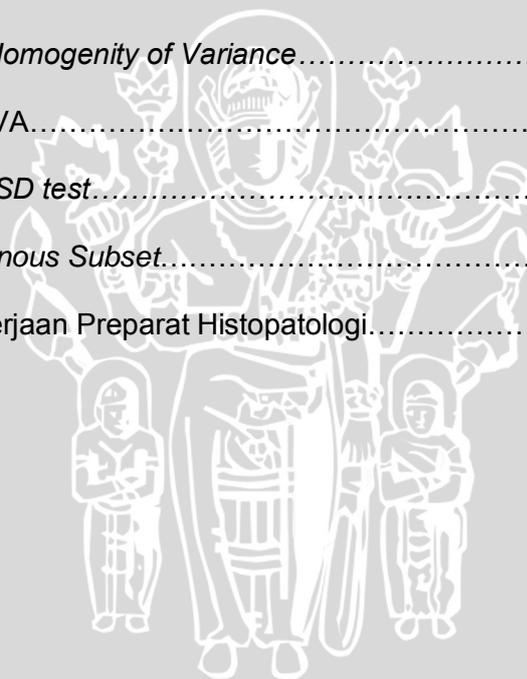
pada Kelompok 4 (Perlakuan 2). Rata-rata NF-κB yang teraktivasi adalah 5,125 sel atau menurunkan 82,3% dari kontrol positif (metode IHK, pembesaran 400x)..... 40

Gambar 5.6 Gambaran Imunohistokimia Jaringan Hepar Tikus Wistar pada Kelompok 5 (Perlakuan 3). Rata-rata NF-κB yang teraktivasi adalah 3,675 sel atau sekitar 87,3% dari kontrol positif (metode IHK, pembesaran 400x)..... 41



DAFTAR LAMPIRAN

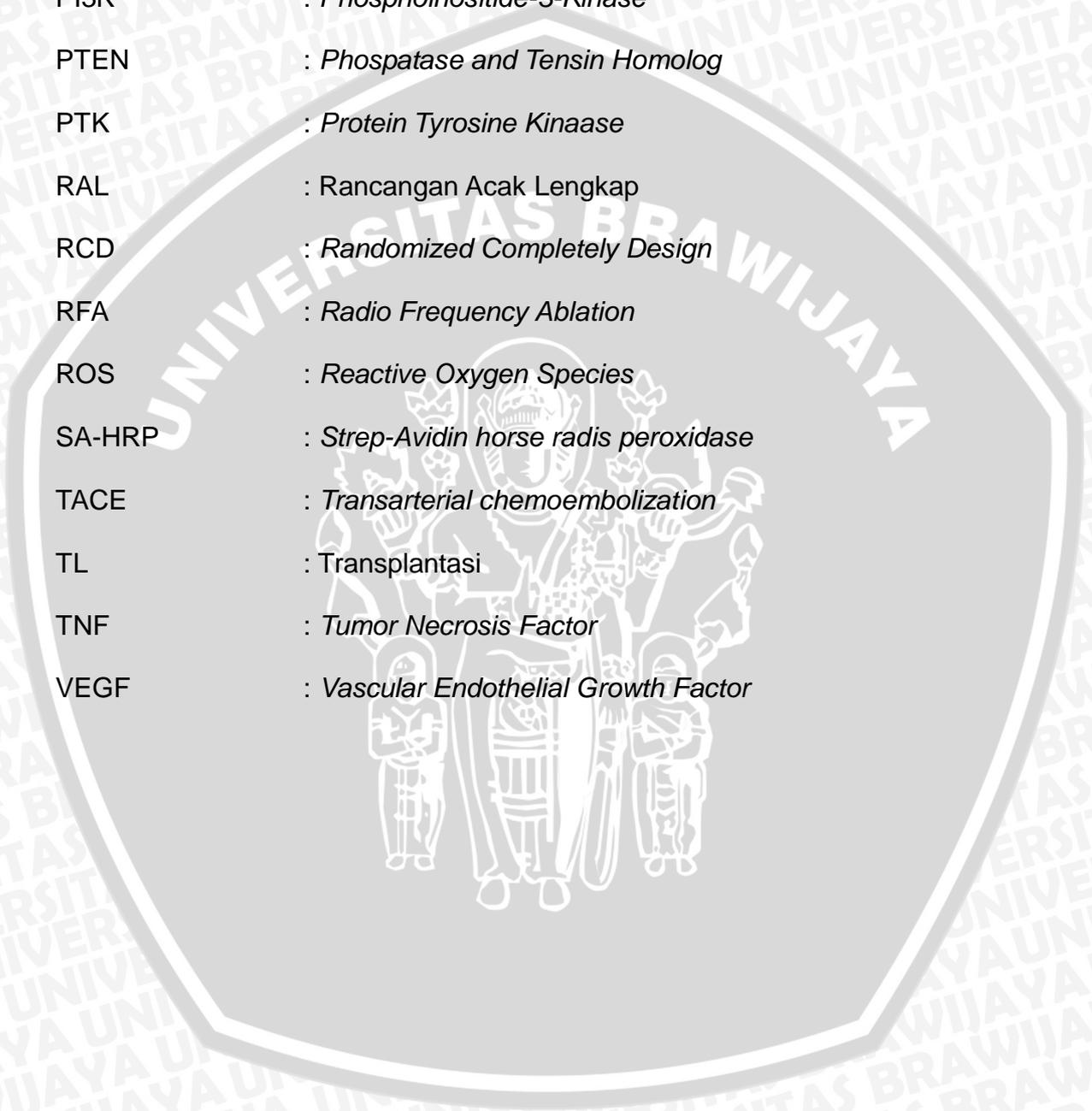
	Halaman
Lampiran 1 Diagram Alur Pembuatan Pakan Normal.....	56
Lampiran 2 Cara Pemeriksaan Dengan IHK.....	56
Lampiran 3 Tabel Jumlah NF- κ B p50 (NF- κ B yang teraktivasi) (IHK).....	58
Lampiran 4 Tabel <i>Test of Normality</i> (Uji Normalitas Data)	59
Lampiran 5 Tabel <i>Groups Statistic</i>	59
Lampiran 6 Tabel <i>Test of Homogeneity of Variance</i>	60
Lampiran 7 Tabel Uji ANOVA.....	60
Lampiran 8 Tabel <i>Tukey HSD test</i>	60
Lampiran 9 Tabel <i>Homogenous Subset</i>	61
Lampiran 10 Proses Pengerjaan Preparat Histopatologi.....	61



DAFTAR SINGKATAN



BCLC	: <i>Barcelona Clinic Liver Cancer</i>
BHA	: <i>Butylated Hydroxyl Anisole</i>
BHT	: <i>Butylated Hydroxyl Toluene</i>
CC	: <i>Cholangiocarcinoma</i>
DAB	: <i>Diamano Benzidine</i>
DISC	: <i>Death Inducing Signaling Complex</i>
DMBA	: <i>7, 12 dymethylbenz(a)anthracene</i>
DPPH	: <i>2, 2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl</i>
EGFR	: <i>Endothelial Growth Factor Receptor</i>
FLIP	: <i>FLICE Like Inhibitor Protein</i>
HBV	: <i>Hepatitis B Virus</i>
HCC	: <i>Hepatocellular Carcinoma</i>
HCV	: <i>Hepatitis C Virus</i>
IAPs	: <i>Inhibitor of Apoptosis</i>
IGF	: <i>Insulin Growth Factor</i>
IHK	: <i>Imunohistokimia</i>
IκB	: <i>Inhibitor kappa B</i>
IκK	: <i>IκB Kinase</i>
LPS	: <i>Lipid peroksidasi</i>
MAPK	: <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
NF-κB	: <i>Nuclear Factor kappa B</i>



NTT	: Nusa Tenggara Timur
PEI	: <i>Percutaneous Ethanol Injection</i>
PI3K	: <i>Phosphoinositide-3-Kinase</i>
PTEN	: <i>Phospatase and Tensin Homolog</i>
PTK	: <i>Protein Tyrosine Kinaase</i>
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
RCD	: <i>Randomized Completely Design</i>
RFA	: <i>Radio Frequency Ablation</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SA-HRP	: <i>Strep-Avidin horse radis peroxidase</i>
TACE	: <i>Transarterial chemoembolization</i>
TL	: Transplantasi
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hepatocellular carcinoma (HCC) adalah kanker hati primer yang paling sering terjadi. Insidennya meningkat dan menjadi kanker ganas kelima di dunia yang paling sering terjadi dan menyebabkan kematian akibat kanker ketiga di dunia setelah kanker paru dan kanker abdomen. Perkiraan insiden kasus baru adalah 500.000 - 1.000.000 per tahun dan menyebabkan 600.000 kematian secara global per tahun. Kebanyakan kasus *HCC* terjadi di Asia, dimana beberapa negara, khususnya Asia Timur, memiliki insiden yang sangat tinggi (>20 kasus / 100.000 populasi) (Gomaa *et al.*, 2008). Sekitar 80% dari kasus *HCC* di dunia berada di Negara berkembang seperti Asia Timur dan Asia Tenggara, serta Afrika Tengah (Sub-Sahara), yang diketahui sebagai wilayah dengan prevalensi tinggi virus hepatitis (Aru W. Sudoyo dkk., 2009).

Pada sebagian besar kasus, *HCC* didahului dengan sirosis hati dan tidak mengejutkan apabila sirosis hati diidentifikasi sebagai faktor resiko utama dari *HCC*. Fakta penting lainnya adalah infeksi kronis dari Virus Hepatitis B (*HBV*) atau Virus Hepatitis C (*HCV*). Oleh karena itu, telah diperkirakan bahwa *HBV* bertanggung jawab atas 50% - 80% dari kasus *HCC* di seluruh dunia. Penyebab lainnya adalah berasal dari lingkungan dan faktor resiko genetik, misalnya, terlalu banyak mengonsumsi alkohol, diet aflatoksin, diabetes, obesitas, atau hematokromatosis herediter (Venook *et al.*, 2010).

HCC sering kali berkembang pada pasien dengan infeksi kronis dari satu atau dua virus hepatitis, *HBV* atau *HCV*. Infeksi kronis *HBV* atau *HCV* pada hati

menyebabkan kematian hepatosit dan infiltrasi sel inflamasi (He and Karin, 2011). Ketika inflamasi menjadi kronis atau berlangsung lama, ini dapat membahayakan dan menyebabkan penyakit. Inflamasi kronis dapat menyebabkan kanker, diabetes, penyakit kardiovaskuler, penyakit paru, dan penyakit saraf. Inflamasi berhubungan dengan kanker karena peranan dari agen pro-inflamasi, seperti sitokin, kemokin, molekul adhesi, dan enzim-enzim inflamasi lainnya (Aggarwal *et al.*, 2006). Aktivasi NF- κ B adalah hasil dari beberapa jalur yang dicetuskan oleh berbagai macam sitokin, faktor pertumbuhan, dan tirosin kinase. NF- κ B meregulasi ekspresi gen yang termasuk dalam beberapa proses yang mempunyai peranan penting di dalam perkembangan dan progresi dari kanker yaitu proliferasi, migrasi, dan apoptosis (Dolcet *et al.*, 2005).

DMBA (7,12 *dimethylbenz(a)anthracene*) adalah suatu senyawa hidrokarbon polisiklik aromatik sintetik. DMBA merupakan karsinogen prototip yang secara luas digunakan dan poten di selektif area yaitu kelenjar mama, kulit, ginjal, dan liver. Keterpaparan DMBA menginduksi perubahan klinikopatologikal melalui toksisitas yang terjadi pada kulit, kelenjar mama, ginjal, dan liver. DMBA menginduksi produksi ROS (Reactive Oxygen Species) yang merusak peroksidasi lipid, kerusakan DNA, dan deplesi sel antioksidan (Paliwal *et al.*, 2011). Kerusakan DNA menyebabkan pengaktifan onkogen dan/ atau inaktivasi gen supresi tumor dan berbagai perubahan epigenetik yang menyebabkan progresi dari tumor (He and Karin, 2011).

Melihat dari tingginya prevalensi dan mortalitas pada penderita HCC, dibutuhkan suatu tindakan pencegahan berupa perubahan pola hidup yang sehat serta pencegahan melalui obat-obatan kimia, pembedahan, kemoradioterapi,

maupun obat-obatan herbal. Salah satu tanaman yang diduga menghambat perjalanan penyakit ini adalah Daun Kelor. Daun Kelor mempunyai nama latin *Moringa oleifera* yang mengandung berbagai zat kimia yang bermanfaat. *Phytochemical* dalam *Moringa oleifera* adalah tannin, steroid dan triterpenoid, flavonoid, saponin, antraquinon, alkaloid, dan rendah gula. Flavonoid adalah antioksidan yang kuat, juga ditemukan efektif sebagai antimikroba, dilaporkan juga sebagai antikardiogenik dan antimutagenik karena aktivitasnya sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Flavonoid juga aktif menurunkan tekanan darah tinggi. Antraquinon mempunyai efek laksatif. Terpenoid dan steroid aktif melawan bakteri (Kasolo *et al.*, 2010). Antioksidan di dalam Daun Kelor mempunyai aktivitas menetralkan radikal bebas sehingga mencegah kerusakan oksidatif pada sebagian besar biomolekul dan menghasilkan proteksi terhadap kerusakan oksidatif secara signifikan (Sreelatha and Padma, 2009).

Melihat dari potensi kandungan antioksidan dalam tanaman ini diharapkan pemanfaatannya dapat dimaksimalkan untuk obat herbal masa depan. Hal inilah yang mendorong dilakukan penelitian tentang “Pengaruh ekstrak metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap penghambatan aktivasi NF- κ B pada hepar tikus wistar model *Hepatocellular carcinoma (HCC)* yang diinduksi DMBA (7,12 dimethylbenz(α)anthracene)“.

1.2 Rumusan Masalah

- a. Apakah pemberian ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) dapat menghambat aktivasi NF- κ B pada jaringan hepar tikus wistar yang diinduksi DMBA?

- b. Berapakah dosis respon dari ekstrak metanol Daun Kelor untuk menghambat aktivasi NF- κ B pada jaringan hepar tikus wistar yang diinduksi DMBA?

1.3 Tujuan

- a. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap penghambatan aktivasi NF- κ B pada jaringan hepar tikus wistar yang diinduksi DMBA.
- b. Mengetahui dosis respon dari ekstrak metanol Daun Kelor yang dapat menghambat aktivasi NF- κ B pada tikus wistar yang diinduksi DMBA.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Bagi bidang keilmuan: Memberi kontribusi dasar teori tentang Daun Kelor (*Moringa oleifera*), khususnya ekstrak metanol Daun Kelor, dapat menghambat progresi kanker hepar melalui penghambatan aktivasi NF- κ B pada tikus yang diinduksi DMBA.
2. Bagi masyarakat: menambah pengetahuan tentang dasar teori kepada masyarakat bahwa Daun Kelor dapat digunakan untuk terapi kuratif kanker hepar.

BAB 2

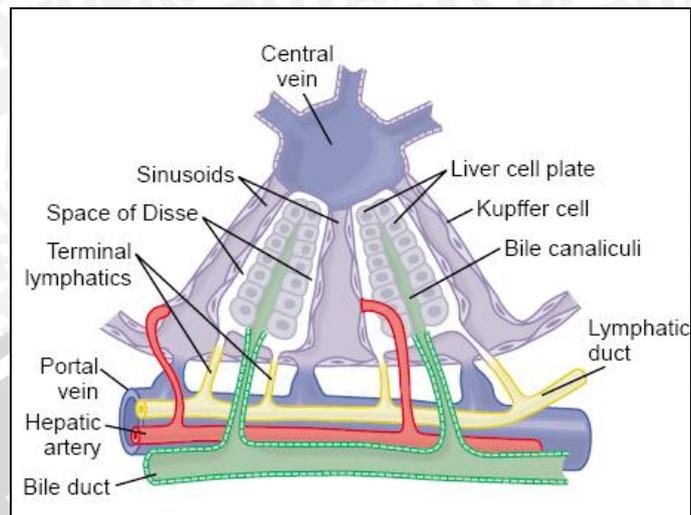
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Hepatocellular Carcinoma (HCC)*

2.1.1 Morfologi Hati dan Pengertian *Hepatocellular Carcinoma*

Hati adalah organ intestinal terbesar dengan berat 1,2 - 1,8 kg atau kurang lebih 2,5% berat badan orang dewasa yang menempati sebagian besar kuadran kanan atas abdomen dan merupakan pusat metabolisme tubuh dengan fungsi yang sangat kompleks. Secara mikroskopis di dalam hati manusia terdapat 50.000 – 100.000 lobuli, setiap lobulus berbentuk heksagonal yang terdiri atas sel hati berbentuk kubus yang tersusun radial mengelilingi vena sentralis. Hati terdiri atas bermacam-macam sel, yaitu $\pm 60\%$ sel hati (hepatosit) dan sisanya terdiri atas sel-sel epitelial sistem empedu dalam jumlah yang bermakna dan sel-sel non-parenkimal yang termasuk di dalamnya endotel, sel kupffer, dan sel stellata yang berbentuk bintang. Diantara lembaran sel hati terdapat kapiler yang disebut sinusoid yang merupakan cabang vena porta dan arteri hepatis. Sinusoid dibatasi oleh sel fagosit (sel kupffer) yang merupakan sistem retikuloendotelial dan berfungsi menghancurkan bakteri dan benda asing lain dalam tubuh, jadi hati merupakan salah satu organ utama pertahanan tubuh terhadap serangan bakteri dan racun (Aru W. Sudoyo dkk., 2009).

Fungsi hati sangat penting meliputi : (1) penyaringan dan penyimpanan darah; (2) metabolisme karbohidrat, protein, lemak, hormon, dan zat kimia asing; (3) pembentukan empedu; (4) penyimpanan vitamin dan besi; (5) pembentukan faktor koagulasi (Guyton and Hall, 2007). Di bawah ini adalah gambar struktur dasar lobulus hati.



Gambar 2.1. Struktur dasar lobulus hati (Guyton and Hall, 2007)

Hepatocellular Carcinoma (HCC) merupakan tumor ganas primer pada hati yang berasal dari hepatosit, demikian pula dengan karsinoma fibrolamellar dan hepatoblastoma. Dari seluruh tumor ganas hati yang pernah terdiagnosis, 85% merupakan *HCC (Hepatocellular Carcinoma)*, 10% *CC (Cholangiocarcinoma)*, dan 5% adalah jenis lainnya (Aru W. Sudoyo dkk., 2009). *Hepatocellular Carcinoma (HCC)* berhubungan dengan infeksi kronis dan inflamasi. Infeksi kronis dan inflamasi yang persisten pada hati menyebabkan kematian sel dan infiltrasi agen inflamasi. Hal ini bisa menyebabkan pengeluaran sejumlah besar sitokin, kemokin, dan *growth factor* yang selanjutnya akan meningkatkan proliferasi sel secara berlebihan (He and Karin, 2011).

2.1.2 Patofisiologi HCC (*Hepatocellular Carcinoma*)

Sekitar 15% kanker pada manusia berhubungan dengan infeksi kronis dan inflamasi. *HCC* bisa terjadi salah satunya karena infeksi virus hepatitis kronis. Infeksi dan inflamasi yang terus-menerus pada organ hati menyebabkan kematian sel hati (hepatosit) dan infiltrasi lokal agen inflamasi yang berlebihan.

Kematian sel hati dan infiltrasi agen inflamasi yang terus-menerus pada perkembangan *HCC* diikuti dengan pembentukan sitokin, kemokin, dan *growth factor* dalam jumlah besar sehingga meningkatkan proliferasi sel hati (He and Karin, 2011). Sitokin, kemokin, dan faktor pertumbuhan yang dikeluarkan mengaktifkan NF- κ B. Aktivasi Ras/MAPK dan PI3K/Akt juga meningkatkan NF- κ B yang teraktivasi (Dolcet *et al.*, 2005). NF- κ B yang teraktivasi menyebabkan induksi proliferasi sel dan menurunkan apoptosis, merubah adhesi intraseluler, pengerahan sel inflamasi, menambah sinyal patogenetik primer dan memulai atau meningkatkan tumorigenesis (Ahmed, 2010). Ditambah lagi dengan *reactive oxygen and nitrogen species* pada ekspresi sel onkogen dan sel inflamasi menyebabkan kerusakan DNA sehingga mengaktifkan onkogen dan atau menginaktifkan gen tumor supresor, serta perubahan variasi epigenetik yang menyebabkan pertumbuhan tumor. Oleh karena itu, etiologi yang mempengaruhi *cell survival* dan respon inflamasi mempunyai pengaruh besar terhadap perkembangan *HCC* (He and Karin, 2011).

2.1.3 Faktor Risiko

Pada sebagian besar kasus, *HCC* didahului dengan sirosis hati dan tidak mengejutkan apabila sirosis hati diidentifikasi sebagai faktor resiko utama dari *HCC*. Fakta penting yang mengakibatkan serosis hati adalah infeksi kronis dari Virus Hepatitis B (*HBV*) atau Virus Hepatitis C (*HCV*). Oleh karena itu, telah diperkirakan bahwa *HBV* bertanggung jawab atas 50% - 80% dari kasus *HCC* di seluruh dunia. Penyebab lain adalah berasal dari lingkungan dan faktor resiko genetik, misalnya, terlalu banyak mengonsumsi alkohol, diet aflatoksin, diabetes, obesitas, atau hematokromatosis hereditas (Venook *et al.*, 2010). Aflatoksin

adalah mikotoksin yang diproduksi oleh jamur *aspergillus* yang mampu menginduksi mutasi gen supresor tumor p53 (Aru W. Sudoyo *dkk.*, 2009).

Infeksi kronis *HBV* atau *HCV* pada hati menyebabkan kematian hepatosit dan infiltrasi sel inflamasi (He and Karin, 2011). Ketika inflamasi menjadi kronis atau berlangsung lama, ini dapat membahayakan dan menyebabkan penyakit. Inflamasi kronis dapat menyebabkan kanker, diabetes, penyakit kardiovaskuler, penyakit paru, dan penyakit saraf. Inflamasi berhubungan dengan kanker karena peranan dari agen pro-inflamasi, seperti sitokin, kemokin, molekul adhesi, dan enzim-enzim inflamasi lainnya (Aggarwal *et al.*, 2006).

Sejumlah besar dari karsinogen kimia, termasuk DMBA (7,12-dimethylbenz[a]anthracene), menyebabkan karsinogenesis melalui radikal bebas dengan merusak sel atau jaringan. Sejumlah besar produksi ROS karena kerusakan pada sel dapat menyebabkan modifikasi DNA yang bisa berkontribusi dalam mutagenesis dan karsinogenesis (Manoharan *et al.*, 2010).

2.1.4 Gejala dan tahapan (*staging*) *HCC*

Pasien *HCC* menunjukkan satu atau lebih gejala klinis termasuk nyeri abdomen pada kuadran kanan atas, penurunan berat badan, dan atau perburukan enzim hati pada pasien yang diketahui menderita sirosis hati. Gejala klinis lain yang jarang adalah perdarahan intraabdominal atau manifestasi ekstrahepatik (hiperkalsemia, hipoglikemia, dan tiroksikosis). Anemia muncul pada lebih dari setengah kasus, walaupun ada yang menunjukkan eritrositosis karena sintesis eritropoetin ekstrarenal. Tanda dari sirosis hati (jaundice, eritema palmar, dan ginekomastia) dan hipertensi porta (asites dan varises).

Staging yang tepat dapat membantu menentukan prognosis sehingga

terapi yang tepat dapat dilaksanakan. Walaupun tidak ada sistem *staging HCC* yang digunakan secara universal, beberapa mengadopsi *BCLC of 5 staging* (Barcelona-Clinic Liver Cancer). Stadium *BCLC* dan sistem prognosisnya membagi berdasarkan stadium tumor, status fisik dan fungsi hati, gejala, dan menyertakan algoritma terapi. Tabel dan gambar dibawah ini adalah *staging HCC* dan algoritma terapi berdasarkan *BCLC* (El-Serag *et al.*, 2008)

Tabel 2.1. BCLC Staging

BCLC Staging dan Korelasinya dengan Okuda Staging						
Stadium	PS	Stadium tumor	Okuda	pH	Bilirubin	Klasifikasi
A1	0	Single	I	Tidak	Normal	Sangat Dini
A2	0	Single	I	Iya	Normal	Dini
A3	0	Single	I	Iya	Terganggu	
A4	0	3x <3cm	I-II	Iya	Terganggu	
B	0	>5cm atau multinodular	I-II			Intermediet
C	1-2	Invasi vascular	I-II			Advance
D	3-4	Any Stage	III			Terminal

Sumber: El-Serag *et al.*, 2008

Tabel 2.2. PS: Performance Status

Stadium	Performance Status
0	Aktif, hidup normal, tidak ada gejala
1	Gejala Minor, dapat melakukan aktivitas berat, dapat merawat dirinya tetapi tidak dapat melakukan aktivitas kerja berat
2	Dapat melakukan aktivitasnya >50%, kemampuan perawatan diri terbatas, lebih banyak di tempat tidur atau kursi
3	Hanya dapat melakukan aktivitasnya 50%
4	Cacat, hanya bisa di tempat tidur atau kursi

Sumber: Bruix and Sherman., 2005

Tabel 2.3. Okuda Staging

Okuda Staging			
	Negatif	Positif	Stage
Tumor Size	<50% dari liver	>50% dari liver	I: Tidak ada faktor positif
Asites	Tidak ada	Ada	
Bilirubin	<3 mg/dl	>3 mg/dl	II: 1-2 faktor positif
Serum ALbumin	>3 g/dl	<3 g/dl	III: 3-4 faktor positif

Sumber: El-Serag *et al.*, 2008

2.1.5 Preventif dan terapi HCC

Target tindakan preventif untuk *HCC* adalah identifikasi faktor risikonya. Vaksinasi HBV dapat menurunkan *HCC* pada area insiden tinggi. Menjauhi agen hepatotoksik seperti alkohol pada pasien penyakit hati. Pada penderita HBV atau HCV dapat diberikan terapi antifibrosis untuk mencegah terjadinya sirosis hati. Dalam table di bawah ini adalah macam-macam terapi *HCC* saat ini.

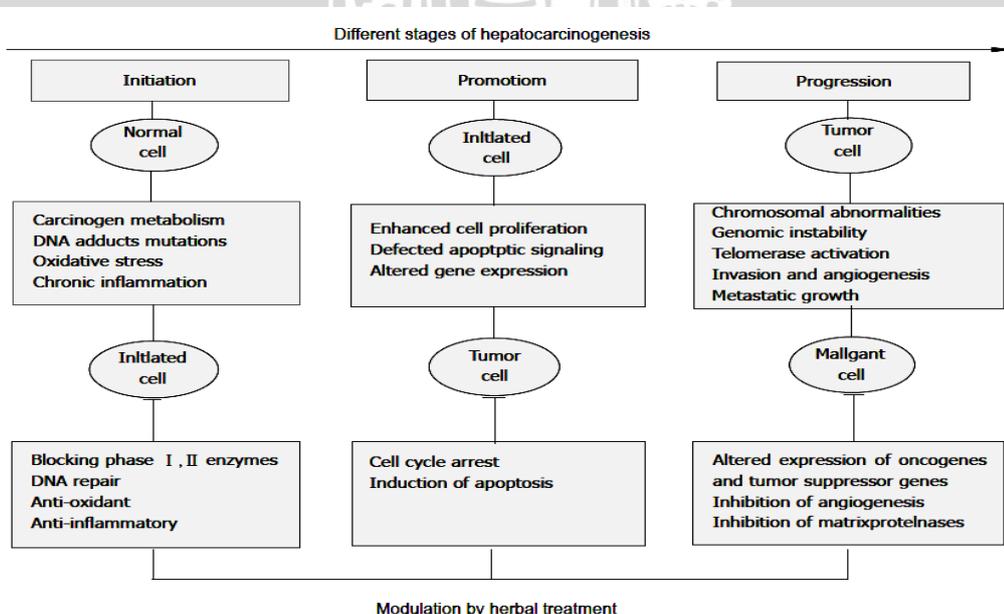
Tabel 2.4. Modalitas Terapi *HCC*

Terapi	Survival	Special issues
<i>Surgical resection</i>	1 tahun: 97% 2 tahun: 84% 5 tahun: 26% - 57%	<ul style="list-style-type: none"> Pilihan terapi untuk pasien tanpa sirosis hati Untuk 5% - 15% pasien <i>HCC</i> yang memenuhi syarat
Transplantasi (TL)	1 tahun: 91% 2 tahun: 75% 5 tahun: 70% - <50%	Terapi kuratif untuk penyakit kronis dan <i>HCC</i>
Radiofrekuensi ablasi (RFA)	1 tahun: 90% 3 tahun: 74% 5 tahun: 40% - 50%	<ul style="list-style-type: none"> Efek lebih bisa diprediksi pada semua ukuran tumor daripada PEI Lebih baik dari PEI Membutuhkan sesi terapi sedikit
<i>Percutaneous Ethanol Injection (PEI)</i>	1 tahun: 85% 3 tahun: 50% 5 tahun: 40% - 50%	Efektif untuk <i>HCC</i> kecil (<2 cm)
<i>Transarterial chemoembolization (TACE)</i>	1 tahun: 82% 2 tahun: 63%	Pasien yang tidak dioperasi dengan <i>HCC</i> yang besar dan multifokal dengan atau

	tidak invasi vaskuler atau ada penyebaran ekstrahepatik
--	---

Sumber: El-Serag *et al.*, 2008

Selain terapi pada tabel diatas, sejak jaman dahulu produk herbal telah digunakan untuk mengobati berbagai penyakit. Istilah *chemoprevention* dikenalkan pada akhir tahun 1970an dan menunjukkan intervensi farmakologi yang bertujuan untuk menghentikan proses karsinogenesis. Usaha sebelumnya dibuat untuk mengidentifikasi agen atau kombinasi yang dapat menunjukkan karakteristik seperti: (1) mencegah inisiasi tumor, (2) mencegah perkembangan tumor, (3) memperpanjang masa latensi tumor, (4) menurunkan metastase dan kematian akibat kanker, dan (5) mencegah tumor sekunder ulang. Beberapa herbal anti-cancer ditemukan untuk menyupresi terjadinya inflamasi, hiperproliferasi, dan proses transformatif yang meningkatkan angiogenesis seperti curcumin, ekstrak biji anggur, dan teh hijau (Abdel-Hamid *et al.*, 2011). Pada gambar 2.2 menunjukkan target molekuler dalam produk herbal selama perkembangan *HCC*.



Gambar 2.2. Target molekuler dalam produk herbal selama perkembangan *HCC* (Abdel-Hamid *et al.*, 2011).

2.2 Kelor (*Moringa oleifera*)

Indonesia memiliki banyak potensi keanekaragaman hayati yang sebelumnya terbukti telah dimanfaatkan oleh nenek moyang kita. Salah satu tanaman yang bisa dimanfaatkan dengan baik dan banyak tumbuh serta mudah dibudidayakan di Indonesia adalah tanaman Kelor (*Moringa oleifera*, Lamk) (plantamor.com, 2008).

Moringa oleifera adalah spesies yang secara luas dibudidayakan dari family Moringaceae, yang termasuk dalam 13 spesies pohon dan perdu yang tumbuh di daerah sub-Himalayan India, Sri Lanka, *North Eastern* dan *Sorth Eastern Africa*, Madagascar, dan Arabia. Sekarang ini tanaman ini dapat ditemukan di Afrika, Ceylon, Thailand, Burma, Singapore, West Indies, Sri Lanka, India, Meksiko, Malabar, Malaysia, dan Filipina. Dikenal dengan berbagai nama dari beberapa negara yaitu Morunga, Kelor, Marongo, Moonga, Mlonge, Mulangay, Nebeday, Sajihan, dan Sajna atau Benzolive. Dalam bahasa Inggris adalah Horseradish tree, Drumstick tree, Never die tree, West Indian Ben tree atau Radish tree (Fahey, 2005; Hsu *et al.*, 2006). Tanaman ini termasuk salah satu pohon yang paling banyak mempunyai manfaat hampir pada semua bagiannya.

2.2.1 Morfologi Kelor



Gambar 2.3. Kelor (*Moringa oleifera*) (Silver, 2011)

Kelor (*Moringa oleifera*) termasuk jenis tumbuhan perdu yang dapat memiliki ketinggian batang 5 -11 meter. Pohon Kelor tidak terlalu besar, batang kayunya mudah patah dan cabangnya agak jarang tetapi mempunyai akar yang kuat. Daunnya berbentuk bulat telur (*oval*) dengan ukuran kecil-kecil bersusun majemuk dalam satu tangkai. Tanaman ini adalah tanaman yang toleran terhadap musim kemarau yang panjang, dan bertahan hidup dengan merontokkan daunnya pada saat kemarau (blogtopsite.com, 2011).

2.2.2 Klasifikasi

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Sub kingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super divisi	: Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi	: Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida (berkeping dua atau dikotil)
Sub kelas	: Dilleniidae
Ordo	: Capparales
Famili	: Moringaceae
Genus	: Moringa
Species	: <i>Moringa oleifera lam.</i> (<i>Integrated Taxonomic Information System, 2000</i>)

2.2.3 Manfaat secara umum

Moringa oleifera adalah tanaman multifungsi. Telah dibudidayakan di daerah tropis di seluruh dunia dengan karakter : (1) Kandungan protein tinggi, vitamin, mineral, dan karbohidrat yang sangat bermanfaat bagi nutrisi pada

manusia dan ternak; (2) Kandungan minyak yang tinggi dalam benihnya dapat dimakan dan digunakan dalam bidang kedokteran; (3) Koagulan dalam benihnya dapat digunakan sebagai terapi *wastewater* (Foiddl *et al.*, 2001).

2.2.4 Kandungan pada Kelor (*Moringa oleifera*)

Kandungan fitokimia daun kelor yaitu tannin, steroid dan triterpenoid, flavanoid, saponin, anthraquinon, dan alkaloid.

Flavanoid bermanfaat sebagai antioksidan yang kuat, juga ditemukan efektif sebagai antimikroba in vitro dengan menghambat pengikatan enzim, dan juga bermanfaat sebagai antikarsinogenik dan antimutagenik karena pengaruhnya sebagai antioksidan dan antiinflamasi, serta bermanfaat untuk menurunkan tekanan darah. Anthraquinon mempunyai efek laksatif. Triterpenoid dan steroid aktif melawan bakteri seperti *Staphylococcus aureus*, dan bermanfaat juga sebagai antikanker. Alkaloid mempunyai efek antimikroba karena kemampuannya *intercalated* DNA dari mikroorganisme (Kasolo *et al.*, 2010).

2.2.5 Kandungan Gizi pada Kelor

Daun Kelor mengandung vitamin K, vitamin A yang 4 kali lebih banyak dibandingkan wortel, Vitamin C yang 7 kali lebih banyak dibandingkan jeruk, Vitamin B1, B2, B6, mangan, magnesium, kalsium yang 4 kali lebih banyak dibandingkan dengan susu, kalium yang 3 kali lebih banyak dibanding buah pisang, zat besi, protein yang 2 kali lebih banyak dibandingkan susu, niasin, dan serat. Semua bagian dari tanaman ini dapat dimanfaatkan. Tanaman ini penuh dengan nutrisi dan vitamin dan bagus digunakan sebagai bahan makanan bagi manusia dan ternak (Hsu *et al.*, 2001).

2.3 DMBA

DMBA (7,2 dimetilbenz(α)antracene) adalah suatu senyawa hidrokarbon polisiklik aromatik sintetik. DMBA merupakan karsinogen prototip yang secara luas digunakan dan poten di selektif area yaitu kelenjar mama, kulit, ginjal, dan liver. Keterpaparan DMBA menginduksi perubahan klinikopatologikal melalui toksisitas yang terjadi pada kulit, kelenjar mama, ginjal, dan liver. DMBA menginduksi produksi ROS (Reactive Oxygen Species) yang merusak peroksidasi lipid, kerusakan DNA, dan deplesi dari sel antioksidan. (Paliwal *et al.*, 2011). DMBA dikenal sebagai agen sitotoksik, karsinogenik, mutagenik, dan immunosupresif (Al-Attar, 2004).

2.4 Proses Inflamasi dan Peranan NF- κ B

2.4.1 Proses Inflamasi

Inflamasi adalah suatu respon protektif yang ditujukan untuk menghilangkan penyebab awal jejas sel serta membuang sel dan jaringan nekrotik yang diakibatkan oleh kerusakan asal. Inflamasi melaksanakan tugasnya dengan mengencerkan, menghancurkan, atau menetralkan agen berbahaya (misalnya, mikroba atau toksin). Inflamasi kemudian menggerakkan berbagai kejadian yang akhirnya menyembuhkan dan menyusun kembali tempat terjadinya jejas. Dengan demikian, inflamasi juga saling terkait erat dengan proses perbaikan, yang mengganti jaringan yang rusak dengan regenerasi sel parenkim, dan atau dengan pengisian setiap kerusakan yang tersisa dengan jaringan parut. Walaupun inflamasi membantu membersihkan infeksi, dan bersama-sama dengan proses perbaikan memungkinkan terjadinya

penyembuhan luka, baik inflamasi maupun proses perbaikan sangat potensial menimbulkan bahaya. Respon inflamasi atau radang memiliki banyak pemain, yaitu sel dan protein plasma dalam sirkulasi, sel dinding pembuluh darah, dan sel serta matriks ekstraseluler jaringan ikat di sekitarnya.

Inflamasi terbagi menjadi dua pola dasar. Inflamasi akut adalah radang yang berlangsung relatif singkat, dari beberapa menit hingga beberapa hari, dan ditandai dengan eksudasi cairan dan protein plasma serta akumulasi leukosit neutrofilik yang menonjol. Inflamasi kronik berlangsung lebih lama (berhari-hari sampai bertahun-tahun) dan ditandai khas dengan influks limfosit dan makrofag disertai dengan proliferasi pembuluh darah dan pembentukan jaringan parut (Kumar *et al.*, 2004).

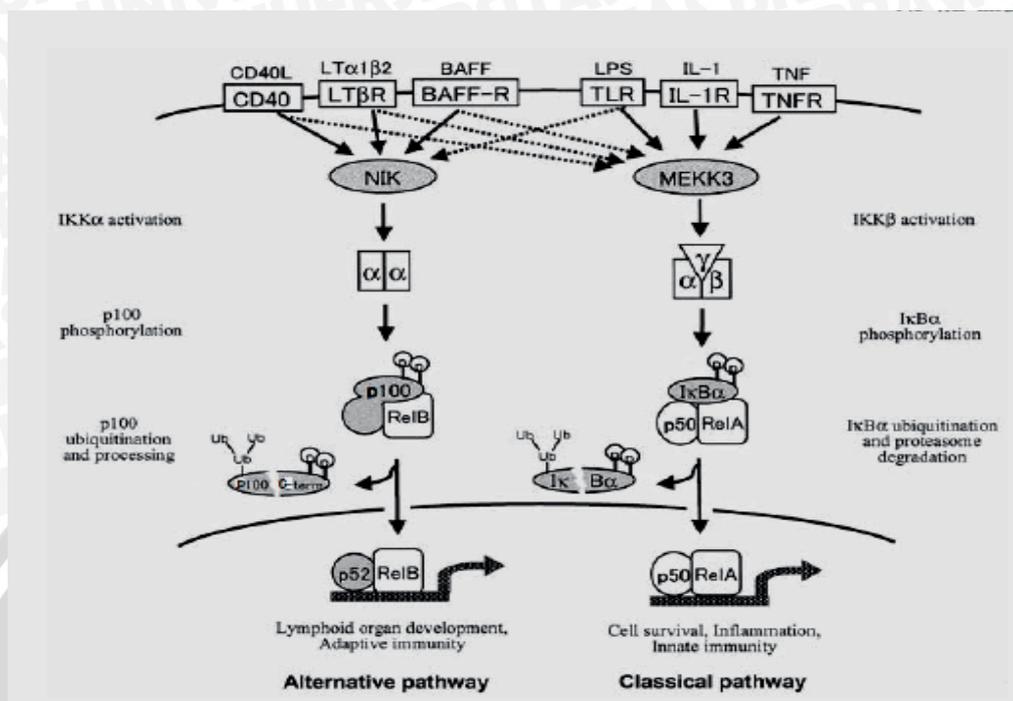
2.4.2 NF- κ B

Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) adalah faktor transkripsi dan berfungsi sebagai regulator ekspresi rantai ringan κ B pada limfosit B mature dan sel plasma. NF- κ B banyak digunakan sel eukariotik sebagai regulator gen yang mengontrol proliferasi sel dan *cell survival*. Aktivasi sinyal jalur faktor NF- κ B transkripsi memerankan peranan yang sangat penting dalam respon imun dan respon inflamasi, proses perkembangan, pertumbuhan sel, dan apoptosis. Aktivitas ini berhubungan dengan progresi berbagai neoplasma tipe maligna. Dalam literatur lain juga menunjukkan bahwa aktivasi NF- κ B adalah salah satu dasar resistensi kemoterapi dan inhibisi terhadap NF- κ B dapat meningkatkan *efficacy* terapi kanker (Li *et al.*, 2009).

Pada sel mamalia, famili NF- κ B/Rel terdiri dari 5 (lima) anggota : RelA (p65), c-Rel, RelB, NF- κ B1 (p50; p105), dan NF- κ B2 (p52;p100). NF- κ B1/ p105

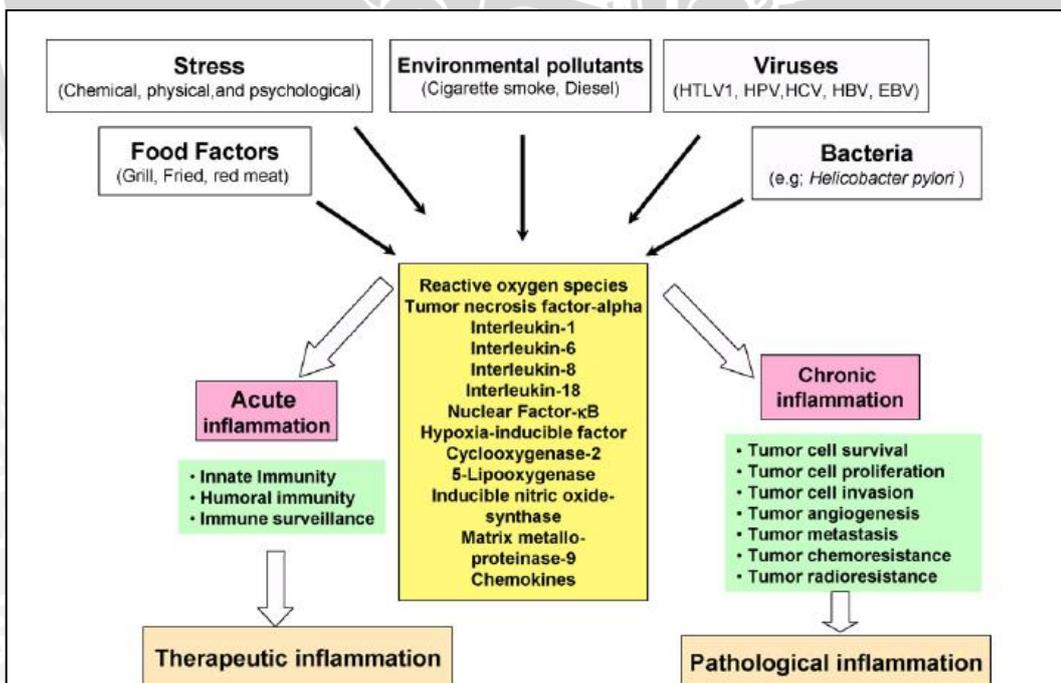
dan NF- κ B2/ p100 adalah prekursor tidak aktif dari protein p50 dan p52 yang masing-masing dalam keadaan tidak terstimulasi, protein ini berada dalam sitoplasma (Nishikori, 2005). Pada sel yang tidak terstimulasi, sebagian besar NF- κ B disimpan di sitoplasma dengan diikat oleh inhibitor protein I κ B, kecuali dimer yang dibentuk oleh p105 dan p100 yang inaktif dan berisi I κ B-like-moieties. Pada respon stimulus proinflamasi, seperti TNF (*Tumor Necrosis Factor*) atau interleukin 1 β (IL-1 β), kompleks I κ B kinase (I κ KK) yang terdiri dari subunit katalis I κ K α dan I κ K β dan subunit regulator I κ K γ dalam keadaan aktif karena hasil dari I κ B yang terfosforilasi dan terdegradasi. Salah satu dari subunit katalis, I κ K β adalah salah satu yang paling penting dalam I κ B degradasi, membentuk pusat dari jalur klasik dalam pengaktifan NF- κ B. Sedangkan I κ K α dibutuhkan untuk proses induksi dari protein p100 yang inaktif menjadi derivatnya yang aktif yaitu p52, oleh karena itu membentuk pusat dari jalur pengaktifan NF κ B yang dinamakan jalur alternatif (He and Karin, 2011).

Ada dua jalur dalam mengaktifkan NF- κ B. Jalur klasik distimulasi oleh produk mikroba dan sitokin proinflamasi, seperti TNF α dan IL-1 yang menyebabkan aktivasi dari RelA atau cRel. Jalur alternatif diaktivasi oleh famili sitokin TNF yaitu limfotoksin β (TNFSF3), ligan CD40, B Cell Activating Factor (BAFF dan TNFSF13B), dan aktivator reseptor dari ligan NF- κ B (RANKL dan TNFSF11) yang menyebabkan aktivasi dari RelB atau kompleks p52 (Lawrence, 2009). Pada gambar 2.4 menunjukkan jalur aktivasi NF- κ B.



Gambar 2.4. Jalur Klasik dan Alternatif aktivasi NF-κB (Nishikori, 2005)

2.4.3 Hubungan kanker dan inflamasi kronis yang melibatkan NF-κB



Gambar 2.5. Perbedaan inflamasi dan perannya dalam tumorigenesis (Aggarwal *et al.*, 2006)

Walaupun inflamasi telah lama diketahui sebagai reaksi protektif lokal

pada iritasi jaringan atau sel, luka, atau infeksi dengan karakteristik nyeri, eritema, bengkak, dan kadang-kadang kehilangan fungsi, ada sebuah penemuan baru tentang peranan inflamasi dalam berbagai macam penyakit, termasuk kanker. Pada inflamasi akut yang merupakan respon pertahanan, sedangkan kronik inflamasi dapat menyebabkan kanker, diabetes, penyakit kardiovaskuler, penyakit pulmonal, dan penyakit neurologis. Beberapa gen proinflamasi memediasi peranan penting dalam supresi apoptosis, proliferasi, angiogenesis, invasi, dan metastasis. Gen-gen ini yaitu TNF dan superfamilinya, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, kemokin, MMP-9, VEGF, COX-2, dan 5-LOX. Ekspresi dari gen-gen ini sebagian besar diregulasi oleh faktor transkripsi NF- κ B, yang aktif dalam hampir semua tumor dan diinduksi oleh karsinogen (misalnya, asap rokok), *tumor promoter*, protein virus karsinogen (HIV-tat, HIV-nef, HIV-vpr, KHSV, EBV-LMP1, HTLV1-tax, HPV, HCV, dan HBV), agen kemoterapi, dan radiasi- γ . Observasi ini memperlihatkan bahwa agen anti-inflamasi yang menyupresi NF- κ B atau meregulasi produksi NF- κ B seharusnya mempunyai efek preventif dan dapat digunakan sebagai terapi kanker (Aggarwal *et al.*, 2006).

Aktivasi dari NF- κ B merupakan hasil dari beberapa stimulus yaitu sitokin, faktor pertumbuhan, dan tirosin kinase. Ditambah dengan ekspresi dari kelompok *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR), *Insulin Growth Factor Receptor* (IGFR), dan *Tumor Necrosis Factor Receptor* (TNFR). Lebih lagi, aktivasi dari sinyal yang lain, seperti Ras/MAPK dan PI3K/Akt.

NF- κ B meregulasi ekspresi gen yang melibatkan beberapa proses yang memerankan peranan penting dalam perkembangan dan progresi kanker seperti proliferasi, migrasi, dan apoptosis. NF- κ B mengaktifkan beberapa gen yang menyupresi apoptosis baik melalui jalur mitokondria (intrinsik) maupun jalur

reseptor kematian. NF- κ B meregulasi ekspresi protein yang mengganggu jalur kematian reseptor apoptosis. Salah satu targetnya adalah FLIP (*FLICE-Like Inhibitory Protein*). Tingginya level dari FLIP mencegah Caspase-8 berikatan dengan DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*). Hal ini dipercaya bahwa ekspresi FLIP menyebabkan resistensi kematian reseptor apoptosis pada beberapa tipe tumor. NF- κ B juga menginduksi ekspresi dari *Inhibitors of Apoptosis* (IAPs) dan menurunkan ekspresi PTEN. Penurunan PTEN menyebabkan peningkatan aktivitas Akt dan menyupresi apoptosis. Selanjutnya, NF- κ B mengganggu aktivitas transkripsional p53 karena ini menghambat p53 menginduksi apoptosis dengan meningkatkan regulasi gen antiapoptosis dan menurunkan regulasi p53 level. NF- κ B menaikkan siklus progresi sel dengan meregulasi ekspresi beberapa gen yaitu D1 siklin, D2 siklin, D3 siklin, dan E siklin, c-myc dan c-mycb. NF- κ B menginduksi ekspresi molekul sel adhesi (ICAM-1, E-selectin), dan matrix metalloproteinase. Beberapa faktor angiogenik, termasuk *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) juga ditingkatkan oleh NF- κ B. Lebih lagi, NF- κ B menginduksi ekspresi siklooksigenasi-2 (COX-2) yang penting pada beberapa tumor (Dolcet *et al.*, 2005).

2.5 Hubungan Flavonoid Sebagai Antioksidan dan Anti-inflamasi pada *Moringa oleifera* dalam Menghambat Progresi Kanker

Antioksidan memerankan peranan yang penting dalam menginhibisi dan mengeliminasi radikal bebas sehingga dapat melindungi manusia dari infeksi dan penyakit degenerative. Derivat oksigen reaktif yang potensial, berasal dari ROS (*Reactive Oxygen Species*) seperti O_2^- , H_2O_2 , dan OH, selalu ada di dalam tubuh makhluk hidup sebagai konsekuensi atas banyaknya eksogenus kimia di sekitar

lingkungan dan/atau sejumlah endogenus proses metabolik termasuk enzim redox dan *bioenergetic electron transfer*. Dalam jumlah dibawah normal, ROS didetoksifikasi oleh antioksidan tubuh dan ada keseimbangan antara ROS dan antioksidan didalamnya. Oleh karena itu, produksi berlebihan dari ROS dan/ atau pertahanan antioksidan yang inadkuat, keseimbangan ini dapat terganggu sehingga kenaikan ROS mencapai puncaknya pada stres oksidatif. ROS siap menyerang dan menginduksi kerusakan di berbagai biomolekul termasuk protein, lipid, lipoprotein, dan DNA. Kerusakan oksidatif ini menyebabkan beberapa penyakit kronik pada manusia seperti diabetes militus, kanker, aterosklerosis, arthritis, penyakit neurodegeneratif, dan proses penuaan. Beberapa antioksidan sintesis yaitu BHA (Butylated Hydroxy Anisole) dan BHT (Butylated Hydroxyl Toluene) telah banyak dikomersialkan tetapi kurang aman dan toksisitasnya masih dipermasalahkan. Antioksidan natural, khususnya *phenolics* dan *flavonoids*, adalah aman dan juga bioaktif (Sreelatha and Padma, 2009).

Flavonoid selain berguna sebagai antioksidan alami, juga berperan sebagai antimikroba, antivirus, anti-inflamsi, anti alergi, anti-mutagenik, anti kanker, anti platelet. Inflamasi menyebabkan perubahan aliran darah, peningkatan tekanan darah, dan kerusakan jaringan, karena terbentuknya ROS dan berbagai mediator inflamasi lokal seperti prostaglandin, leukotrien, fosfolipase A-2 (PLA-2). Kanker terjadi karena terganggunya homeostatis metabolisme tubuh, hal ini erat kaitannya dengan fungsi antioksidan dan anti-inflamasi. Flavonoid menghambat perkembangan kanker melalui mediator inflamasi dan radikal bebas. Flavonoid mempengaruhi sitokin, menghambat aktivasi dan translokasi sub unit p65, p50, dan c-Rel dari NF- κ B dan faktor transkripsi lainnya (Setiawan dan Darusman, 2008). Quercetin dan kaempferol

dapat menurunkan ekspresi iNOS dan COX-2 pada sel hepar (Gallego *et al.*, 2007).

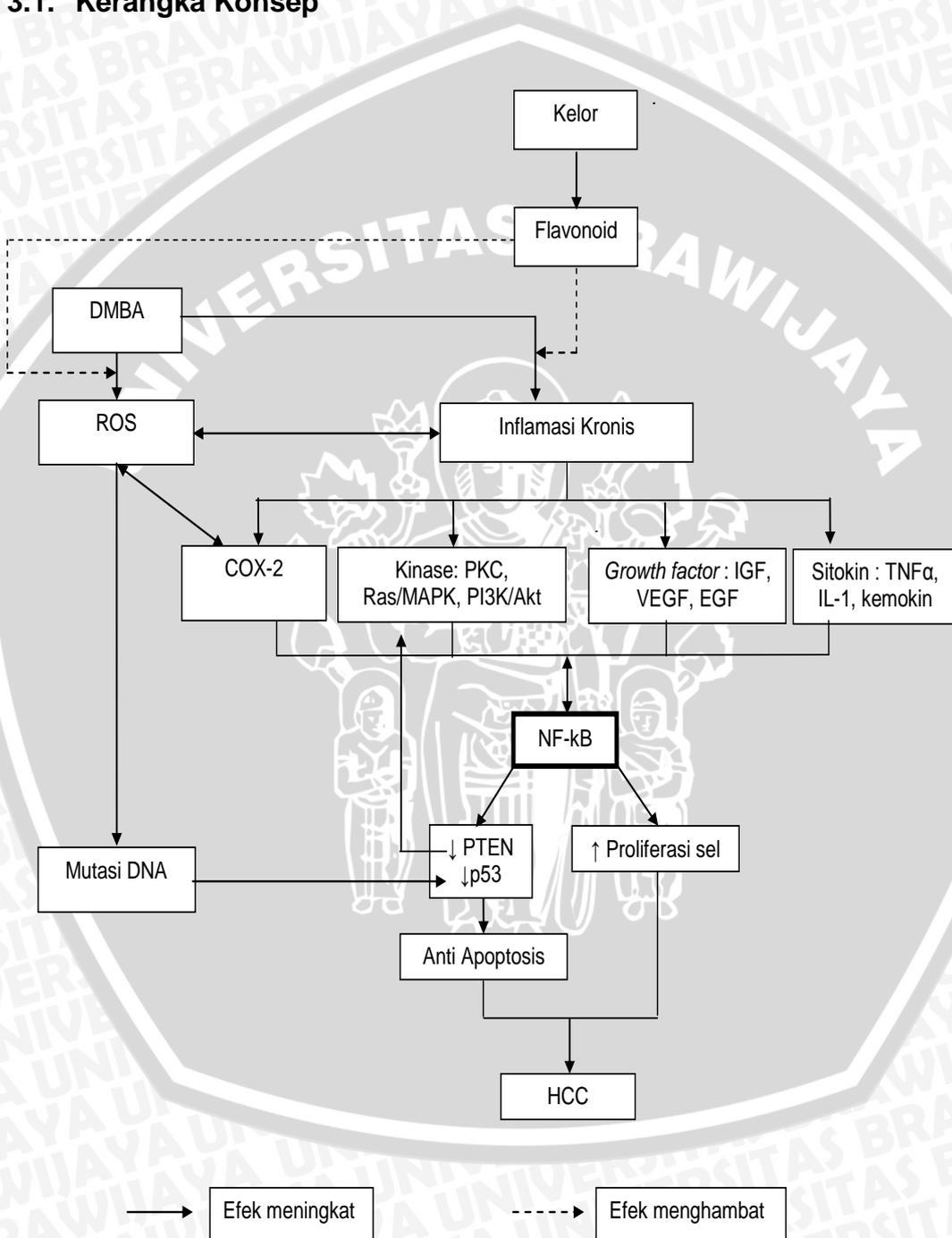
Flavonoid banyak terdapat pada buah, sayur-sayuran, biji-bijian, kacang-kacangan, teh, anggur merah, dan flavonoid yang banyak dikonsumsi adalah quercetin. Senyawa efektif pada flavonoid (flavon, daidzein, genistein, isorhamnetin, kaempferol, quercetin, naringenin, dan pelaronidin) menghambat induksi LPS terhadap aktivasi NF- κ B (Mari *et al.*, 2007). NF- κ B adalah salah satu faktor transkriptor utama yang memodulasi sinyal kaskade molekuler dan beberapa darinya dapat dijadikan target terapi inflamasi (Gallego *et al.*, 2007).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konsep



3.2. Penjelasan Kerangka Konsep

DMBA (7,2 dimetilbenz(α)antracene) adalah karsinogen prototip yang secara luas digunakan dan poten di selektif area yaitu kelenjar mama, kulit, ginjal, dan liver. DMBA menginduksi produksi ROS yang menyebabkan lipid peroksidasi, kerusakan DNA, dan penurunan sistem pertahanan antioksidan (Paliwal *et al.*, 2011). DMBA menyebabkan transformasi neoplastik melalui kerusakan DNA, akumulasi ROS, dan memediasi inflamasi kronis (Manoharan *et al.*, 2009). ROS siap menyerang dan menginduksi kerusakan di berbagai biomolekul termasuk protein, lipid, lipoprotein, dan DNA (Sreelatha and Padma, 2009). Mediator inflamasi kronis yang dihasilkan oleh makrofag yang teraktivasi diantaranya adalah sitokin, faktor pertumbuhan, tirosin kinase, dan COX-2. Aktivasi NF- κ B sendiri berasal dari stimulasi dari berbagai sitokin (IL-1, TNF α), faktor pertumbuhan (EGF, IGF), dan kinase (Ras/MAPK, PI3K/Akt, PKC) (Dolcet *et al.*, 2005).

NF- κ B yang telah teraktivasi kemudian mengaktifkan beberapa gen yang termasuk dalam supresi kematian sel (antiapoptosis). Diantaranya penurunan PTEN, dan penurunan gen p53. Penurunan PTEN menyebabkan pengaktifan PI3K/Akt selanjutnya mengaktifkan NF- κ B kembali (Dolcet *et al.*, 2005). Penurunan gen p53, gen supresi tumor, juga dapat disebabkan oleh mutasi DNA. NF- κ B menyebabkan siklus progresi sel (proliferasi sel) dengan meregulasi beberapa gen seperti D₁ siklin, D₂ siklin, D₃ siklin, E siklin, c-myc, dan c-mycb. NF- κ B juga menginduksi ekspresi cikloksigenasi-2 (COX-2) yang penting dalam perkembangan tumor. Selain itu NF- κ B juga merangsang pengeluaran sitokin dan faktor pertumbuhan, termasuk IL-6 (He and Karin, 2011).

Pemberian ekstrak metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) varietas NTT

yang mengandung antioksidan dan antiinflamasi dalam flavonoid diharapkan dapat menekan pengeluaran agen inflamasi kronik dan menetralkan ROS yang berlebih pada perkembangan *HCC* melalui penghambatan aktivasi NF- κ B.

3.3. Hipotesis Penelitian

Pemberian ekstrak metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) varietas NTT dapat menghambat aktivasi NF- κ B pada jaringan hepar tikus wistar model *Hepatocellular Carcinoma (HCC)*.



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 metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) dalam berbagai dosis.

4.2 Binatang Coba

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 ± 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.

4.2.3 Kriteria Inklusi

1. Strain wistar
2. Umur 2 bulan
3. Berat badan ± 200 gr
4. Jenis kelamin jantan
5. 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/ml. Pemberian per oral ekstrak methanol daun kelor dengan sonde dilakukan 1x sehari selama 60 hari.

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah jumlah NF- κ B yang teraktivasi yaitu NF- κ B p50 dalam jaringan. 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. Kondisi lingkungan kandang
4. 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 aktivasi NF- κ B adalah *Immunohistochemistry kit*, mikroskop.

4.5.2 Bahan Penelitian

1. Bahan Makanan Tikus

Pakan tikus dewasa tiap 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*)

Proses ekstraksi menggunakan 42 gram dari tepung daun kelor (*Moringa oleifera*) yang disuspensikan dalam metanol 80%. Ekstrak kemudian diaduk secara mekanis selama 12 jam dalam temperatur ruangan (25°C). Solid kemudian dipindahkan dengan sentrifugasi (4,000 g, 10 min) dan supernatan diambil. Hasil ekstrak kemudian disimpan pada suhu 4°C untuk proses lebih lanjut (Mutasim *et al.*,2010).

3. Bahan Pemeriksaan Immunohistokimia

Jaringan dari hepar tikus, aktivasi NF- κ B, IHK *kit unit*.

4.6 Definisi Operasional

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

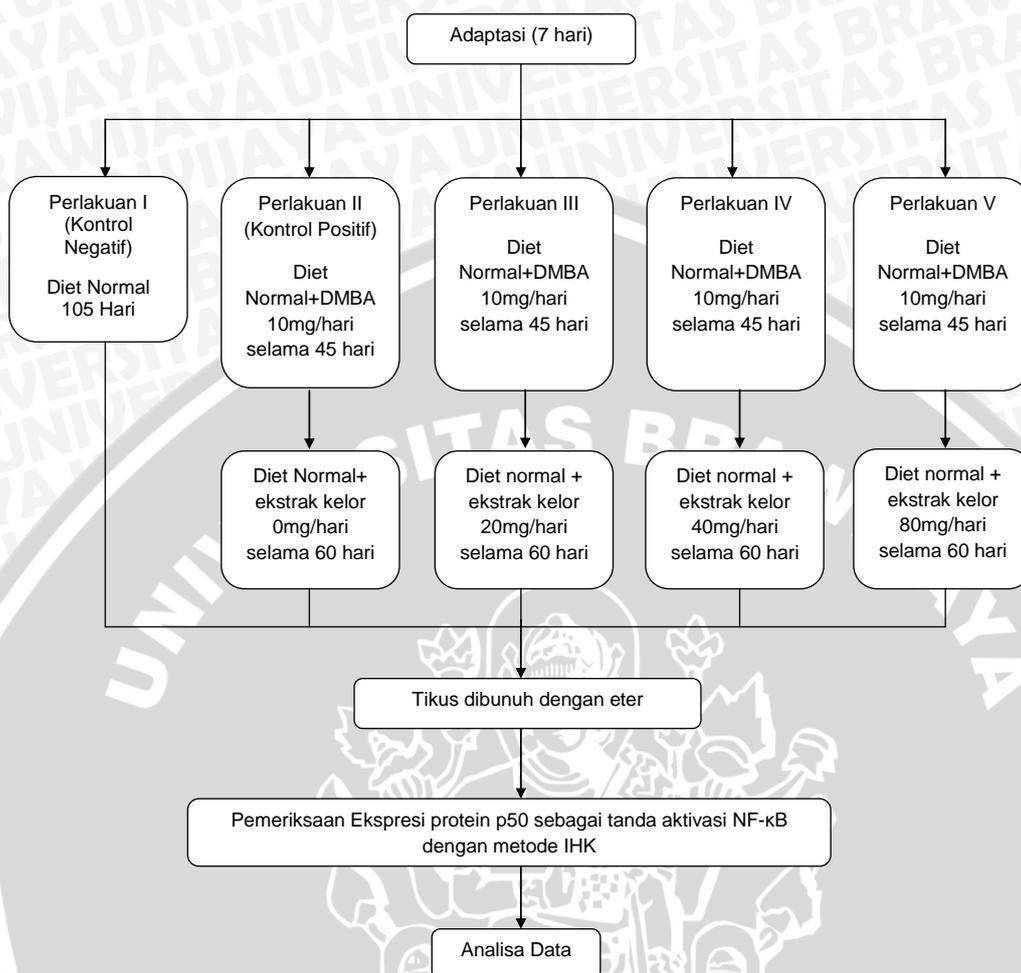
Perlakuan (Intervensi) adalah pemberian suplementasi ekstrak metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) 0, 20, 40, 80 mg/ml dengan cara dimasukkan per oral dengan sonde (Parvathy and Umamaheswari, 2007).

2. NF- κ B dalam jaringan hepar

Perhitungan kuantitatif NF- κ B p50 (NF- κ B yang teraktivasi) dengan metode imunohistokimia. Hasil sediaan jaringan hepar dilihat dengan mikroskop pembesaran 400x. Sel hepar yang normal (NF- κ B tidak teraktivasi) akan menunjukkan warna inti dan sitoplasma biru, sedangkan NF- κ B p50 (NF- κ B yang teraktivasi) pada inti dan sitoplasma sel hepar berwarna coklat. (Sarbini dkk., 2007).

4.7 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh pengetahuan mengenai efek ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap aktivasi NF- κ B dalam jaringan hepar tikus (*Rattus norvegicus*) wistar dengan diet DMBA. Alur penelitian dapat dijelaskan melalui bagan berikut



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 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)

Tikus wistar diberi 10 mg/hari 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) per oral (sonde) pada pagi hari pukul 10.00 WIB. Pemberian DMBA dilakukan selama 45 hari (Indra *dkk.*, 2011). Setelah 45 hari, 1 ekor tikus yang diberi DMBA tanpa ekstrak *Moringa oleifera* dibunuh untuk melihat adanya perkembangan

karsinogenesis pada jaringan hepar.

4.7.3 Perlakuan

4.7.3.1 Pemeliharaan

Dalam masa ini, kelima kelompok tikus mendapat perlakuan yang berbeda. Untuk kelompok I (kontrol negatif), tikus hanya diberi pakan normal (standar) saja selama 105 hari. Kelompok perlakuan II hingga V diberi diet DMBA sebanyak 10 mg/hari dengan sonde selama 45 hari. Selanjutnya, kelompok II diberi diet normal tanpa pemberian ekstrak methanol daun kelor selama 60 hari. Sedangkan, kelompok III diberi ekstrak methanol daun kelor per oral dengan dosis 20 mg/ml dengan sonde + diet normal selama 60 hari. Kelompok IV diberi ekstrak methanol daun kelor per oral dengan dosis 40 mg/ml + diet normal selama 60 hari. Kelompok V diberi ekstrak methanol daun kelor per oral dengan dosis 80 mg/ml + diet normal selama 60 hari. Jadi, semua pakan di atas diberikan selama 105 hari (Indra *dkk.*, 2011).

4.7.3.2 Pembedahan

Pemeriksaan aktivasi NF- κ B dalam jaringan tikus wistar pada eksperimen ini memerlukan jaringan hepar tikus. Penelitian ini merupakan penelitian payung, yang meneliti efek ekstrak metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar model kanker hepar dengan parameter yang berbeda-beda, antara lain: TNF- α , IL-6, HSP-70, caspase-3, dan lain-lain. Karena itu, setelah 45 hari pemberian per oral daun kelor ketiga puluh tikus dibunuh dengan cara pembiusan eter. Kemudian abdomen dibuka, sebagian jaringan hepar diambil untuk diperiksa aktivasi NF- κ B. Sedangkan bangkai tikus yang sudah

tidak dipakai dikubur dengan aman oleh petugas laboratorium.

4.7.3.3 Metode Pelaksanaan IHK (Imunohistokimia)

Imunohistokimia merupakan suatu proses mengidentifikasi protein spesifik pada jaringan atau sel dengan menggunakan antibodi. Tempat pengikatan antara antibodi dengan protein spesifik diidentifikasi dengan marker yang biasanya dilekatkan pada antibodi dan bisa divisualisasi secara langsung atau dengan reaksi untuk mengidentifikasi marker. Marker dapat berupa senyawa berwarna, zat berfluoresensi, logam berat, label radioaktif, atau enzim.

Metode Imunohistokimia pemeriksaan aktivasi NF- κ B yaitu biakan sel dicuci dengan PBS selama 30 menit dan memfiksasi dengan metanol selama 5 menit. Mengeringanginkan dan mencuci dengan PBS pH 7,4. Mengaplikasikan 3% H₂O₂ selama 10 menit dan mencuci dengan PBS pH 7,4. Mebloking menggunakan serum 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100 dan menginkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Mencuci dengan PBS pH 7,4 dan menetesinya dengan monoclonal anti p50/p65, dan menginkubasi semalam. Mencuci dengan PBS pH 7,4, menetesinya dengan antibodi sekunder berlabel biotin dan menginkubasi selama 1 jam. Mencuci dengan PBS pH 7,4 dan menetesinya dengan SA-HRP (*Strep-Avidin horse radis peroxidase*) selama 40 menit, kemudian mencuci dengan PBS pH 7,4 dan mengaplikasikan cromogen untuk HRP, yaitu DAB (Diamono Benzidine) Counterstain dengan Mayer hematoxilen selama 10 menit membilas dengan air kran dan mencuci dengan dH₂O. Mengeringkan dan menutup dengan *coverglass* (Sarbini dkk., 2007).

4.8 Cara Pemeriksaan Mikroskop

Untuk menghitung jumlah NF- κ B yang teraktivasi maka yang dilihat di mikroskop adalah NF- κ B p50 pada preparat jaringan hepar yang sudah diproses sebelumnya dengan metode immunohistokimia digunakan mikroskop protret di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Preparat diletakkan pada mikroskop dengan perbesaran okular 10x dan perbesaran obyektif 10x. Setelah terlihat jaringan hepar, maka perbesaran obyektif ditambah menjadi 40x. Pengamatan dilakukan pada 10 lapang pandang yang berbeda supaya hasil yang didapatkan bersifat representatif.

4.9 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 ($p = 0,083$), karena itu analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.
3. Uji *One-way* ANOVA: didapatkan nilai rata-rata NF- κ B yang teraktivasi 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. Uji *Homogenous Subsets*: menunjukkan bahwa terdapat 3 subset yang didapatkan pada data, dan dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara subset sesuai hasil uji *Tukey*.



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

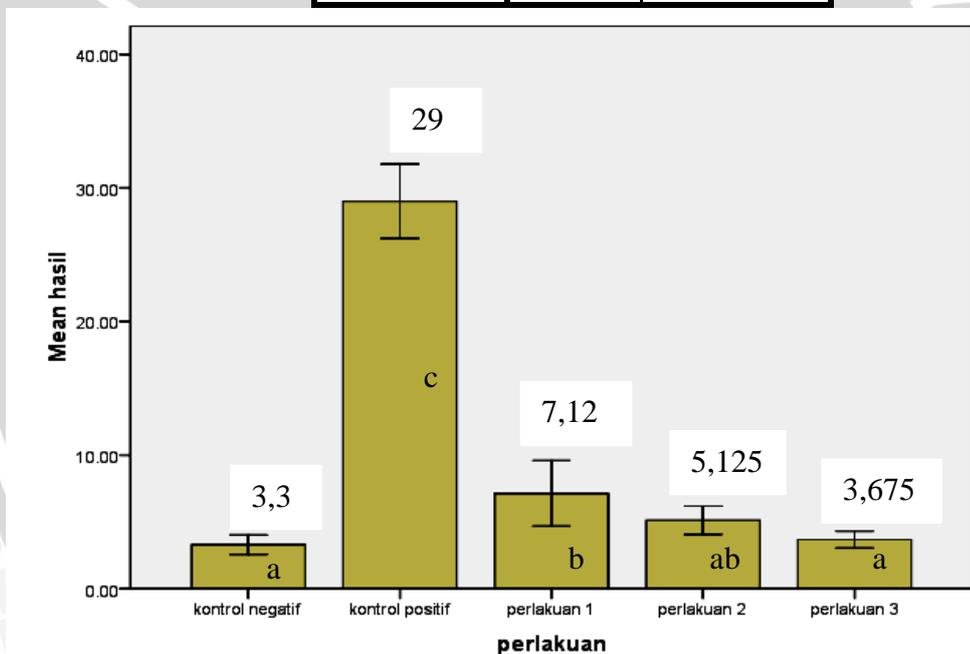
5.1 Hasil Penelitian

Pada penelitian ini didapatkan data hasil untuk masing-masing kelompok perlakuan. Penelitian ini terdiri dari lima macam perlakuan, yaitu kelompok I adalah tikus diberi diet normal saja selama 105 hari (kontrol negatif); kelompok II adalah tikus diberi diet normal dan 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) selama 45 hari (kontrol positif), selanjutnya diet normal tanpa ekstrak metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*); sedangkan kelompok III sampai dengan V (3 kelompok) diberi diet normal dan 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) selama 45 hari, selanjutnya diberi asupan ekstrak metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) dengan dosis berbeda (20, 40 dan 80 mg/ml) secara per oral dengan sonde setiap hari sekali selama 60 hari.

Pemeriksaan jumlah NF- κ B p50 (NF- κ B yang teraktivasi) dengan menggunakan pengecatan IHK (imunohistokimia) dan dihitung di bawah mikroskop dilakukan terhadap semua kelompok dari jaringan hepar tikus Wistar yang diinduksi DMBA. Pemeriksaan rata-rata jumlah NF- κ B p50 dilakukan terhadap masing-masing kelompok perlakuan ditampilkan pada gambar 5.1. Rata-rata pada masing-masing perlakuan dihitung dengan cara menjumlahkan semua jumlah NF- κ B p50 pada masing-masing kelompok perlakuan dibagi dengan jumlah sampel pada masing-masing kelompok perlakuan. Dari enam sampel yang didapat, hanya empat sampel yang diambil karena jumlah pengulangan yang dibutuhkan untuk tiap-tiap kelompok perlakuan dalam penelitian ini adalah 4.

Tabel 5.1 Rata-rata Jumlah NF-κB yang teraktivasi

Perlakuan	Mean	Std. Deviation
kontrol negative	3.3000	.45461
kontrol positif	29.0000	1.74929
perlakuan 1	7.1250	1.54353
perlakuan 2	5.1250	.66521
perlakuan 3	3.6750	.40311
Total	9.6450	10.07328



Gambar 5.1. Grafik Hubungan Antara Kelompok Perlakuan dan Rata-rata Jumlah NF-κB p50. Keterangan: Kontrol Negatif (105 hari diet normal); Kontrol Positif (45 hari diet normal dan DMBA, serta 60 hari diet dan 0 mg/ml kelor); Perlakuan I (45 hari diet normal dan DMBA, serta 60 hari diet dan 20 mg/ml kelor); Perlakuan II (45 hari diet normal dan DMBA, serta 60 hari diet dan 40 mg/ml kelor); Perlakuan III (45 hari diet normal dan DMBA, serta 60 hari 80 mg/ml kelor).

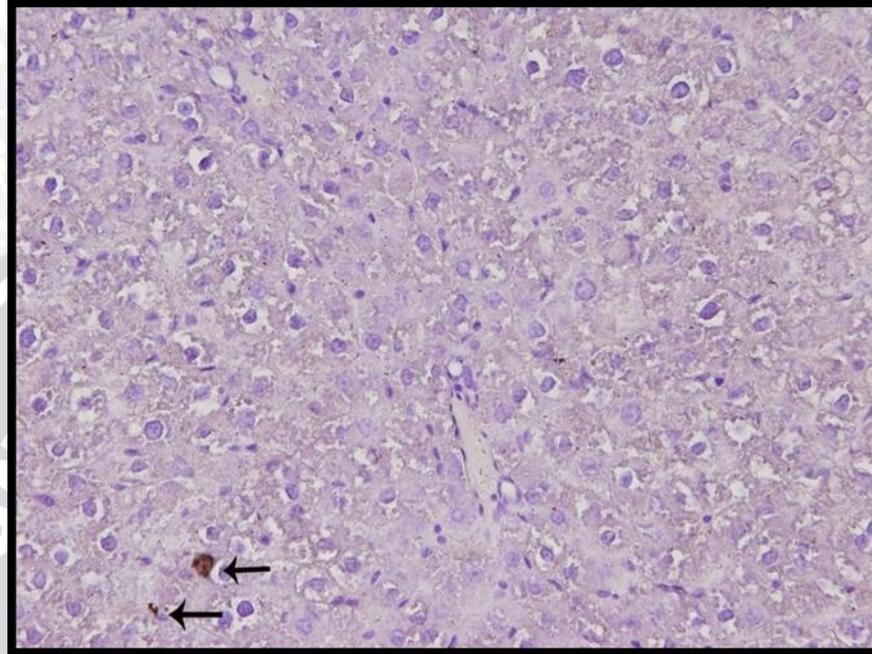
Rata-rata jumlah NF-κB p50 pada kelompok 105 hari diet normal (kontrol negatif) adalah 3,3 sel (dengan perbesaran mikroskop 400x). Rata-rata jumlah

NF-κB p50 pada kelompok yang 45 hari diet normal + DMBA dan 60 hari diet normal + 0 mg/ml ekstrak kelor (kontrol positif) adalah 29 sel (dengan perbesaran mikroskop 400x). Rata-rata jumlah NF-κB p50 pada kelompok 45 hari diet normal + DMBA dan 60 hari diet normal + 20 mg/ml ekstrak methanol Daun Kelor (Perlakuan I) adalah 7,125 sel (dengan perbesaran mikroskop 400x). Rata-rata jumlah NF-κB p50 pada kelompok 45 hari diet normal + DMBA dan 60 hari diet normal + 40 mg/ml ekstrak methanol Daun Kelor (Perlakuan II) adalah 5,125 sel (dengan perbesaran mikroskop 400x). Rata-rata jumlah NF-κB p50 pada kelompok 45 hari diet normal + DMBA dan 60 hari diet normal + 80 mg/ml ekstrak methanol Daun Kelor (Perlakuan III) adalah 3,675 sel (dengan perbesaran mikroskop 400x).

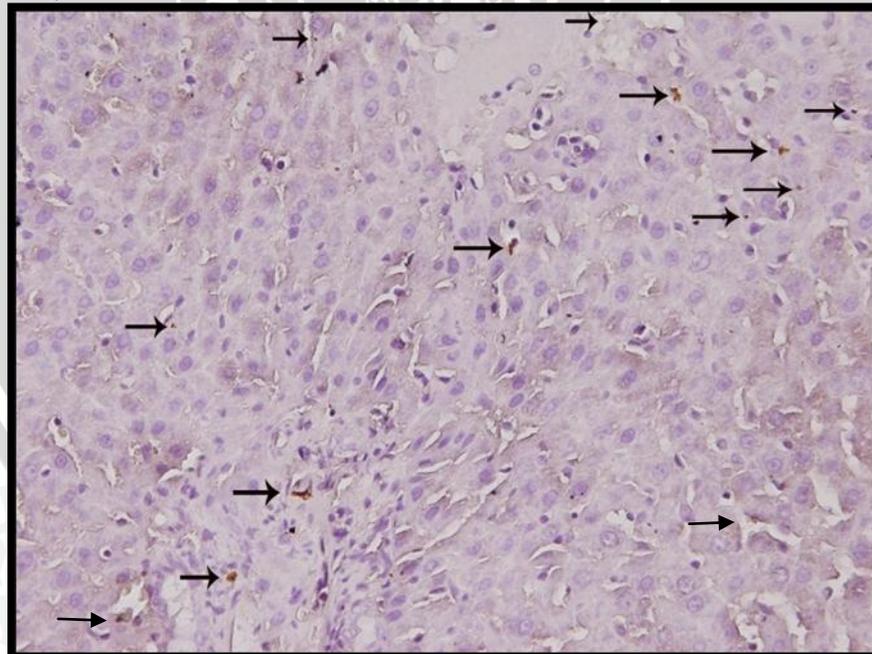
Dari gambar 5.2 terlihat rata-rata jumlah NF-κB p50 yang terendah terdapat pada kelompok perlakuan 45 hari diet normal + DMBA dan diet normal + 80 mg/ml ekstrak methanol Daun Kelor (Perlakuan III) yaitu sebesar 3,675 sel (dengan perbesaran mikroskop 400x). Sedangkan rata-rata jumlah NF-κB p50 tertinggi yang 45 hari diet normal + DMBA dan 60 hari diet normal + 0 mg/ml ekstrak methanol Daun Kelor (kontrol positif) yaitu sebesar 29 sel (dengan perbesaran mikroskop 400x).

Data yang didapatkan dari hasil penelitian “Pengaruh ekstrak metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap penghambatan aktivasi NF-κB pada hepar tikus wistar model *Hepatocellular Carcinoma (HCC)* yang diinduksi DMBA (7,12dimethylbenz(a)anthracene)” dianalisis dengan menggunakan program komputer SPSS 16 untuk Windows XP. Rata-rata jumlah NF-κB p50 berdasarkan gambar 5.2 menunjukkan bahwa pada kelompok P I, P II, P III yang mendapat diet normal, DMBA, dan ekstrak metanol Daun Kelor pada berbagai dosis

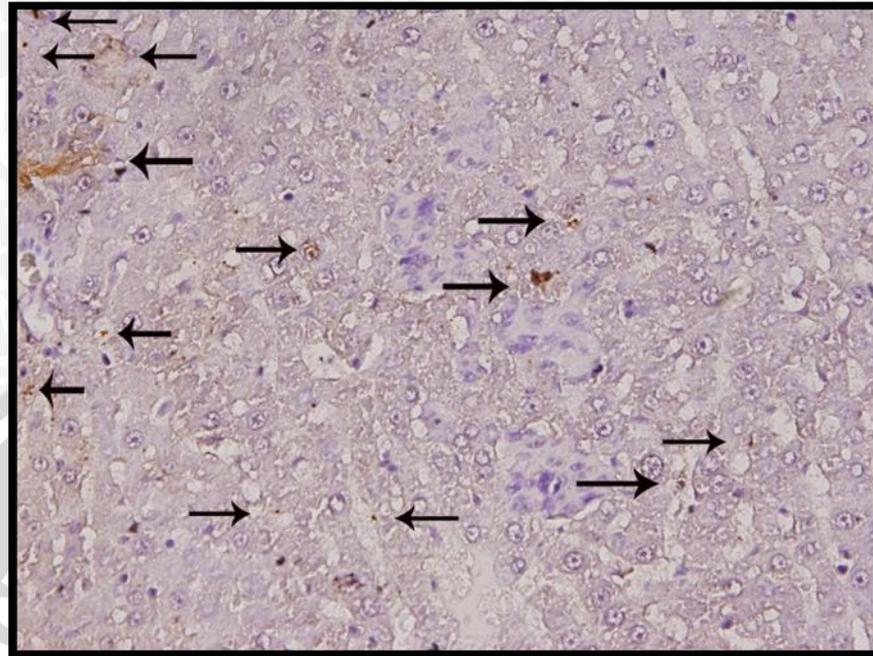
memiliki jumlah NF- κ B p50 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol positif ($p=0,000$).



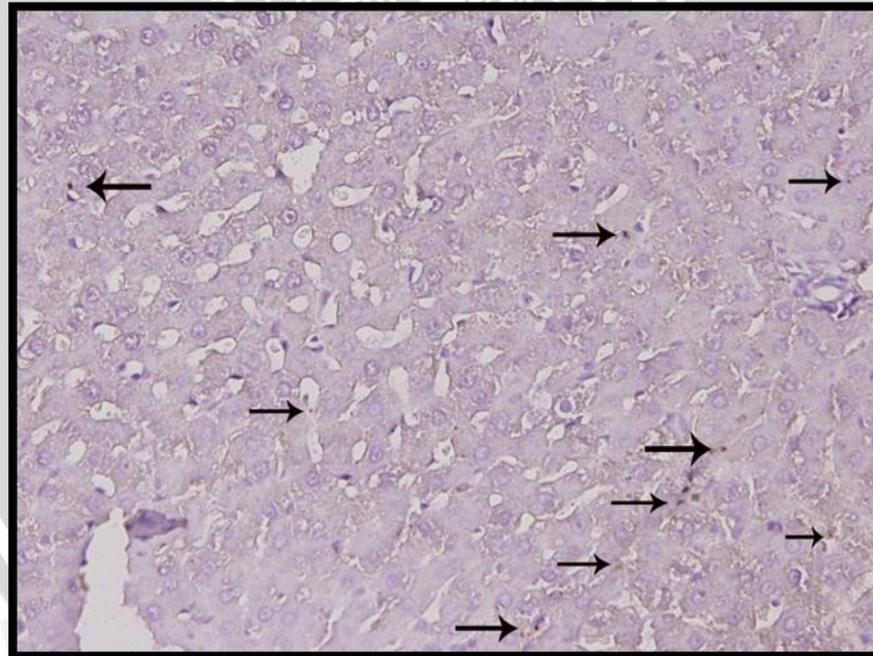
Gambar 5.2. Gambaran Imunohistokimia Jaringan Hepar Tikus Wistar pada Kelompok 1 (Kontrol negatif). Rata-rata NF- κ B yang teraktivasi adalah 3,3 sel (metode IHK, pembesaran 400x).



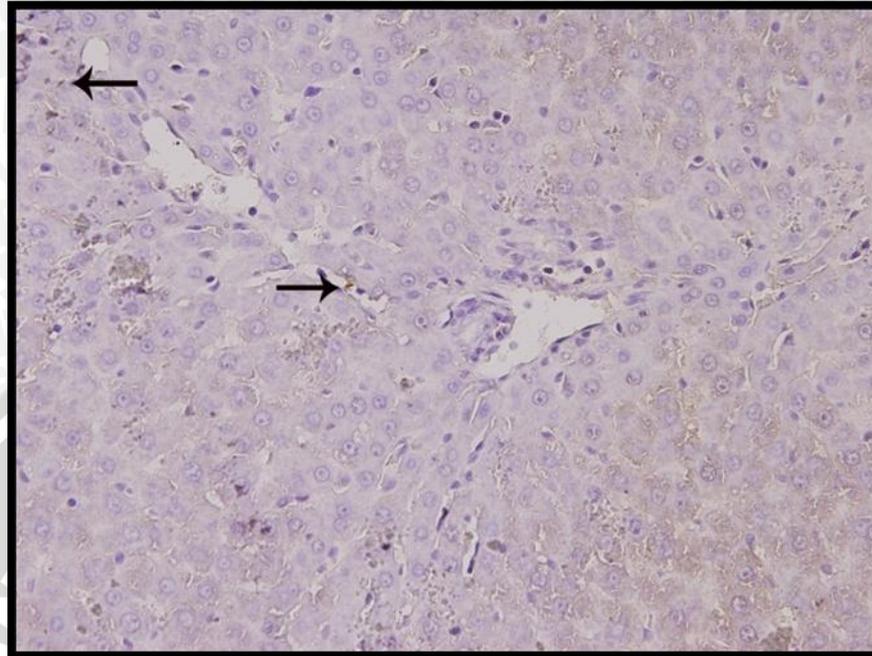
Gambar 5.3. Gambaran Imunohistokimia Jaringan Hepar Tikus Wistar pada Kelompok 2 (Kontrol positif). Rata-rata NF- κ B yang teraktivasi adalah 29 sel. (metode IHK, pembesaran 400x).



Gambar 5.4. Gambaran Imunohistokimia Jaringan Hepar Tikus Wistar pada Kelompok 3 (Perlakuan 1). Rata-rata NF-κB yang teraktivasi adalah 7,125 sel atau menurunkan sekitar 75,4% dari kontrol positif. (metode IHK, pembesaran 400x).



Gambar 5.5. Gambaran Imunohistokimia Jaringan Hepar Tikus Wistar pada Kelompok 4 (Perlakuan 2). Rata-rata NF-κB yang teraktivasi adalah 5,125 sel atau menurunkan sekitar 82,3% dari kontrol positif (metode IHK, pembesaran 400x).



Gambar 5.6. Gambaran Imunohistokimia Jaringan Hepar Tikus Wistar pada Kelompok 5 (Perlakuan 3). Rata-rata NF- κ B yang teraktivasi adalah 3,675 sel atau menurun sekitar 87,3% dari kontrol positif (metode IHK, pembesaran 400x).

5. 2 ANALISIS DATA

Hasil penelitian tersebut diuji dengan uji normalitas data dan homogenitas varian, seperti tersusun dalam lampiran 4 dan 6. Untuk menguji normalitas distribusi data digunakan Shapiro-Wilk. Didapatkan bahwa distribusi data hasil penelitian ini adalah normal. Sedangkan untuk menguji homogenitas varian digunakan *Levene test*. Dari hasil *Levene test* tampak bahwa data berasal dari populasi-populasi yang memiliki varian sama ($p=0,084$). Oleh karena data hasil penelitian memiliki distribusi normal, dan varian yang homogen, dapat dilakukan pengujian *One-way ANOVA*.

Uji ANOVA (Analysis of Variance) (Lampiran 7) dilakukan untuk menguji apakah keempat sampel memiliki rata-rata (*mean*) yang sama. Dari hasil tes tersebut didapatkan nilai rata-rata jumlah NF- κ B p50 dari kelima populasi

memang berbeda ($p=0,000$). Dengan demikian terdapat minimal 2 kelompok yang berbeda signifikan.

Analisis dilanjutkan dengan *Post hoc test (Least Significant Difference)* yang bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA. Pada analisis ini digunakan *Tukey HSD test* (Lampiran 8).

Dari hasil *Tukey HSD test* terdapat perbedaan yang signifikan jumlah NF-kB yang teraktivasi pada jaringan tikus secara nyata antara kontrol negatif dengan kontrol positif ($p=0,000$), kontrol positif dengan perlakuan I (45 hari diet normal + DMBA dan 60 hari diet normal + 20 mg/ml ekstrak metanol Daun Kelor) ($p=0,000$), kontrol positif dengan perlakuan II (45 hari diet normal + DMBA dan 60 hari diet normal + 40 mg/ml ekstrak metanol Daun Kelor) ($p=0,000$), kontrol positif dengan perlakuan III (45 hari diet normal + DMBA dan 60 hari diet normal + 80 mg/ml ekstrak metanol Daun Kelor) ($p=0,000$). Analisis antara kontrol negatif dengan perlakuan I (45 hari diet normal + DMBA dan 60 hari diet normal + 20 mg/ml ekstrak metanol Daun Kelor) ($p=0,02$) masih terdapat perbedaan yang signifikan, sedangkan untuk kelompok kontrol negatif dengan perlakuan II dan perlakuan III tidak berbeda signifikan ($p=0,196$ dan $p=0,989$). Sedangkan kelompok perlakuan I (45 hari diet normal + DMBA dan 60 hari diet normal + 20 mg/ml ekstrak metanol Daun Kelor) dengan perlakuan II (45 hari diet normal + DMBA dan 60 hari diet normal + 40 mg/ml ekstrak metanol Daun Kelor) ($p=0,136$), perlakuan II (45 hari diet normal + DMBA dan 60 hari diet normal + 40 mg/ml ekstrak metanol Daun Kelor) dengan perlakuan III (45 hari diet normal + DMBA dan 60 hari diet normal + 80 mg/hari kelor) ($p=0,392$) juga tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Akan tetapi kelompok perlakuan I dengan kelompok

perlakuan III terdapat perbedaan yang signifikan (0,004).

Untuk melengkapi hasil dari uji *Tukey* digunakan *Homogeneous Subsets* (Lampiran 8) yang digunakan untuk mencari grup atau subset mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata (*Mean Difference*) yang tidak berbeda secara signifikan. Pada subset 1 menunjukkan tiga kelompok, yaitu kelompok I (kontrol negative), kelompok IV (Perlakuan II), dan Kelompok V (Perlakuan III). Pada subset 2 terdapat dua kelompok, yaitu kelompok III (Perlakuan I) dan kelompok IV (Perlakuan II). Pada subset 3 terdapat satu kelompok, yaitu kelompok II (Kontrol Negatif). Dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara subset sesuai hasil uji *Tukey*.

Dari hasil-hasil tersebut dapat dilihat jumlah NF- κ B yang teraktivasi pada kelompok Perlakuan I sampai III (kelompok III sampai V) cenderung menurun. Oleh karena itu dapat diambil kesimpulan bahwa ekstrak metanol Daun Kelor memiliki efek penghambatan aktivasi NF- κ B pada jaringan hepar yang diinduksi DMBA. Dari hasil didapatkan penurunan pada perlakuan I, II dan III. Dan dari hasil ini menunjukkan dosis responnya yaitu pada dosis 20 mg/ml.

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian prevensi kanker melibatkan penggunaan komponen baik natural atau sintetis untuk memperlambat, menghambat, atau mengembalikan perkembangan kanker menjadi kondisi normal atau preneoplastik. Beberapa studi eksperimental dan epidemiologi menunjukkan bahwa *chemoprevention* mempunyai manfaat yang potensial untuk prevensi kanker pada populasi umum dan individu yang berisiko tinggi (Sharma *et al.*, 2012). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap penghambatan aktivasi NF- κ B pada hepar tikus wistar yang diinduksi DMBA serta mengetahui dosis responsif untuk menghambat aktivasi NF- κ B pada hepar tikus wistar model *Hepatocellular carcinoma* yang diinduksi DMBA sehingga nantinya diharapkan dapat menurunkan insiden *HCC*. Dari penelitian ini terlihat penurunan aktivasi NF- κ B sesuai yang diharapkan penulis dan didapatkan dosis respon sebesar 20 mg/ml telah mampu menurunkan jumlah NF- κ B yang teraktivasi sekitar 75% dari pemberian DMBA, namun pada hepar tikus masih belum terjadi kanker seperti yang diharapkan. Pada hepar tikus masih dalam tahap prekanker, hal ini terjadi kemungkinan karena waktu dan dosis DMBA yang kurang dalam pemberian DMBA.

Dalam penelitian ini DMBA terbukti dapat meningkatkan jumlah NF- κ B yang teraktivasi. DMBA menginduksi produksi ROS yang menyebabkan peroksidasi lipid, kerusakan DNA, dan penurunan sistem pertahanan antioksidan (Paliwal *et al.*, 2011). DMBA menyebabkan transformasi neoplastik melalui

kerusakan DNA, akumulasi ROS, dan memediasi inflamasi kronis (Manoharan *et al.*, 2009). ROS inilah yang menginduksi kerusakan di berbagai biomolekul termasuk protein, lipid, lipoprotein, dan DNA (Sreelatha and Padma, 2009). Mediator inflamasi kronis yang dihasilkan oleh makrofag yang teraktifasi akibat induksi DMBA menurut Dolcet (2005) diantaranya adalah sitokin (IL-1, TNF α), faktor pertumbuhan (EGF, IGF), kinase (Ras/MAPK, PI3K/Akt, PKC), dan COX-2. Hal inilah yang mengakibatkan NF- κ B teraktivasi.

Pada penelitian didapatkan bahwa pemberian ekstrak metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) varietas NTT yang mengandung antioksidan dan antiinflamasi dalam kandungan flavonoidnya dapat menyebabkan penghambatan aktivasi NF- κ B sehingga perkembangan *HCC* dapat dihambat. Senada dengan penelitian yang dilakukan oleh Sreelatha dan Padma (2009) yang membuktikan bahwa ekstrak daun *Moringa oleifera* mempunyai aktivitas antioksidan yang potensial sebagai *scavenger* radikal bebas, mencegah kerusakan oksidasi, dan menghasilkan perlindungan melawan kerusakan oksidasi. Dalam penelitiannya ekstrak Daun Kelor secara signifikan dapat menetralkan radikal DPPH (2, 2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl), O $_2^{\cdot-}$, pengeluaran NO, dan kerusakan DNA yang diinduksi H $_2$ O $_2$. DPPH adalah salah satu metode yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan. Metode DPPH didasarkan pada kemampuan antioksidan sebagai *scavenger* dengan mendonorkan atom hidrogen. Namun, dalam penelitian kami ini belum dilakukan pengukuran aktivitas antioksidannya.

Eksresi NF- κ B di sitoplasma pada semua tipe sel, dimana aktivasi dikontrol oleh keluarga protein regulator yaitu inhibitor NF- κ B (I κ B) (Nishikori, 2005). Dalam responnya terhadap stimulus proinflamasi, seperti *Tumor Necrosis Factor* (TNF) atau interleukin 1 β (IL-1 β), kompleks I κ B kinase (I κ k) yang

berkomposisikan subunit katalis I κ B α dan I κ B β dan subunit regulator I κ B γ teraktivasi, menghasilkan fosforilasi I κ B dan memediasi degradasi, sehingga NF- κ B terbebas (He and Karin, 2011). Dalam penelitian ini sel yang dikatakan mengandung NF- κ B yang teraktivasi adalah sel yang berwarna coklat, IHK positif. Seperti diketahui, dengan adanya peningkatan pengeluaran radikal bebas akan mengaktivasi I κ B sehingga akan mengaktivasi NF- κ B yang berada di sitoplasma. Setelah teraktivasi NF- κ B ini akan menuju ke nukleus dan menempel pada DNA untuk kemudian menginaktivasi p53 yang berakibat gagalnya proses apoptosis alamiah (Hussain, 2003).

NF- κ B meregulasi ekspresi gen yang melibatkan beberapa proses yang memerankan peranan penting dalam perkembangan dan progresi kanker seperti proliferasi, migrasi, dan apoptosis. NF- κ B mengaktifkan beberapa gen yang menyupresi apoptosis baik melalui jalur mitokondria (intrinsik) maupun jalur reseptor kematian (ekstrinsik). NF- κ B meregulasi ekspresi protein yang mengganggu jalur kematian reseptor apoptosis. Salah satu targetnya adalah FLIP (*FLICE-Like Inhibitory Protein*). Tingginya level dari FLIP mencegah Caspase-8 berikatan dengan DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*). Hal ini dipercaya bahwa ekspresi FLIP menyebabkan resistensi kematian reseptor apoptosis pada beberapa tipe tumor. Dibuktikan dengan penelitian yang dilakukan oleh rekan dalam penelitian ini juga, Hilda (2012), dengan judul "Efek pemberian ekstrak metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap kadar Caspase 8 pada jaringan hepar tikus wistar yang diinduksi DMBA" didapatkan pada dosis 20 mg/ml ekstrak metanol Daun Kelor telah mampu meningkatkan kadar Caspase 8 setelah pemberian DMBA. Hal ini menjadi bukti bahwa ekstrak metanol dapat menginduksi peningkatan apoptosis pada sel kanker. NF- κ B juga

menginduksi ekspresi dari *Inhibitors of Apoptosis* (IAPs) dan menurunkan ekspresi PTEN. Penurunan PTEN menyebabkan peningkatan aktivitas Akt dan menyupresi apoptosis. Selanjutnya, NF- κ B mengganggu aktivitas transkripsional p53 sehingga menghambat p53 menginduksi apoptosis dengan meningkatkan regulasi gen antiapoptosis dan menurunkan regulasi p53 level. NF- κ B meningkatkan siklus progresi sel dengan meregulasi ekspresi beberapa gen yaitu D1 siklin, D2 siklin, D3 siklin, dan E siklin, c-myc dan c-mycb (Dolcet *et al.*, 2005).

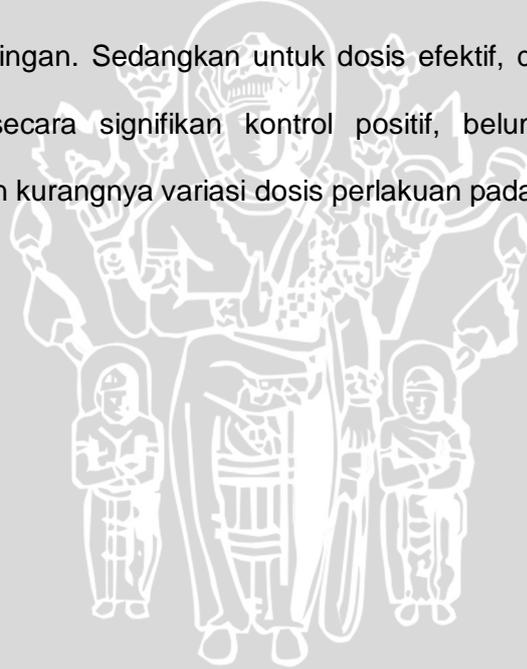
Aggarwal (2006) dalam observasinya menyebutkan bahwa agen anti-inflamasi yang menyupresi NF- κ B atau meregulasi produksi NF- κ B seharusnya mempunyai efek preventif dan dapat digunakan sebagai terapi kanker. Antioksidan sebagai *inflammatory cell modulator* meliputi efek antioksidan pada limfosit T, limfosit B, sel NK, makrofag, monosit, neutrofil, eosinofil, dan platelet. Efek imunofarmakologi antioksidan pada monosit dijelaskan mempengaruhi secara khusus makrofag melalui efek inhibisinya terhadap enzim PTK (Protein Tirosin Kinase) p56 (Middleton, 2002). Dengan adanya inhibisi enzim PTK p56 mengakibatkan PTK tidak aktif yang selanjutnya menyebabkan NF- κ B tetap terikat pada I κ B sehingga NF- κ B tidak dapat menduduki NF- κ B respon elemen yang seharusnya dapat memicu transkripsi dan translasi dari sitokin (Abbas *et al.*, 2004).

Menurut Khalafalla (2010) Daun kelor (*Moringa oleifera*) telah diketahui memiliki berbagai macam aktivitas biologi, termasuk diantaranya hipolipidemik, antiaterosklerosis, pencegahan penyakit kardiovaskuler, sebagai antioksidan, *immune boosting agent*, hipotensi, dan sebagai tumor supresor. Dalam penelitiannya ekstrak etanol Daun Kelor mempunyai aktivitas antioksidan tertinggi dalam menghambat formasi radikal bebas, radikal DPPH (dibandingkan

dengan ekstrak air panas dan air dingin). Namun, dalam penelitian Sultana (2009) didapatkan ekstrak metanol Daun Kelor memiliki total flavonoid terbanyak dibanding dengan ekstrak etanol Daun Kelor. Oleh karena itu, dalam penelitian ini, penulis menggunakan ekstrak metanol Daun Kelor agar didapatkan total flavonoid maksimal sehingga radikal bebas menjadi netral dan penghambatan aktivasi NF- κ B dapat terjadi maksimal pula. Kandungan fitokimia dalam daun kelor yaitu tannin, steroid dan triterpenoid, flavanoid, saponin, antraquinon, dan alkaloid (Kasolo *et al.*, 2010). Flavonoid inilah yang mempengaruhi berbagai macam aktivitas biologi atau farmakologi, diantaranya antioksidan, antitumor, antiangiogenik, antiinflamasi, antialergi, dan antiviral. Flavonoid menghambat perkembangan kanker melalui penghambatan mediator inflamasi dan radikal bebas (Aggarwal *et al.*, 2006).

Menurut Waji (2009) flavonoid termasuk senyawa fenolik alam yang potensial sebagai antioksidan dan mempunyai bioaktivitas sebagai obat. Flavonoid merupakan sekelompok besar antioksidan bernama polifenol yang terdiri atas antosianidin, biflavan, katekin, flavanon, flavon, dan flavonol. Kuersetin (*Quersetin*) adalah salah satu zat aktif kelas flavonoid yang secara biologis amat kuat dan merupakan senyawa kelompok flavonol terbesar, 60-75% dari total flavonoid. Bila vitamin C mempunyai aktivitas antioksidan 1, maka kuersetin memiliki antioksidan 4,7. Oleh karena itu, kuersetin dari flavonoid diduga menjadi faktor penyebab radikal bebas menjadi netral sehingga dapat menurunkan agen proinflamasi yang selanjutnya dapat mempengaruhi aktivasi NF- κ B. Namun, dalam penelitian ini belum dilakukan uji kandungan dari kuersetin atau zat aktif lain dari flavonoid dalam Daun Kelor yang dapat menurunkan aktivasi NF- κ B.

Dalam penelitian ini juga belum diketahui besar dosis optimal dan dosis efektifnya. Dosis optimum adalah dosis maksimal yang dapat memberikan efek antioksidan terbaik dan apabila ditingkatkan dosisnya dapat memberi efek samping yang buruk, seperti efek prooksidan. Menurut Dewi (2007) konsentrasi antioksidan yang ditambahkan dapat mempengaruhi laju oksidasi. Pada konsentrasi tinggi, aktivitas antioksidan grup fenolik sering lenyap bahkan antioksidan tersebut berubah menjadi prooksidan. Prooksidan adalah bahan kimia yang dapat menginduksi stres oksidasi melalui peningkatan ROS atau menghambat sistem antioksidan tubuh. Stres oksidasi ini mengakibatkan kerusakan sel dan jaringan. Sedangkan untuk dosis efektif, dosis terkecil yang dapat menurunkan secara signifikan kontrol positif, belum bisa diketahui. Keduanya dikarenakan kurangnya variasi dosis perlakuan pada penelitian ini.



BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa:

1. Pemberian ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) mampu menghambat aktivasi NF- κ B pada jaringan hepar tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar yang dipapar diet DMBA (7,12 dimethylbenz(a)anthracene).
2. Dosis respon ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) yang berefek menghambat NF- κ B pada tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar dengan diet DMBA (7,12 dimethylbenz(a)anthracene) adalah 20 mg/ml.

7.2 Saran

Dari penelitian ini, saran yang dapat diajukan untuk penelitian lebih lanjut adalah:

1. Dilakukan uji kandungan kuersetin dan zat aktif lainnya dari flavonoid yang dapat menurunkan aktivasi NF- κ B secara signifikan
2. Dilakukan penambahan variasi dosis perlakuan untuk mengetahui dosis optimum dan dosis efektif dari pemberian ekstrak metanol Daun Kelor
3. Dilakukan uji aktivitas antioksidan pada Daun Kelor

DAFTAR PUSTAKA

Abdel-Hamid, N.M., Nazmy, M.H., Mahmoud, A.W., Fawzy, A.M., Youssef, M. A Survey on Herbal Management of Hepatocellular Carcinoma. *World Journal of Hepatology*, 2011; 3 (7): 175-183.

Aggarwal, B.B., Shishodia, S., Sandur, S.K., Pandey, M.K., Sethi, G. 2006. Inflammation and cancer: How hot is link?, In: Aggarwal B.B. (Ed), *Biochemical Pharmacology 72*, Elsevier, Singapore, p. 1605-1621.

Al-attar, A.M. The Influence of Dietary Grapeseed Oil on DMBA-Induced Liver Enzyme Disturbance in the Frog, *Rana ridibunda*. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2004; 3 (5): 304-309.

Ayesha, Ahmed. Prognostic And Therapeutic Role of Nuclear Factor-kappa B (NF- κ B) in Breast Cancer. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 2010; 22(3): 218-221.

Bruix, J. and Sherman, M. Management of Hepatocellular carcinoma, *Hepatology*, 2005; 42(5): 1208-1236.

Dewi, J.R., Estiasih, T., Murtini, E.S. Aktivitas Antioksidan Dedak Sorgosum Lokal Varietas Coklat (*Sorghum bicolor*) Hasil Ekstraksi Berbagai Pelarut. *Jurnal Teknologi Pertanian*. 2007; 8(3): 188-197.

Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J., Matias-Guiu, M. NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchow Arch*, 2005; 446: 475-482.

El-serag, H.B., Marrero, J.A., Rudolph, L., Reddy, K.R. Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma, *Gastroenterology*, 2008; 134: 1752-1763.

Eroschenko, Victor P. 2008. *Atlas histology diFiore: dengan Korelasi Fungsional*, Edisi 11, Pendit BU (penerjemah), 2008, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, Indonesia, hal. 325-326.

Gallego, J.G. and Tunon. 2007. Anti-inflammatory properties of dietary

flavonoids. *Nutrition Hospitalaria*, 2007; 22 (3): 287-93.

Gomma, A.I., Khan, S.A., Toledano, M.B., Waked, I., Taylor-Robinson, Simon D. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, risk factors and pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 2008; 14 (27): 4300-4308.

Guyton AC and Hall JE. 2006. *Buku Ajar Fisiologi kedokteran*, Edisi 11, Irawati dkk (penerjemah), 2007, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, Indonesia, hal. 902-908.

He, G. and Karin, M. NF- κ B and STAT3 – key players in liver inflammation and cancer. *Cell Research*, 2011; 21: 159-168.

Hilda, Maria. 2012. *Efek pemberian ekstrak metanol Daun Kelor (Moringa oleifera) terhadap kadar Caspase 8 pada jaringan hepar tikus wistar yang diinduksi DMBA*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Hsu, R., Midcap, S., Arbainsyah, Witte, D.L. *Moringa oleifera, Medical and Socio-Economic uses*. Makalah disajikan dalam International Course on Economic Botany, National Herbarium Leiden, Netherlands, September 2006.

Hussain, S.Perwes, J.Hofsef, Lome, Haris, Curtis C. 2003. Radical Causes of Cancer. *Nature Review: Cancer*. Volume 3 April 2003:277.

Indra, R., Hernowati, T.E., Satuman. 2011. *Pengaruh Ekstrak Daun Kelor (Moringa oleifera) Terhadap Efek Karsinogenik Polutan 7, 12 Dimethyl Benz(a)Anthracene (DMBA) pada Tikus Wistar Melalui Penghambatan Aktifitas Telomerase dan Induksi Apoptosis*. Usulan Hibah Penelitian Program Hibah Kompetisi Peningkatan Kualitas Pendidikan Dokter, Universitas Brawijaya, Malang.

Integrated Taxonomic Information System. 2000. *IT IS Report*.

Kasolo, J.N., Bimeya, G.S., Ojok, L., Ochieng, J., Okwal-okeng, J.W. Phytochemicals and Uses of Moringa oleifera Leaves in Ugandan Rural Communities. *Journal of Medical Plant Research*, 2010; Vol. 4(9): 753-757.

Khalafalla, M.M., Abdellatef, E., Dafalla, H., Nassrallah, A.A., Aboul-Enein,

K.M., Lightfoot, D.A., *et al.* Active principle from *Moringa oleifera* Lam leaves effective against two leukemias and a hepatocarcinoma. *African Journal of Biotechnology*, 2010; 9(49): 8467-8471.

Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L. 2003. *Buku Ajar Patologi Robbins*, Ed. 7, Vol. 1. Prasetyo A, Pendit BU, Prilliono T (penerjemah). 2004. Penerbit Buku Kedokteran ECG, Jakarta, Indonesia. hal. 35-64.

Lawrence, T. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harbor Perspective in Biology*, 2009; 1: a001651.

Li, W., Tan. D., Zenali, M.J., Brown, R.E. Constitutive activation of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signaling pathway in fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Int j Clin Exp Pathol*, 2009; 3 (3): 238-243.

Manoharan, S., Muneeswaran, M., Baskaran, N. Chemopreventive efficacy of berberine in 7,12-dimethylbenz(α)anthracene (DMBA) induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. *Int. J. Res. Pharm.Sci*, 2010; 1(4): 521-529.

Middleton, Jr E., Susilowati, S., Taminatun, S., Murwanti, R., Sugiyanto. 2007. *The effect of Plant Flavonoids on Mammalian cells: Implication for Inflammation, Heart Disease, and Cancer*. Pharmacological Review.

Mutasim *et al.* 2010. *Active principle from Moringa oleifera* Lam leaves effective against two leukemias and a hepatocarcinoma. Commission for Biotechnology and Genetic Engineering Sudan: 8467-8471.

Nishikori, M. Classical and Alternatif NF-Kb Activation Pathways and Their Roles in Lymphoid Malignancies. *J Clin Exp Hematopathol*, 2005; 45(1): 15-24.

Paliwal, R., Sharma, V., Pracheta, Sharma, S.H. Hepatoprotective and Antioxidant Potential of *Moringa oleifera* Pods Against DMBA-Induced Hepatocarcinogenesis in Male Mice. *International Journal of Drug Development of Research*, 2011; 3 (2): 128-138.

Parvathy M, Umamaheswari A, 2007. *Cytotoxic Effect of Moringa oleifera*

leaf extracts on human multiple myeloma cell lines, (online), (<http://scialert.net/qredirect.php?doi=tmr.2007.44.50&linkid=pdf>) diakses tanggal 10 Januari 2012)

Sarbini D, Sargowo D, Rohman MS. Efek Ekstrak The Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap Penghambatan Aktivasi NF- κ B, Ekspresi Protein TNF α dan ICAM-1 pada biakan HUVECS yang dipapar dengan Low Density Lipoprotein Teroksidasi. *Jurnal Kardiologi Indonesia*, 2007; 28: 133-141.

Setyawan, A.D., Darusman, L.K., Riview : Senyawa Biflavonoid dari *Selaginella* Pal. Beauv. Dan Pemanfaatannya. *Biodiversitas*, 2008; 9(1): 64-81.

Sharma Veena, Paliwal Ritu, Janmeda Pracheta, Sharma Shatruhan. Chemoprevention Efficacy of *Moringa oleifera* Pod Against 7, 12-Dimethylbenz(a)anthracene Induced Hepatic Carcinogenesis in Mice. *Asian Pasific Journal of Cancer Prevention*, 2012.13.6.2563.

Sharma, H., Parihar, L., Parihar, P. Review on cancer and anticancerous properties of some medical plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011; 5(10): 1818-1835.

Sreelatha, S. and Padma, P.R. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of *Moringa oleifera* Leaves in Two Stage of Maturity. *Plant Foods Hum Nutr*, 2009; 64: 303-311.

Sudoyo, Aru W., Setiyohadi, B., Alwi, I., Marcellus, S.K., Setiati, S. 2009. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid 1*, Edisi V, InternalPublishing, Jakarta Pusat, hal.685.

Sultana, B., Anwar, F., Ashraf, M. Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules*. 2009; 14: 2167-2180.

Venook, Alan P., Papandreou C., Furuse J., Ladron de Guevara, L. The Incidence and Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma: A Global and Regional Perspective. *The Oncologist*, 2010; 15 (suppl 4): 5-13.

Waji, R.A., dan Sugrani, Andis. 2009. *Flavonoid*. Makalah disajikan dalam Tugas Program S2, Universitas Hasanudin, Makassar.

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Katarina Tri Oktaviana

NIM : 0910710089

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, 23 November 2012

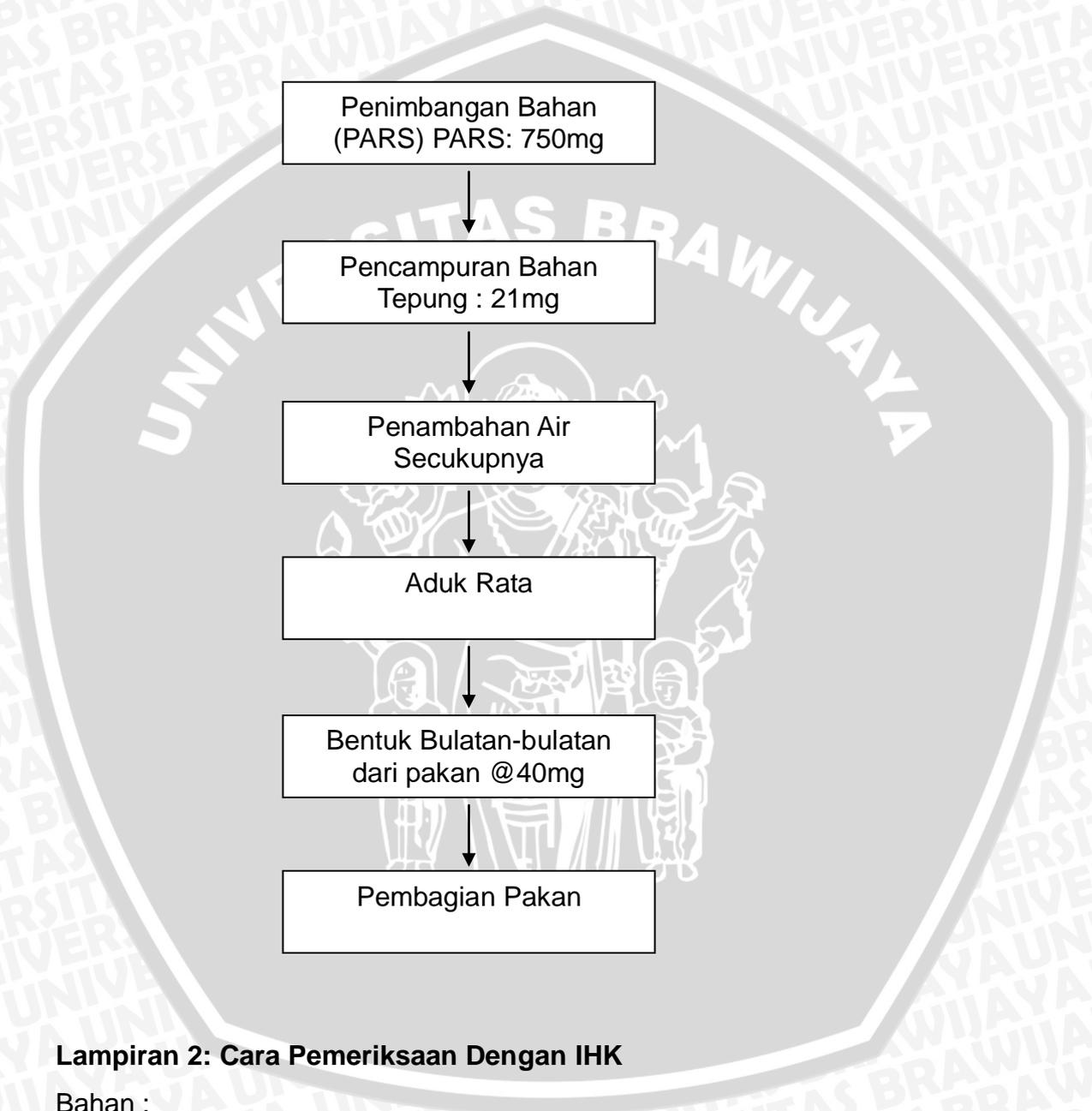
Yang membuat pernyataan

Katarina Tri Oktaviana

0910710089

LAMPIRAN

Lampiran 1: Diagram Alur Pembuatan Diet Normal



Lampiran 2: Cara Pemeriksaan Dengan IHK

Bahan :

- Xylol
- Alkohol 100%
- Alkohol 95%
- Alkohol 90%

- Alkohol 80%
- Alkohol 70%
- H₂O₂ 3%
- PBS PH 7,4
- BSA 1% / FBS 10%
- Ab. Primer
- Ab. Sekunder IgG biotin labellet
- SA HRP
- Meyer Hematoxilen
- DAB
- Akuades
- Air kran
- Entelan
- Sampel Jaringan

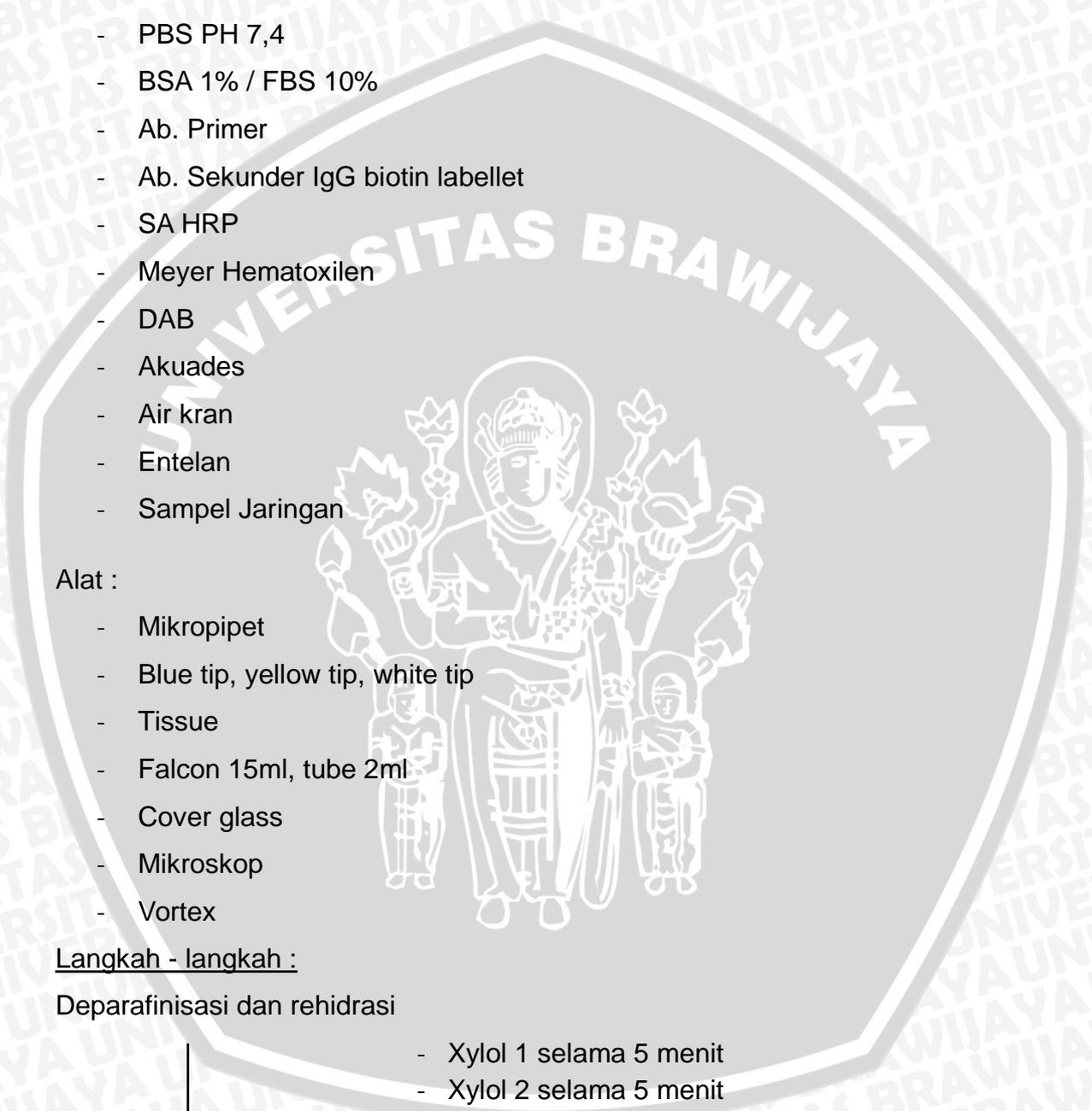
Alat :

- Mikropipet
- Blue tip, yellow tip, white tip
- Tissue
- Falcon 15ml, tube 2ml
- Cover glass
- Mikroskop
- Vortex

Langkah - langkah :

Deparafinisasi dan rehidrasi

- Xylol 1 selama 5 menit
- Xylol 2 selama 5 menit
- Xylol 3 selama 5 menit
- Alkohol 100% selama 5 menit
- Alkohol 95% selama 5 menit
- Alkohol 90% selama 5 menit
- Alkohol 80% selama 5 menit
- Alkohol 70% selama 5 menit



Cuci dengan PBS PH 7,4 (3 x 5 menit)



H₂O₂ 3% selama 20 menit



Cuci dengan PBS PH 7,4 (3 x 5 menit)



Bloking dengan BSA 1% selama 30 menit



Cuci dengan PBS 1 jam, Temperatur : 37°C



AB sekunder IgG Biotin dalam PBS 1 jam, Temperatur ruang



Cuci dengan PBS PH 7,4 (2 x 5 menit)



SA HRP dalam PBS 1 jam, temperature ruang



DAB 30-60 menit (coklat)



Cuci dengan PBS PH 7,4 (2 x 5 menit)



Counterstain dengan meyer hematoxylen (biru) 1 : 10



Cuci dengan air secukupnya



Mounting dengan entelan

Lampiran 3: Tabel Jumlah NF-Kb p50 (NF-κB yang teraktivasi) (IHK)

Lapangan pandang											
Perlakuan	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Jumlah



k(-)	1	3	3	4	4	3	1	5	7	2	33
k(-)	5	1	3	4	1	5	4	4	3	4	34
k(-)	6	4	4	3	0	3	1	2	1	3	27
k(-)	3	7	4	5	3	2	3	3	5	3	38
k(+)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
k(+)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
k(+)	37	46	39	17	18	25	30	17	19	39	287
k(+)	35	37	46	47	43	15	26	20	11	30	310
k(+)	40	42	34	16	11	21	18	44	21	21	268
k(+)	44	41	33	50	22	28	20	14	30	13	295
p1	12	10	8	5	12	7	7	8	11	12	92
p1	8	9	9	8	4	9	5	8	6	8	74
p1	4	7	10	9	6	3	8	2	6	4	59
p1	4	6	5	6	5	6	10	5	7	6	60
p2	4	4	2	13	6	7	4	3	3	4	50
p2	9	6	4	4	3	3	2	4	5	3	43
p2	6	5	6	5	5	7	6	6	7	6	59
p2	5	6	8	5	5	8	5	5	4	2	53
p3	5	5	3	4	3	4	3	5	4	3	39
p3	3	3	4	2	5	5	6	2	2	5	37
p3	4	4	2	2	4	5	2	3	2	3	31
p3	5	2	4	3	4	7	4	4	3	4	40

Lampiran 4: Tabel Test of Normality (Uji Normalitas Data)

Tests of Normality							
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
hasil	kontrol negatif	.250	4	.	.963	4	.797
	kontrol positif	.182	4	.	.993	4	.973
	perlakuan 1	.267	4	.	.875	4	.318
	perlakuan 2	.175	4	.	.995	4	.983
	perlakuan 3	.275	4	.	.871	4	.304

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 5: Tabel Groups Statistic

Report

hasil



perlakuan	Mean	Std. Deviation	Std. Error of Mean	Minimum	Maximum
kontrol negatif	3.3000	.45461	.22730	2.70	3.80
kontrol positif	29.0000	1.74929	.87464	26.80	31.00
perlakuan 1	7.1250	1.54353	.77177	5.90	9.20
perlakuan 2	5.1250	.66521	.33260	4.30	5.90
perlakuan 3	3.6750	.40311	.20156	3.10	4.00
Total	9.6450	10.07328	2.25245	2.70	31.00

Lampiran 6 : Tabel Homogeneity of Variances Test
 Test of Homogeneity of Variances

hasil

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.526	4	15	.084

Lampiran 7 : Tabel Uji ANOVA

ANOVA

hasil	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1909.187	4	477.297	381.583	.000
Within Groups	18.763	15	1.251		
Total	1927.950	19			

Lampiran 8 : Tabel Tukey HSD test

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	-25.7000 [*]	.79083	.000	-28.1420	-23.2580
	perlakuan 1	-3.82500 [*]	.79083	.002	-6.2670	-1.3830
	perlakuan 2	-1.82500	.79083	.196	-4.2670	.6170
	perlakuan 3	-.37500	.79083	.989	-2.8170	2.0670
kontrol positif	kontrol negatif	25.70000 [*]	.79083	.000	23.2580	28.1420
	perlakuan 1	21.87500 [*]	.79083	.000	19.4330	24.3170
	perlakuan 2	23.87500 [*]	.79083	.000	21.4330	26.3170



	perlakuan 3	25.32500 [*]	.79083	.000	22.8830	27.7670
perlakuan 1	kontrol negatif	3.82500 [*]	.79083	.002	1.3830	6.2670
	kontrol positif	-21.87500 [*]	.79083	.000	-24.3170	-19.4330
	perlakuan 2	2.00000	.79083	.136	-.4420	4.4420
	perlakuan 3	3.45000 [*]	.79083	.004	1.0080	5.8920
perlakuan 2	kontrol negatif	1.82500	.79083	.196	-.6170	4.2670
	kontrol positif	-23.87500 [*]	.79083	.000	-26.3170	-21.4330
	perlakuan 1	-2.00000	.79083	.136	-4.4420	.4420
	perlakuan 3	1.45000	.79083	.392	-.9920	3.8920
perlakuan 3	kontrol negatif	.37500	.79083	.989	-2.0670	2.8170
	kontrol positif	-25.32500 [*]	.79083	.000	-27.7670	-22.8830
	perlakuan 1	-3.45000 [*]	.79083	.004	-5.8920	-1.0080
	perlakuan 2	-1.45000	.79083	.392	-3.8920	.9920

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

Lampiran 9 : Tabel Homogenous Subset hasil

Tukey HSD

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
kontrol negatif	4	3.3000		
perlakuan 3	4	3.6750		
perlakuan 2	4	5.1250	5.1250	
perlakuan 1	4		7.1250	
kontrol positif	4			29.0000
Sig.		.196	.136	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 10 : Proses Pengerjaan Preparat Histopatologi

I. Proses pemotongan jaringan berupa makros

1. Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan yang akan diteliti.
2. Jaringan dipotong kurang lebih ketebalan 2-3 mm.
3. Dimasukkan ke kaset sesuai dengan kode gross.
4. Dimasukkan ke larutan formalin 10%.
5. Diproses menggunakan alat atau mesin Tissue Tex Processor.

II. Proses pengeblokan dan pemotongan Jaringan

1. Jaringan diangkat dari mesin Tissue Tex Processor.
2. Kemudian jaringan di blok dengan parafin sesuai kode jaringan.
3. Jaringan dipotong dengan mesin microtome ketebalan 3-5 mikron.

III. Proses deparafinisasi

Setelah disayat atau dipotong sesuai dengan ketebalan kemudian ditaruh dalam oven selama 15 menit kurang lebih 70 derajat, kemudian dimasukkan kedalam larutan sytol masing-masing 15 menit dengan temperatur suhu sytol 70 derajat.

IV. Proses pewarnaan

1. Dicelupkan ke masing-masing tabung alkohol 96% selama 3 menit.
2. Masukkan atau cuci ke dalam air mengalir selama 10 menit.
3. Siap di cat.

