

**PENGARUH EKSTRAK METHANOL DAUN KELOR  
(*MORINGA OLEIFERA*) TERHADAP JUMLAH CD68  
MAKROFAG PADA HEPATOKARSINOGENESIS *RATTUS*  
*NOVERGICUS* GALUR WISTAR YANG DIINDUKSI DMBA  
(7,12 DIMETYLBENZENE ALFA ANTHRACENE)**

**TUGAS AKHIR**



**FIRDAH ZUNJAR FADHILAH**  
**NIM: 0910710073**

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

**HALAMAN PERSETUJUAN**

**TUGAS AKHIR**

**PENGARUH EKSTRAK METHANOL DAUN KELOR (*MORINGA OLEIFERA*)  
TERHADAP JUMLAH CD68 MAKROFAG PADA HEPATOKARSINOGENESIS  
*RATTUS NOVERGICUS* GALUR WISTAR YANG DIINDUKSI DMBA (7,12  
*DIMETHYLBENZENE ALFA ANTHRACENE*)**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**

Oleh:

Firdah Zuniar Fadhilah

NIM: 0910710073

Menyetujui :

Pembimbing I

Pembimbing II

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

NIP. 19500525 198002 1 001

Dr. dr. Kusworini, M. Kes, Sp.PK

NIP. 19560331 198802 2 001

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**PENGARUH EKSTRAK METHANOL DAUN KELOR (*MORINGA OLEIFERA*)  
TERHADAP JUMLAH CD68 MAKROFAG PADA HEPATOKARSINOGENESIS  
*RATTUS NOVERGICUS* GALUR WISTAR YANG DIINDUKSI DMBA (7,12  
*DIMETYL*BENZENE ALFA ANTHRACENE)**

Oleh:

Firdah Zuniar Fadhilah

NIM: 0910710073

Telah diuji pada

Hari: Selasa

Tanggal: 18 Desember 2012

Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I

Dr. dr. Nurdiana, M. Kes

NIP. 19551015 198603 2 001

Penguji II/Pembimbing I

Penguji III/Pembimbing II

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

NIP. 19500525 198002 1 001

Dr. dr. Kusworini, M. Kes, Sp.PK

NIP. 19560331 198802 2 001

## KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT yang telah memberi petunjuk dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir dengan judul “Pengaruh Ekstrak Methanol Daun Kelor (*Moringa Oleifera*) terhadap Jumlah CD68 Makrofag pada Hepatokarsinogenesis Rattus Novergicus Galur Wistar yang Diinduksi DMBA (7,12 Dimetylbenzene Alfa Anthracene)”.

Ketertarikan dalam pemilihan topik ini didasari pada tingginya angka kejadian kanker hepar yang menempati peringkat 5 dunia. Pengobatan yang aman dan efektif belum ditemukan sehingga usaha untuk menemukan obat dari sumber alam nabati terus dilakukan. Daun kelor (*Moringa oleifera*) merupakan salah satu tanaman yang diharapkan dapat digunakan sebagai obat herbal kanker hepar. Pengaruh daun kelor terhadap hepatokarsinogenesis akan diteliti melalui ekspresi CD68 Makrofag.

Dengan selesainya Tugas akhir ini, penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Dr. dr. Karyono M, SpPA, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Prof. Dr. dr. Rasjad Indra, MS, selaku pembimbing pertama yang dengan sabar membimbing dari awal hingga akhir sehingga saya dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
3. Dr. dr. Kusworini, M. Kes, Sp.PK, selaku pembimbing kedua yang telah membimbing penulisan dan analisis data dan senantiasa memberi semangat sehingga saya dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
4. Dr. dr. Nurdiana, M. Kes, sebagai penguji Tugas Akhir.

5. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB.
6. Para analis di laboratorium FAAL dan PA yang telah membantu saya dalam menyelesaikan penelitian ini.
7. Yang tercinta ayahanda Moch. Dawud dan ibunda Ida Fitriyah, serta adik-adikku Wijhatuz Zaahirah, Hafizh El Hudzaifie, Nabiilla El Adawy, dan Noufal Quais El Akhdar atas segala pengertian dan kasih sayangnya.
8. Moch. Dimas Rachmandika atas segala do'a dan dukungannya.
9. Sahabatku Banner's (Meidiana Pertiwi, Mayya Mumtaz Maharani, Edah Humaidah dan Fitria Nurindro) atas segala semangat dan masukannya.
10. Teman-teman DPM FKUB 2012 atas segala pengalaman yang luar biasa.
11. Teman-teman Tim Kelor atas kerjasamanya.
12. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

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, Desember 2012

Penulis

## ABSTRAK

Fadhilah, Firdah Z.. 2012. Pengaruh Ekstrak Methanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Jumlah CD68 Makrofag pada Hepatokarsinogenesis *Rattus novergicus* Galur Wistar yang diinduksi DMBA (7,12 dimethylbenzene alfa anthracene). Tugas Akhir, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS. (K) (2) Dr. dr. Kusworini, M. Kes, Sp. PK.

Makrofag adalah kunci terjadinya inflamasi kronis yang turut berperan dalam pertumbuhan dan perkembangan sel kanker. Daun kelor (*Moringa oleifera*) mengandung flavonoid (quercetin dan kaempferol) sebagai antioksidan sehingga diharapkan dapat berperan pula di proses inflamasi kronis pada hepatokarsinogenesis. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap penurunan jumlah CD68 Makrofag pada hepatokarsinogenesis tikus wistar yang diinduksi DMBA. Pada penelitian ini digunakan rancangan eksperimental pada 5 kelompok tikus. Tiap kelompok terdiri dari 6 tikus kecuali kelompok 2 yang terdiri dari 9 tikus. Selama 105 hari kelompok 1 (kontrol negatif) diberi diet normal saja, pada kelompok 2 (kontrol positif) tikus diberi diet normal dan DMBA 10 mg/hari selama 45 hari. Sedangkan kelompok 3-5 (perlakuan I-III) diberi diet normal, DMBA 10 mg/hari dan kelor dengan dosis yang berbeda (20, 40, 80 mg/hari) selama 60 hari. Penghitungan jumlah CD68 yang teraktivasi pada sel hepar dilakukan dengan imunohistokimia. Analisis data yang dikerjakan dengan metode *one way* Anova dan dilanjutkan dengan Post Hoc Tukey, menunjukkan bahwa pemberian ekstrak methanol daun kelor menurunkan jumlah CD68 Makrofag secara signifikan ( $p < 0,05$ ). Kesimpulan penelitian ini adalah bahwa ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan jumlah CD68 Makrofag pada hepatokarsinogenesis tikus wistar yang diinduksi DMBA dengan dosis optimal 40 mg/hari.

Kata Kunci: ekstrak methanol daun kelor, CD68 Makrofag, DMBA

## ABSTRACT

Fadhilah, Firdah Z.. 2012. *Effect of Methanol Leaf Extracts Kelor (Moringa oleifera Leaves) to The Number of CD68 Macrophage on Rattus novergicus Wistar Strain Hepatocarcinogenesis Induced by DMBA (7,12 dimethylbenzene alfa anthracene)*. Final Assignment, Medical Faculty of Brawijaya University. Supervisors: (1) Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS. (K) (2) Dr. dr. Kusworini, M. Kes, Sp. PK.

Macrophages are key to the occurrence of chronic inflammation play a role in cancer cell growth and development. Leaves of Kelor (*Moringa oleifera*) contains flavonoids (quercetin and kaempferol) as an antioxidant that is expected to play a role also in the chronic inflammatory process hepatocarcinogenesis. The purpose of this study was to determine the effect of methanol extract of leaves of *Moringa oleifera* to decrease the number of CD68 macrophages in hepatocarcinogenesis DMBA induced wistar rats. This research used an experimental design in five groups of rats. Each group consisted of 6 rats except group 2, which consisted of nine mice. During the 105 days of group 1 (negative control) were given a normal diet, the second group (positive control) rats fed a normal diet and DMBA 10 mg / day for 45 days. While the 3-5 group (treatment I-III) were given a normal diet, DMBA 10 mg / day and moringa with different doses (20, 40, 80 mg / day) for 60 days. Counting the number of CD68-activated in hepatic cells is done by immunohistochemistry. Data analysis was done by the method of one-way ANOVA, followed by Tukey's Post Hoc, showed that administration of methanol extract of leaves of *Moringa* reduce the number of CD68 macrophages was significantly ( $p < 0.05$ ). The conclusion of this study is that the methanol extract of leaves of *Moringa oleifera* can decrease the number of CD68 macrophages in wistar rats hepatocarcinogenesis DMBA induced by optimal doses of 40 mg/day.

Keywords: methanol extracts of Kelor, CD68 Macrophage, DMBA

DAFTAR ISI

Halaman Judul.....	i
Halaman Persetujuan.....	ii
Halaman Pengesahan.....	iii
Kata Pengantar.....	iv
Abstrak.....	vi
Abstract.....	vii
Daftar Isi.....	viii
Daftar Tabel.....	xi
Daftar Gambar.....	xii
Daftar Lampiran.....	xiii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Kanker Hepar	
2.1.1 Pengertian dan Jenis-jenis Kanker Hepar.....	6
2.1.2 Faktor Risiko Kanker Hepar.....	7
2.1.3 Patofisiologi Kanker Hepar.....	8
2.1.4 Gejala Kanker Hepar.....	10
2.1.5 Tahapan ( <i>Staging</i> ) Kanker Hepar.....	10
2.1.6 Tindakan Preventif Kanker Hepar.....	11

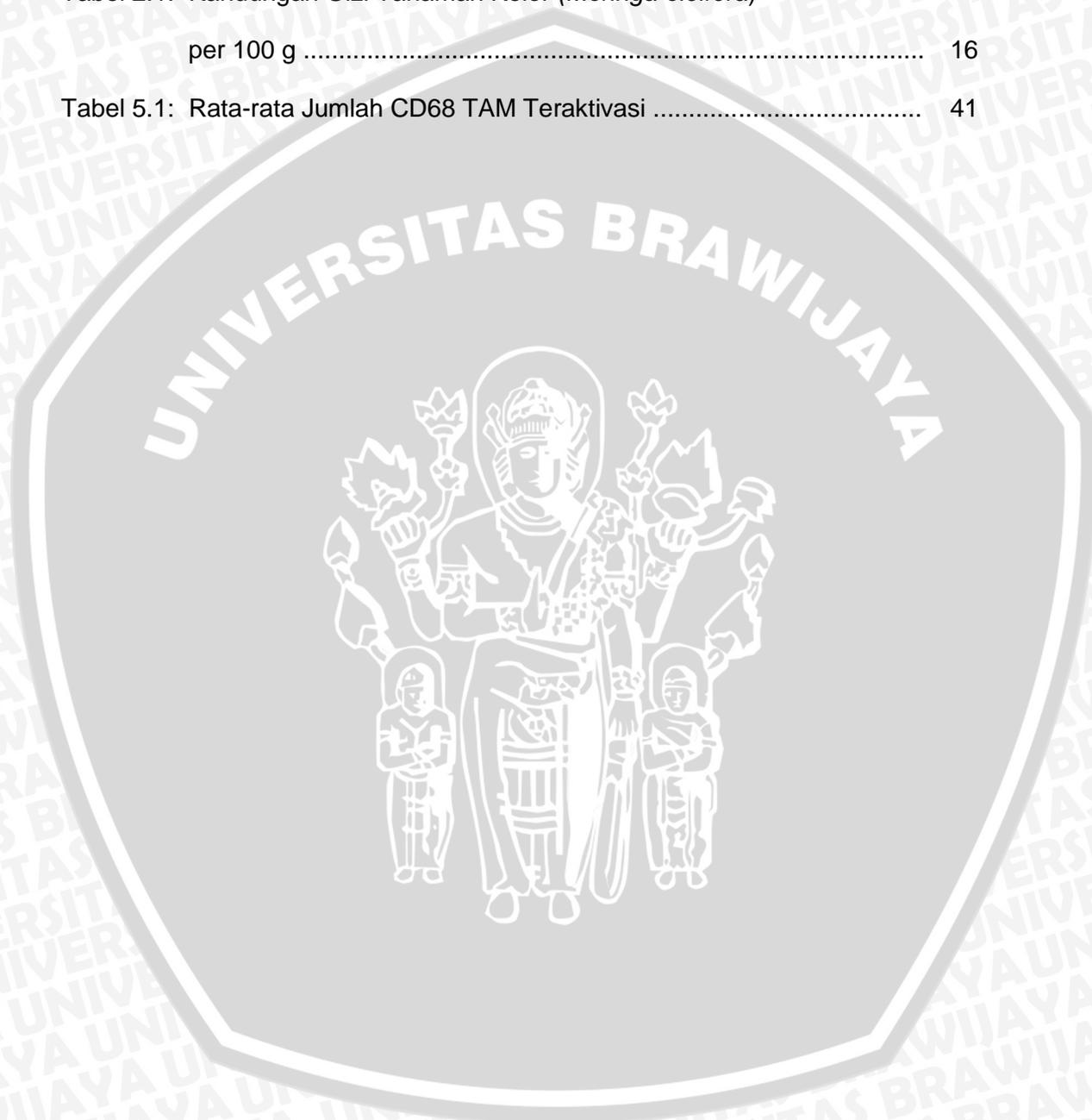


2.1.7 Terapi Kanker Hepar.....	11
2.2 Kelor ( <i>Moringa oleifera</i> )	
2.2.1 Klasifikasi Kelor ( <i>Moringa oleifera</i> ).....	15
2.2.2 Morfologi Kelor ( <i>Moringa oleifera</i> ).....	15
2.2.3 Kandungan Kelor ( <i>Moringa oleifera</i> )	
2.2.3.1 Zat Gizi Kelor ( <i>Moringa oleifera</i> ).....	16
2.2.3.2 Zat Kimia dan Aktivitas Antioksidan Daun Kelor ( <i>Moringa oleifera</i> )	
2.2.3.2.3 Quercetin.....	17
2.2.3.2.4 Kaemferol.....	18
2.2.3.2.5 Antioksidan dan ROS.....	18
2.2.4 Manfaat Kelor ( <i>Moringa oleifera</i> )	20
2.3 Induksi DMBA (7,12 <i>Dimetylbenzene alfa anthracene</i> ).....	21
2.4 Inflamasi dan Kanker.....	22
2.5 Karsinogenesis dan Makrofag.....	25
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS</b>	
3.1 Kerangka Konsep.....	27
3.2 Hipotesis Penelitian.....	29
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN</b>	
4.1 Rancangan Penelitian.....	30
4.2 Binatang Coba	
4.2.1 Binatang Coba, Objek, dan Teknik Randomisasi .....	30
4.2.2 Estimasi Jumlah Pengulangan.....	31
4.2.3 Kriteria Inklusi.....	31
4.2.4 Kriteria Eksklusi.....	32

4.3 Variabel Penelitian.....	32
4.4 Lokasi dan Waktu penelitian.....	33
4.5 Alat dan Bahan penelitian	
4.5.1 Alat.....	33
4.5.2 Bahan Penelitian.....	33
4.6 Definisi Operasional.....	34
4.7 Prosedur Penelitian	
4.7.1 Adaptasi.....	36
4.7.2 Tikus Model Kanker Hepar.....	36
4.7.3 Perlakuan	
4.7.3.1 Pemeliharaan.....	36
4.7.3.2 Pembedahan.....	37
4.7.4 Pemeriksaan Imunohistokimia CD68 TAM.....	37
4.7.5 Cara Pemeriksaan Mikroskop.....	38
4.8 Pengolahan dan Analisis Data.....	39
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA</b>	
5.1 Hasil Penelitian.....	40
5.2 Analisis Data.....	42
<b>BAB 6 PEMBAHASAN.....</b>	<b>46</b>
<b>BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
7.1 Kesimpulan.....	51
7.2 Saran.....	51
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>52</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>60</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1: Kandungan Gizi Tanaman Kelor ( <i>Moringa oleifera</i> ) per 100 g .....	16
Tabel 5.1: Rata-rata Jumlah CD68 TAM Teraktivasi .....	41

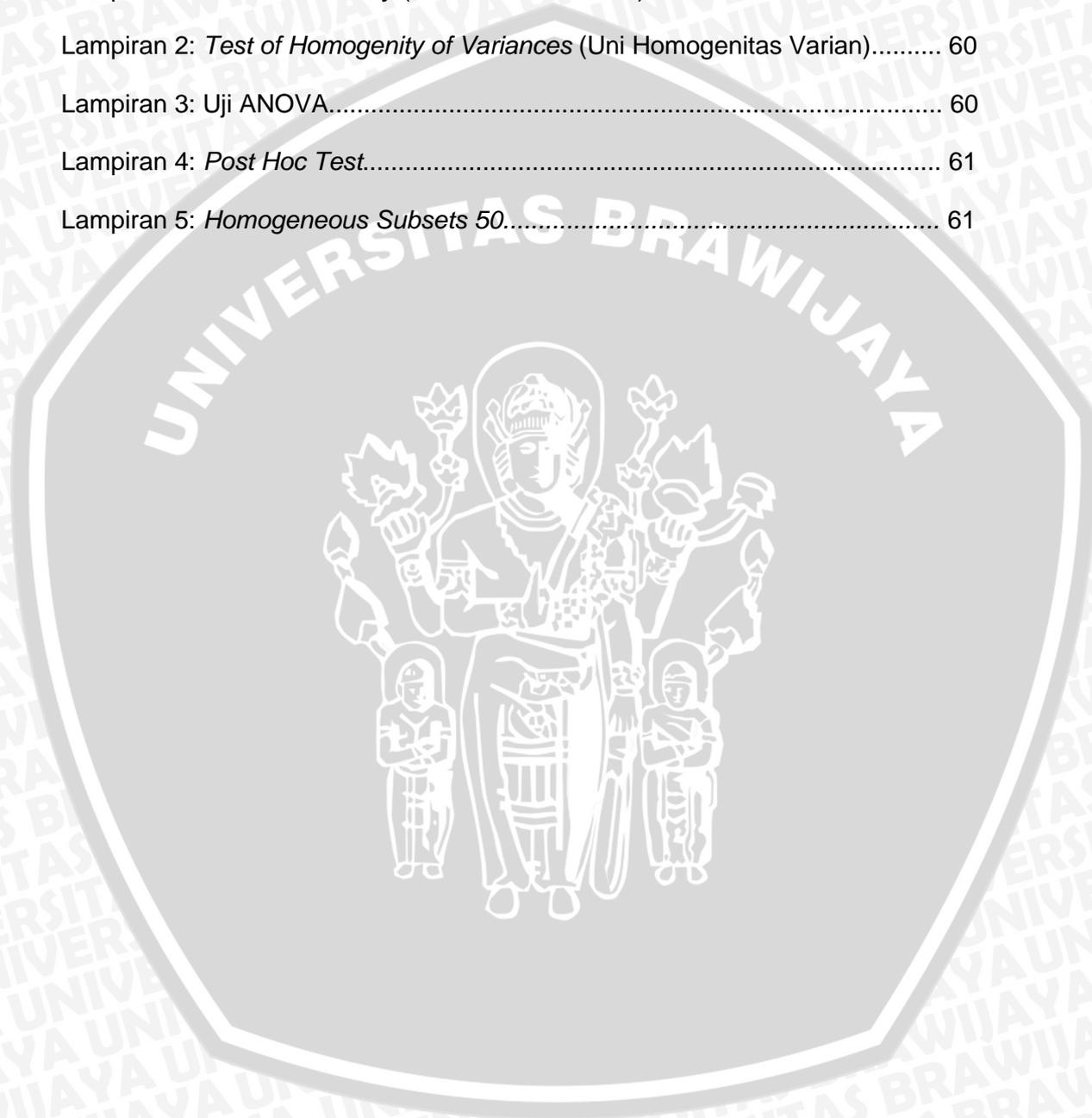


**DAFTAR GAMBAR**

Gambar 2.1: <i>Cellular Signaling Pathways of Hepatocarcinogenesis</i> .....	9
Gambar 2.2: Target Molekular Terapi Herbal pada Hepatokarsinogenesis .....	14
Gambar 2.3: Imunitas Protumor (Inflamasi Kronis) dan Antitumor.....	23
Gambar 2.4: Peran Inflamasi pada Inisiasi dan Promosi Kanker.....	24
Gambar 4.1: Alur Penelitian.....	35
Gambar 5.1: Irisan Hepar dengan Sel CD68 Makrofag yang Teraktivasi (metode IHK, 400x) Terlihat Berwarna Coklat dan Ditunjuk Tanda Panah.....	41
Gambar 5.2: Grafik Rata-rata Jumlah CD68 Makrofag yang Teraktivasi pada Setiap Kelompok.....	42

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1: <i>Test of Normality</i> (Uni Normalitas Data).....	60
Lampiran 2: <i>Test of Homogeneity of Variances</i> (Uni Homogenitas Varian).....	60
Lampiran 3: Uji ANOVA.....	60
Lampiran 4: <i>Post Hoc Test</i> .....	61
Lampiran 5: <i>Homogeneous Subsets</i> 50.....	61



## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan penyebab utama mortalitas di dunia atau sekitar 13% dari seluruh penyebab mortalitas. Diperkirakan angkarnya sekitar 7,9 juta kematian pada tahun 2007. Jenis kanker tersering penyebab mortalitas tiap tahunnya adalah kanker paru (1,4 juta mortalitas/tahun), lambung (866.000 mortalitas/tahun), kolon (677.000 mortalitas/tahun), hepar (653.000 mortalitas/tahun), dan payudara (548.000 mortalitas/tahun) (WHO, 2008). Pada bulan Nopember 2004, dilaporkan bahwa kanker hepar merupakan kanker dengan pertumbuhan tercepat diantara jenis kanker lain di Amerika Serikat (Kerr, 2004). Sedangkan di Indonesia, survei kanker global pada tahun 2002 menunjukkan insiden kanker hepar mencapai 13 per 100 ribu populasi (Depkes, 2007).

Kanker hepar dapat bermula dari organ bagian hepar (*hepatocellular cancer*) atau dapat juga berasal dari organ lain, misalnya dari kolon yang menyebar ke hepar (*metastatic liver cancer*). Penyakit yang sering berhubungan dengan kanker hepar antara lain virus hepatitis dan sirosis hati (Bruix and Sherman 2005).

Salah satu penyebab kanker adalah paparan terhadap senyawa golongan polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH), seperti 1,7,12-dimetilbenz (a) Antrasen

(DMBA) yang metabolitnya dapat berikatan dengan DNA (Rundle *et al.*, 2000). DMBA merupakan karsinogen yang cukup poten pada hewan pengerat, dan secara luas telah digunakan untuk menginduksi terjadinya kanker (Constantinou *et al.*, 2003). Pemaparan DMBA yang berulang dapat menyebabkan inisiasi karsinogenesis pada hepar.

Karsinogenesis adalah proses terjadinya kanker yang diawali dengan adanya kerusakan DNA atau mutasi pada gen-gen p-53 dan ras, yaitu kerusakan DNA pada gen pengatur pertumbuhan (Hanahan *and* Weinberg, 2000). Sel kanker yang tumbuh dianggap sebagai antigen sehingga akan direspon oleh imunitas tubuh dengan inflamasi. Inflamasi kronis memberi sumbangan pada perkembangan kanker dan predisposisi untuk jenis kanker yang berbeda. Kanker terkait inflamasi meliputi adanya infiltrasi leukosit, ekspresi sitokin seperti faktor nekrosis tumor (TNF) atau interleukin (IL) -1; kemokin seperti CCL2 dan CXCL8; remodelling jaringan yang aktif dan neo-angiogenesis (Allavena *et al.*, 2008).

Makrofag adalah kunci terjadinya inflamasi kronis. Makrofag merespon terhadap sinyal dari *microenvironmental* polarisasi genetik dan program fungsional. Makrofag disebut M1 ketika diinduksi oleh mediator proinflamasi (misalnya lipopolisakarida dan interferon) sedangkan disebut M2 ketika diinduksi oleh mediator anti-inflamasi (misalnya interleukin-10 dan glukokortikoid). M1 memiliki kemampuan membunuh tumor, sebaliknya M2 mempromosikan pertumbuhan sel tumor dan metastasis (Sica *et al.*, 2008).

*Tumor Associated Macrophage* (TAM) memiliki lebih banyak fenotip M2. TAM berhubungan dengan berkurangnya aktivitas sitotoksik, rendahnya tingkat pro-inflamasi sitokin, terutama IL-12, tingginya tingkat IL-10 dan TGF- $\beta$ , serta rendahnya *Antigen Presenting Cell* (APC). Beberapa studi klinis telah

menunjukkan peningkatan jumlah TAM berkorelasi dengan angiogenesis, metastasis, dan prognosis buruk (Pollard, 2008; Lin *et al.*, 2006; Qian *et al.*, 2009).

CD (*Cluster of Differentiation*) 68 merupakan protein transmembran 110-kD glikoprotein yang diekspresikan sangat tinggi oleh monosit dan makrofag jaringan sehingga banyak digunakan sebagai *marker*. CD68 merupakan anggota dari kelompok *lysosomal-associated membrane glycoprotein* (LAMP) dan juga kelompok reseptor *scavenger*. Reseptor *scavenger* berfungsi untuk membersihkan debris selular, meningkatkan fagositosis, dan memediasi perekrutan dan aktivasi makrofag (Sica *et al.*, 2008).

Pengobatan kanker hepar sangat sulit dilakukan sehingga angka harapan hidup 5 tahun untuk semua tahapan kanker hanya berkisar 7% di Amerika dan bahkan lebih rendah di negara-negara berkembang (Ruddon, 2007). Dengan demikian, usaha untuk menemukan obat kanker perlu terus dilakukan untuk mendapatkan obat yang efektif dengan efek samping yang kecil. Salah satu usaha yang perlu ditempuh adalah dengan menggali sumber alam nabati yang secara empiris telah banyak digunakan oleh masyarakat untuk mengobati kanker. Mengenai efek suatu bahan sangat erat kaitannya dengan senyawa kimia yang terkandung dalam bahan tersebut.

Daun kelor (*Moringa oleifera*) merupakan salah satu obat herbal yang sering digunakan sebagai obat malnutrisi, menurunkan kolesterol, diare, disentri, colitis, gonorrhea, sakit kepala, anemia, iritasi, infeksi, antialergi, antikarsinogenik, antihelminthes dan antiinflamasi (Faizi *et al.*, 1995; Guevara *et al.*, 1999). Dari beberapa khasiat yang telah ditemukan, daun kelor mempunyai peran penting dalam proses inflamasi. Daun kelor mengandung dua jenis zat bioaktif yaitu

quercetin dan kaempferol. Kedua jenis zat bioaktif tersebut termasuk dalam bioflavonoid. Flavonoid mempunyai kecenderungan mengikat atom atau sebagai “scavenging” bagi radikal bebas sehingga tidak terbentuk ROS berlebihan (Nakagawa and Kawagoe, 2000). Oleh karena itu diharapkan daun kelor berperan pula pada proses inflamasi kronis pada hepatokarsinogenesis. Hal inilah yang mendorong penulis untuk melakukan penelitian tentang “Pengaruh pemberian daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap penurunan populasi CD68 makrofag pada tikus wistar yang diinduksi DMBA”.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan jumlah CD68 makrofag pada hepatokarsinogenesis tikus wistar yang diinduksi DMBA?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap hepatokarsinogenesis tikus wistar yang diinduksi DMBA.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1 Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap penurunan jumlah CD68 makrofag pada hepatokarsinogenesis tikus wistar yang diinduksi DMBA.

1.3.2.2 Mengetahui dosis optimal untuk menurunkan jumlah CD68 makrofag pada hepatokarsinogenesis tikus wistar yang diinduksi DMBA setelah diberi ekstrak methanol daun kelor.

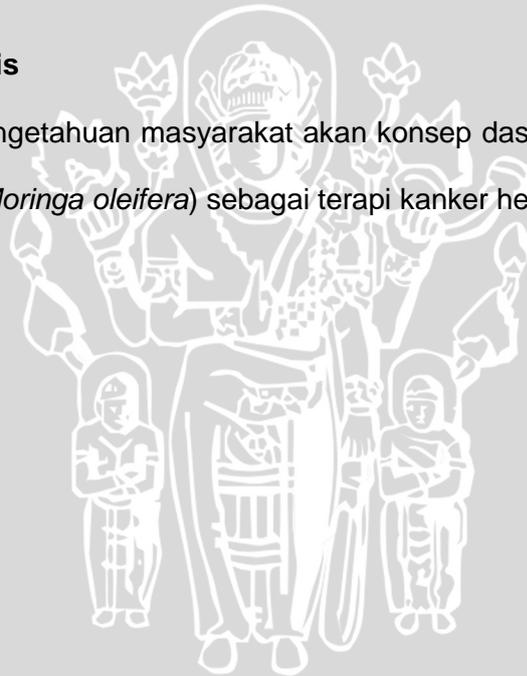
#### 1.4 Manfaat Penelitian

##### 1.4.1 Mantaat Akademik

Menambah konsep dasar tentang daun kelor (*Moringa oleifera*) dan hubungannya dengan hepatokarsinogenesis.

##### 1.4.2 Manfaat Praktis

Menambah pengetahuan masyarakat akan konsep dasar pengembangan manfaat daun kelor (*Moringa oleifera*) sebagai terapi kanker hepar.



## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Kanker Hepar

##### 2.1.1 Pengertian dan Jenis-jenis Kanker Hepar

Hepar dapat terkena kanker primer yang muncul di dalam hepar, atau kanker yang terbentuk pada organ lain dan kemudian menyebar ke hepar. Sebagian besar kanker hepar merupakan kanker sekunder atau metastasis, artinya berasal dari keganasan di tempat lain. Di seluruh dunia, kanker hepar primer menyerang laki-laki 2x lebih banyak daripada perempuan dan mempengaruhi sebagian besar orang berusia diatas 50 tahun (cancerhelps.co.id, 2011).

Kanker hepar dapat bersifat jinak maupun ganas. Kanker hepar jinak yang umum adalah: Hemangioma, Hepatik adenoma, Focal nodular hyperplasia, Kista, Lipoma, Fibroma dan Leiomyoma. Kanker hepar jinak pada umumnya tidak menyebar ke jaringan atau organ lain. Kanker ini biasanya dapat disembuhkan dengan operasi pengangkatan, terutama pada saat kanker menyebabkan rasa sakit atau perdarahan (Czauderna *and* Perilongo, 2004)

Jenis-jenis kanker hepar diantaranya: (1) *Hepatocellular Carcinoma* (HCC): bentuk paling umum dari kanker hepar pada orang dewasa. Pasien Hepatitis C kronis memiliki risiko lebih tinggi untuk menderita kanker jenis ini. Kanker ini dimulai dari hepatosit, yaitu jenis utama sel hepar. Sekitar 3 dari 4

kanker yang dimulai di hepar adalah jenis ini. HCC dapat memiliki pola pertumbuhan yang berbeda. Beberapa bermula sebagai tumor tunggal yang tumbuh membesar, hanya di akhir perjalanan penyakit ini tidak menyebar ke organ lain dari hepar. Lainnya, bermula di banyak tempat di seluruh hepar, bukan sebagai tumor tunggal. Hal ini paling sering terlihat pada orang dengan sirosis hepar dan merupakan pola yang paling umum terlihat, khususnya di negara-negara maju dimana konsumsi alkohol tinggi, (2) *Cholangiocarcinomas*: kanker saluran empedu yang menyerang 1 atau 2 dari setiap 10 pasien kanker hepar, (3) *Angiosarcomas* dan *Hemangiosarcomas*: Kanker yang dimulai di pembuluh darah di hepar ini merupakan jenis kanker langka. Kanker ini tumbuh cepat. Seringkali pada saat ditemukan mereka sudah menyebar sehingga tidak dapat diangkat. Pengobatan mungkin membantu memperlambat penyakit, tetapi kebanyakan pasien tidak tinggal lebih dari setahun setelah kanker ini ditemukan dan (4) *Hepatoblastoma*: jenis kanker ini sangat jarang terjadi, biasanya ditemukan pada balita. Pengobatan utamanya adalah dengan operasi dan kemoterapi. Penyakit ini memiliki kelangsungan hidup hingga 90% bila ditemukan pada stadium awal (Kumar *et al.*, 2007; Czauderna *and* Perilongo, 2004).

### 2.1.2 Faktor Risiko Kanker Hepar

Penyebab kanker hepar sampai sekarang belum diketahui secara pasti. Namun kanker hepar primer (HCC) cenderung terjadi pada hepar yang rusak karena cacat lahir, penyalahgunaan alkohol, atau infeksi kronis akibat penyakit seperti hepatitis B dan C, *hemochromatosis* (terlalu banyaknya kadar besi dalam hepar) dan sirosis. Lebih dari 50% orang yang terdiagnosa kanker hepar primer telah mengalami sirosis hepar. Mereka yang

menderita kondisi genetik yang disebut *hemochromatosis* memiliki risiko yang lebih besar (totalkehatananda.com, 2008).

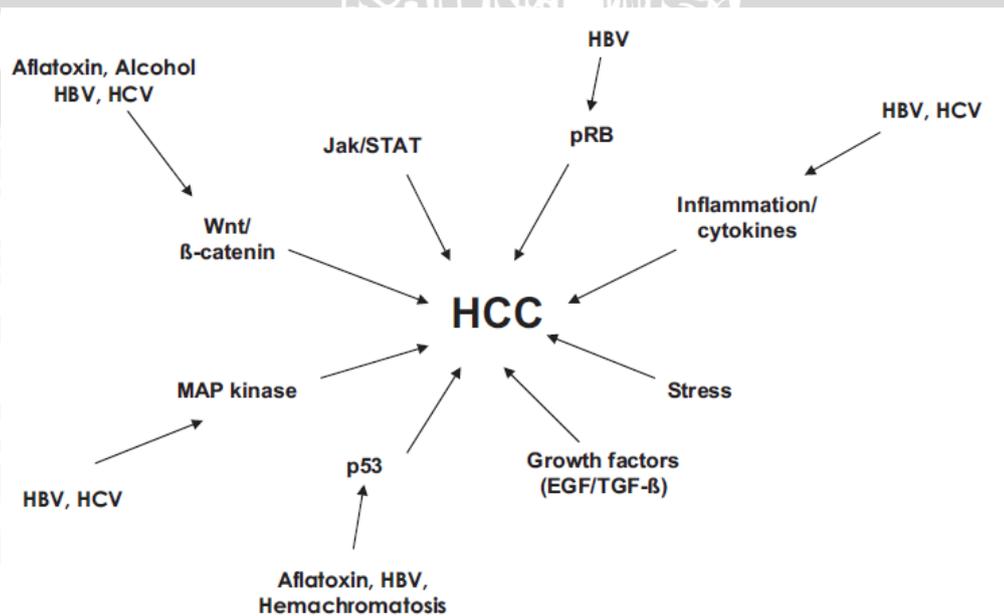
Berbagai zat penyebab kanker yang berhubungan dengan kanker hepar primer, termasuk diantaranya: herbisida, aflatoksin (sejenis jamur tanaman pada gandum & palawija), dan bahan kimia tertentu seperti vinil klorida dan arsen. DMBA, merokok dan penyalahgunaan alkohol juga dapat meningkatkan risiko terkena kanker hepar (Paliwal *et al.*, 2011).

### 2.1.3 Patofisiologi Kanker Hepar

Sel-sel kanker hepar terbentuk dengan mekanisme sebagai berikut (Corwin *and* Elizabeth, 2000):

1. Hipertensi porta: merupakan peningkatan berlebihan tekanan di vena porta 9-20 mmHg (normal 3 mmHg). Disebabkan oleh (a) Obstruksi aliran darah yang melintasi hepar akibat fibrosis, peradangan, trombus, dan (b) Hambatan aliran jantung (masuk atau keluar) sehingga darah kembali ke hepar.
2. Ruang ketiga: air yang difiltrasi dari plasma tertimbun di bagian-bagian tubuh sistem vaskular. Hal ini mengakibatkan (a) Asites, yang merupakan penimbunan cairan serosa di rongga peritonium dan (b) Edema interstitial.
3. Pirau vena porta-sistemik: hipertensi porta mengakibatkan terbukanya pembuluh-pembuluh kolateral atau pirau (antara vena porta dan vena sistemik dengan aliran darah dari dinding abdomen, esofagus, dan rektum yang memiliki dinding tipis dan kemampuan yang rendah dalam menangani aliran darah yang deras) sehingga akan terjadi varises (vena melebar terdistorsi).

4. Splenomegali: adalah pembesaran limpa atau pembesaran hepar. Hipertensi porta dimana aliran darah ke limpa melalui vena splenik mengakibatkan darah dapat disimpan dalam jumlah besar di limpa. Darah di limpa tidak dapat digunakan dalam sirkulasi umum sehingga terjadi anemia (penurunan sel darah merah), trombositopenia (penurunan trombosit), dan leukopenia (penurunan sel darah putih).
5. Ikterus: diskolorasi kuning pada kulit dan sklera mata akibat kelebihan bilirubin dalam darah. Terdiri dari ikterus hemolitik, ikterus hepatoselular, dan ikterus obstruktif.
6. Sirosis: kondisi fibrosis dan pembentukan jaringan parut difus di hepar. Merupakan respon terhadap cedera berulang dan reaksi peradangan yang ditimbulkan. Disebabkan oleh infeksi (misalnya: hepatitis), obstruksi saluran empedu sehingga terjadi penimbunan empedu di kanalikulus dan rupturnya kanalikulus, atau cedera hepatosit oleh toksin alkohol.
7. Hepatitis: peradangan hepar karena infeksi atau toksin alkohol.



**Gambar 2.1 Cellular Signaling Pathways of Hepatocarcinogenesis**

Secara molekular hepatokarsinogenesis merupakan proses kompleks yang berhubungan dengan akumulasi genetik dan perubahan yang terjadi pada tahap inisiasi, promosi dan progresi kanker (gambar 2.1). Pada tingkat seluler sering disertai dengan peningkatan ekspresi faktor-faktor yang mempengaruhi kelangsungan hidup sel kanker dengan menekan apoptosis dan mengatur siklus sel melalui berbagai jalur seperti inflamasi, pRB, Jak/STAT, Wnt/ $\beta$ -catenin, MAP kinase, p53, *Growth Factor*, dan *Stress*. (Aravalli *et al.*, 2008).

#### 2.1.4 Gejala Kanker Hepar

Kanker hepar seringkali tidak menimbulkan gejala pada awalnya. Ketika kanker bertambah besar, gejala yang timbul diantaranya (Wijayakusuma, 2008): Rasa sakit di perut bagian atas disisi kanan, sebuah benjolan atau rasa berat di perut bagian atas, bengkak (kembung) pada perut, adanya suara abnormal seperti gesekan sewaktu diperiksa menggunakan stetoskop (apabila hepar telah membesar), kehilangan nafsu makan dan perut terasa penuh, penurunan berat badan tanpa sebab yang jelas, kelelahan kronis, mual dan muntah, kulit dan mata berwarna kuning, tinja pucat, dan urin berwarna gelap, demam, tangan dan kaki bengkak.

#### 2.1.5 Tahapan (*Staging*) Kanker Hepar

Terdapat empat tahap kanker hepar (Marsh *et al.*, 2000), yaitu:

- Stadium I: Kanker hepar bersifat lokal, berukuran 2 cm atau kurang, terletak di daerah tunggal hepar dan dapat dilakukan pembedahan.
- Stadium II: Kanker hepar masih bersifat lokal dan dapat dioperasi. Pada tahap ini, kanker hadir dalam satu atau lebih lokasi di hepar

tetapi tidak menyebar ke kelenjar getah bening atau pembuluh darah yang berdekatan.

- Stadium III: Kanker belum menyebar ke organ tubuh lainnya atau kelenjar getah bening. Biasanya ukuran tumor sudah >2 cm.
- Stadium IV: Kanker hadir di lebih dari satu lobus hepar, mungkin sudah menyebar ke kelenjar getah bening yang berdekatan, organ lain (tapi bukan kantong empedu) dan struktur (seperti peritoneum), dan tumbuh ke dalam atau di sekitar pembuluh darah utama.

#### **2.1.6 Tindakan Preventif Kanker Hepar**

Kanker hepar merupakan jenis kanker yang sangat sulit diobati. Oleh karena itu, perlu dilakukan pencegahan sedini mungkin. Berikut beberapa langkah pencegahan: (1) Menghindari minuman beralkohol, (2) Menghindari makanan berjamur, dan (3) Melakukan vaksinasi hepatitis (terutama Hepatitis B) (Wijayakusuma, 2008).

#### **2.1.7. Terapi Kanker Hepar**

Pengobatan kanker hepar bervariasi dari pasien ke pasien. Pendekatan pengobatan disesuaikan dengan kebutuhan pasien dan mempertimbangkan faktor-faktor berikut: (1) ukuran tumor dan lokasi, (2) stadium kanker, (3) keadaan umum kesehatan pasien, dan (4) usia kanker (cancerhelps.co.id, 2011).

Pilihan terapi untuk kanker hepar adalah (cancerhelps.co.id, 2011; Carr, 2005):

a. Pembedahan: Pembedahan untuk kanker hepar hanya dapat dilakukan bagi ukuran tumor yang tidak lebih besar dari 5 cm, terbatas pada hepar, dan kanker belum menyerang pembuluh darah yang berdekatan, organ lain ataupun kelenjar getah bening. Ada empat jenis operasi yang dilakukan pada penderita kanker hati:

- Hepatektomi parsial: adalah jenis operasi dimana hanya sebagian dari hepar, dimana tumor itu berada, akan diangkat. Ada tiga jenis hepatektomi parsial: (1) reseksi baji, dimana jaringan berbentuk segitiga diangkat, (2) reseksi lobus, dimana hanya lobus hepar yang diangkat, dan (3) reseksi parsial, dimana sebagian besar hepar akan diangkat.
- Hepatektomi total: operasi yang kompleks di mana seluruh hepar akan diangkat. Prosedur ini diikuti dengan transplantasi hepar karena tubuh tidak dapat hidup tanpa hepar.
- *Cryosurgery*: adalah terapi untuk membunuh sel kanker dengan cara pembekuan.
- Radiofrekuensi Ablasi (RFA): prosedur ini melibatkan beberapa elektroda, yang ditempatkan dalam tumor baik melalui kulit, atau melalui sayatan kecil di perut, dan mengalirkan listrik melalui frekuensi radio untuk mengangkat tumor. Prosedur ini dilakukan dengan bantuan CT scan atau USG.

b. Radioterapi: Radioterapi menggunakan partikel X-ray untuk menghancurkan sel-sel kanker hepar. Pasien kanker hepar dapat menerima terapi radiasi melalui beberapa bentuk. Radiasi eksternal: menggunakan perangkat eksternal (akselerator linier) untuk menghasilkan X-ray yang difokuskan pada tumor hepar, Radiasi internal: yaitu partikel radioaktif dilekatkan dalam

biji, kawat, jarum, atau kateter yang ditempatkan dalam jaringan tumor dan Radio-labeled antibodi: menggunakan zat radioaktif yang melekat pada antibodi buatan untuk membunuh sel kanker.

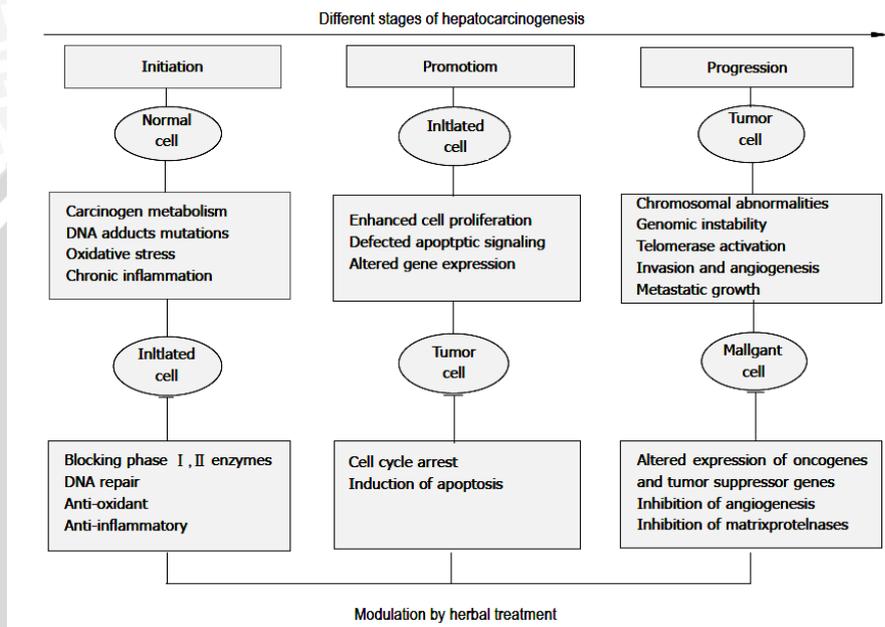
c. Kemoterapi: Kemoterapi adalah penggunaan obat-obatan untuk menghentikan pertumbuhan sel abnormal maupun untuk membunuh sel-sel kanker. Jenis pengobatan melibatkan baik obat tunggal atau kombinasi dari beberapa obat, dan biasanya diberikan dalam beberapa siklus. Pasien kanker hepar dapat menerima kemoterapi berbeda: (1) sebagai pil, (2) infus, sebagai injeksi ke dalam pembuluh darah atau melalui kateter (tabung tipis fleksibel) pada vena, atau (3) ditempatkan langsung ke tumor (disebut kemoterapi regional). Keuntungan kemoterapi regional adalah memperkecil efek samping kemoterapi pada sel-sel sehat.

d. Terapi biologis: juga disebut imunoterapi adalah jenis perawatan yang digunakan untuk meningkatkan pertahanan alami tubuh. Perawatan ini menggunakan sistem kekebalan tubuh baik untuk melawan kanker atau untuk mengurangi efek samping yang disebabkan oleh pengobatan kanker. Terapi biologis menggunakan zat-zat yang dihasilkan di laboratorium yang mengkopi substansi alami tubuh untuk meningkatkan atau mengembalikan pertahanan alami tubuh.

e. Transplantasi hepar: adalah solusi bagi pasien kanker hepar stadium lanjut, ketika opsi pengobatan lainnya tidak bekerja. Prosedur operasi ini melibatkan dua langkah yaitu organ hepar sehat akan diambil dari donor (orang yang mati otak) dan kemudian ditanamkan ke dalam tubuh untuk menggantikan organ hepar pasien yang rusak.

f. Terapi Herbal

Berbagai bahan yang berasal dari tanaman dapat meningkatkan fungsi berbagai komponen sistem imun nonspesifik dan spesifik sehingga diharapkan dapat mengintervensi perjalanan kanker (Guevara *et al.*, 1999).



**Gambar 2.2 Target Molekular Terapi Herbal pada Hepatokarsinogenesis**

Secara molekular, terapi herbal mempengaruhi setiap perkembangan sel kanker termasuk pada hepatokarsinogenesis (gambar 2.2). Terapi herbal mengintervensi kanker mulai tahap inisiasi, promosi, bahkan progresi. Terapi herbal dapat mengemblok enzim pada fase I dan 2, menginduksi DNA *repair*, berperan sebagai antioksidan dan antiinflamasi pada tahap inisiasi. Pada tahap promosi, terapi herbal ikut menginduksi apoptosis sedangkan pada tahap progresi, terapi herbal dapat merusak ekspresi onkogen dan menghambat angiogenesis (Abdel-Hamid *et al.*, 2011).

## 2.2 Kelor (*Moringa oleifera*)

### 2.2.1 Klasifikasi Kelor (*Moringa oleifera*)

- 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 : *Moringa oleifera lam.*

(Integrated Taxonomic Information System, 2000)

### 2.2.2 Morfologi Kelor (*Moringa oleifera*)

*Moringa oleifera* dapat berupa semak atau pohon dengan tinggi 12 m dengan diameter 30 cm. Kayunya merupakan jenis kayu lunak dan memiliki kualitas rendah. Daun tanaman kelor memiliki karakteristik bersirip tidak sempurna, kecil, berbentuk telur dan sebesar ujung jari. Helai anak daun memiliki warna hijau sampai hijau kecoklatan, bentuk bundar telur atau bundar telur terbalik, panjang 1-3 cm, lebar 4 mm sampai 1 cm, ujung daun tumpul, pangkal daun membulat, dan tepi daun rata. Kulit akar berasa, berbau tajam dan pedas, dari dalam berwarna kuning pucat, bergaris halus, tetapi terang dan melintang, tidak keras, bentuk tidak beraturan, permukaan luar kulit agak licin dan permukaan dalam agak berserabut. Bagian kayu warna

cokelat muda, atau krem berserabut, sebagian besar terpisah (Anwar *et al.*, 2005)

### 2.2.3 Kandungan Kelor (*Moringa oleifera*)

#### 2.2.3.1 Zat Gizi Kelor (*Moringa oleifera*)

Tabel 2.1: Kandungan Gizi Tanaman Kelor (*Moringa oleifera*) per 100 g (Fuglie, 1999)

	Biji	Daun	Tepung daun
Kadar Air (%)	86.9	75.0	7.5
Calori	26	92	205
Protein (g)	2.5	6.7	27.1
Lemak (g)	0.1	1.7	2.3
Carbohydrate (g)	3.7	13.4	38.2
Fiber (g)	4.8	0.9	19.2
Minerals (g)	2.0	2.3	-
Ca (mg)	30	440	2,003
Mg (mg)	24	24	368
P (mg)	110	70	204
K (mg)	259	259	1,324
Cu (mg)	3.1	1.1	0.57
Fe (mg)	5.3	7	28.2
S (mg)	137	137	870
Oxalic acid (mg)	10	101	1.6%
Vitamin A - B carotene (mg)	0.11	6.8	16.3
Vitamin B -choline (mg)	423	423	-

Vitamin B1 -thiamin (mg)	0.05	0.21	2.64
Vitamin B2 -riboflavin (mg)	0.07	0.05	20.5
Vitamin B3 -nicotinic acid (mg)	0.2	0.8	8.2
Vitamin C -ascorbic acid (mg)	120	220	17.3
Vitamin E -tocopherol (mg)	-	-	113
Arginine (g/16g N)	3.6	6.0	1.33%
Histidine (g/16g N)	1.1	2.1	0.61%
Lysine (g/16g N)	1.5	4.3	1.32%
Tryptophan (g/16g N)	0.8	1.9	0.43%
Phenylalanine (g/16g N)	4.3	6.4	1.39%
Methionine (g/16g N)	1.4	2.0	0.35%
Threonine (g/16g N)	3.9	4.9	1.19%
Leucine (g/16g N)	6.5	9.3	1.95%
Isoleucine (g/16g N)	4.4	6.3	0.83%
Valine (g/16g N)	5.4	7.1	1.06%

### 2.2.3.2 Zat Kimia dan Aktivitas Antioksidan Daun Kelor (*Moringa oleifera*)

#### 2.2.3.2.1 Quercetin

Quercetin, 3,3',4',5,7-pentahydroxy flavon, merupakan salah satu flavonoid yang berkhasiat sebagai antioksidan. Quercetin banyak dijumpai dalam berbagai buah dan sayuran misalnya apel, anggur merah, teh, dan bawang merah. Pengonsumsian quercetin dalam makanan yang sehat tidak menimbulkan efek samping apapun (Coskun *et al.*, 2005).

Pemberian quercetin mempunyai berbagai aktivitas farmakologi misalnya sebagai antioksidan (Coskun *et al.*, 2005), antiinflamasi, analgetik dan mencegah kanker (Knect *et al.*, 1997). *American Cancer Society* menyatakan quercetin telah dipromosikan sebagai terapi efektif terhadap berbagai jenis penyakit, termasuk kanker. Quercetin berguna sebagai agen antikanker yang poten untuk menginduksi apoptosis. (Akan, 2011). Quercetin menghambat pertumbuhan sel-sel ganas melalui mekanisme penghambatan glikolisis, sintesis makromolekul dan enzim, pembekuan siklus sel, dan interaksi dengan estrogen tipe II *binding site* (Hosokawa *et al.*, 1992; Koishi *et al.*, 1992; Scambia *et al.*, 1993).

#### 2.2.3.2.2 Kaempferol

Kaempferol, 3, 4', 5, 7-*tetra hydroxyflavon* adalah flavonoid golongan flavon yang memiliki potensi antioksidan dan proteksi selular. Kaempferol menunjukkan penghambatan yang poten terhadap aktifitas generasi ROS. (Sharma *et al.*, 2007). Kaempferol mempunyai kemampuan secara langsung dalam menghambat pertumbuhan dan proliferasi tumor, serta dapat menginduksi apoptosis sel tumor. Induksi apoptosis kaempferol melalui jalur *mitochondria dependent*, baik yang *dependent caspase* maupun yang *independent caspase*. dan jalur *ER stress*. (Nurulita, 2011)

#### 2.2.3.2.3 Antioksidan dan ROS

Antioksidan adalah senyawa yang dapat mengurangi, menahan dan mencegah proses oksidasi. Berdasarkan mekanismenya, antioksidan dapat dikelompokkan menjadi antioksidan primer dan sekunder. Antioksidan primer mengikuti mekanisme pemutusan reaksi radikal dengan mendonorkan atom

hidrogen secara cepat pada suatu lipid radikal sehingga produk yang dihasilkan lebih stabil dari produk inisial. Contoh antioksidan ini adalah flavonoid, tokoferol, senyawa tiol. Sedangkan antioksidan sekunder dapat menghilangkan penginisiasi oksigen radikal maupun nitrogen radikal atau bereaksi dengan komponen atau enzim yang menginisiasi reaksi radikal antara lain dengan menghambat enzim pengoksidasi dan menginisiasi enzim pereduksi atau mereduksi oksigen tanpa membentuk spesies radikal yang reaktif. Contoh antioksidan sekunder adalah sulfit, vitamin C, beta karoten, bilirubin, dan albumin (Schuler, 1990).

Selain antioksidan primer dan sekunder, juga terdapat antioksidan lain yaitu antioksidan enzimatik intrasel (seperti *superoxide dismutase/SOD*, katalase, dan *glutation peroksidase*), yang terdapat dalam jaringan tubuh. Enzim antioksidan berperan penting baik secara langsung dalam proteksi sel terhadap stres oksidatif, spesies oksigen reaktif (ROS), dan secara tidak langsung dengan menjaga keseimbangan beberapa spesies oksigen toksik (Touati, 1992).

Antioksidan adalah senyawa yang mampu menghambat oksidasi. Antioksidan merupakan senyawa pelindung sel melawan efek merusak dari *Reactive Oxygen Species* (ROS). Ketidakseimbangan antara antioksidan dengan ROS menimbulkan *oxidative stress* dan memicu kerusakan seluler. *Oxidative stress* berhubungan dengan kanker, penuaan, aterosklerosis, dan inflamasi (Buhler and Miranda, 2000).

Pinnet (2003) mendefinisikan radikal bebas sebagai atom atau molekul dengan satu elektron tidak berpasangan. Contohnya adalah anion superoksida, radikal peroksil dan radikal hidroksi. Radikal bebas dan molekul oksigen reaktif, keduanya disebut *reactive oxygen species* (ROS). Ada dua subkelompok ROS

yaitu radikal bebas seperti radikal superoksida ( $O_2^-$ ) dan non-radikal ROS seperti hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ). Kedua radikal dan non-radikal ROS yang umum berhubungan dengan atom oksigen, yang membedakan mereka dari *reactive nitrogen species* (RNS) (Valko *et al.*, 2006).

ROS dapat ditemukan di lingkungan sekitar, seperti polutan, asap tembakau, garam besi, dan radiasi. Umumnya, mitokondria merupakan sumber yang paling penting dari ROS seluler dimana produksi ROS terus menerus terjadi. Ini adalah hasil dari transportasi rantai elektron yang terletak di membran mitokondria dan penting untuk produksi energi dalam sel (Inoue *et al.*, 2003).

Terdapat interaksi yang kompleks antara ROS dan karsinogenesis. Jalur ROS menunjukkan bagaimana ROS menginduksi stres oksidatif. ROS dapat menghasilkan DNA tunggal atau *double-stranded* istirahat dan *cross-link*. Kerusakan DNA yang berkepanjangan menyebabkan masalah serius seperti induksi sinyal jalur transduksi, penangkapan atau induksi transkripsi, kesalahan replikasi, dan ketidakstabilan genomik sehingga memicu karsinogenesis (Ogasawara and Zhang, 2009).

#### 2.2.4 Manfaat Kelor (*Moringa oleifera*)

*Moringa oleifera* merupakan komoditas pangan yang penting digunakan sebagai nutrisi alami tanaman tropis. Daun, buah, bunga dan biji yang belum matang dari pohon digunakan sebagai sayuran di banyak negara, terutama di India, Pakistan, Filipina, Hawaii dan bagian Afrika (D'Souza and Kilkarni, 1993; Anwar *et al.*, 2005). Hampir semua bagian tanaman kelor yakni akar, kulit, daun, buah (panjang), bunga, biji dan minyak biji telah digunakan untuk berbagai penyakit dalam pengobatan tradisional, termasuk pengobatan radang,

kardiovaskular, pencernaan, hematologi dan gangguan hepatorenal (Morimitsu *et al.*, 2000).

Daun kelor merupakan sumber  $\beta$ -karoten, protein, vitamin C, kalsium, kalium dan bertindak sebagai sumber antioksidan alami karena mengandung jenis senyawa antioksidan seperti asam askorbat, flavonoid, fenolat dan karotenoid (Dillard *and* Jermani, 2000). Di Filipina, daun kelor dimanfaatkan untuk meningkatkan produksi susu wanita dan kadang-kadang diresepkan untuk anemia (Estrella *et al.*, 2000).

Biji kelor digunakan bersifat antipiretik, tajam, pahit dan menunjukkan aktivitas antimikroba. Biji dapat dikonsumsi segar ditumbuk, dipanggang, atau dikeringkan. Biji kering yang mengandung polipeptida dapat digunakan sebagai koagulan alami untuk pengolahan (Oliveira *et al.*, 1999).

### **2.3 Induksi DMBA (7,12 dimethylbenzene alfa anthracene)**

DMBA merupakan karsinogen yang cukup poten pada hewan pengerat dan secara luas telah digunakan untuk menginduksi terjadinya kanker (Constantinou *et al.*, 2003). Induksi karsinogenesis dilakukan dengan metode *newborn mice* (Della Porta *and* Terracini, 1969) yang telah dibuktikan sebagai metode uji karsinogenisitas yang terbaik dan paling sensitif.

Paparan DMBA menginduksi perubahan patologi klinik melalui toksisitas yang terjadi pada kulit, hepar, kelenjar *mammae*, dan ginjal. Pada hepar ditandai dengan adanya kerusakan parenkim hepatoseluler, lesi hepar, tumor dan kanker (Paliwal *et al.*, 2011). Beberapa bukti menunjukkan bahwa DMBA merupakan penginduksi produksi ROS yang menghasilkan lipid peroksidasi, kerusakan DNA, dan pelemahan sistem pertahanan (Bharali *et al.*, 2003).

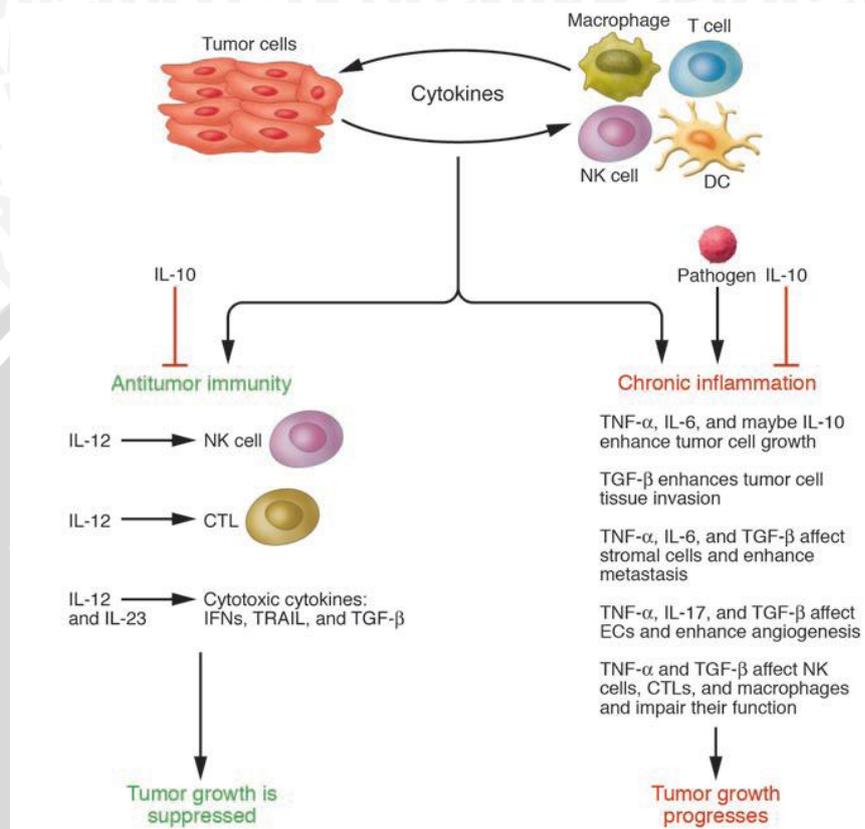
Mekanisme aktivasi DMBA melibatkan enzim sitokrom P-450 dan peroksidase menjadi *reactive intermediate* yang dapat merusak DNA dengan terbentuknya epoksida dihidrodiol (Melendez-Colon *et al.*, 1999). DMBA akan diubah oleh enzim fase I, sitokrom P450 (CYP) menjadi *ultimate carcinogen* berupa senyawa epoksida elektrofil yang merupakan metabolit aktifnya. Metabolit epoksida dapat membentuk DNA *adduct* dan menyebabkan mutasi yang berakibat kanker (Weimer *et al.*, 2000).

## 2.4 Inflamasi dan Kanker

Sel kanker dikenal sebagai *nonself* yang bersifat antigenik pada sistem imunitas tubuh manusia sehingga menimbulkan respons imun secara seluler maupun humoral. Imunitas humoral lebih sedikit berperan daripada imunitas seluler dalam proses penghancuran sel kanker, tetapi tubuh tetap membentuk antibodi terhadap antigen tumor. Dua mekanisme antibodi diketahui dapat menghancurkan target kanker yaitu, *Antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxicity* dan *Complement Dependent Cytotoxicity*. (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009).

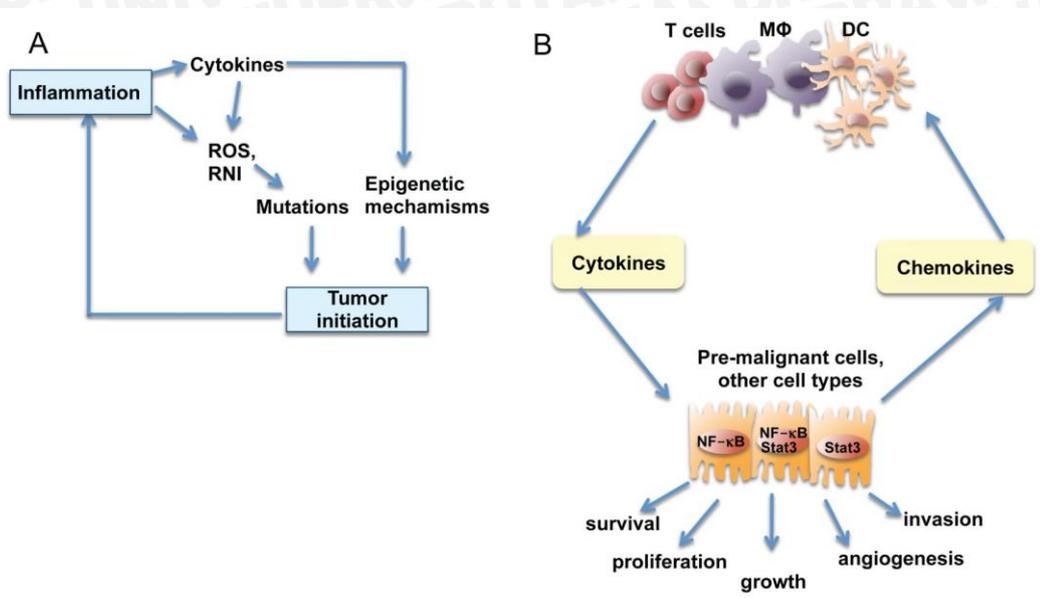
Inflamasi adalah respon imun fisiologis jaringan terhadap infeksi atau cedera dan melibatkan banyak mediator dibandingkan respon imun (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009). Inflamasi dapat lokal, sistemik, akut dan kronis yang menimbulkan kelainan patologis. Beberapa penelitian menyatakan bahwa inflamasi akut dipicu oleh infiltrasi leukosit yang merupakan mekanisme pembatasan perkembangan kanker. Sebaliknya, inflamasi berlebihan dan kronis dipicu oleh mediator inflamasi, termasuk sitokin, kemokin, dan enzim yang

diproduksi dan diperkirakan berkontribusi untuk promosi dan perkembangan kanker (Khiong *et al.*, 2010).



**Gambar 2.3: Imunitas Protumor (Inflamasi Kronis) dan Antitumor**

Inflamasi kronis berkembang melalui peran berbagai mediator inflamasi (gambar 2.3), termasuk TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  dan IL-17, yang mengarah pada pembatasan kekebalan antitumor sehingga mempercepat perkembangan tumor. Namun, TRAIL melalui induksi apoptosis sel tumor, IL-10 melalui efek antiinflamasi, dan IL-12 melalui aktivasi CTLs, NK sel dan ekspresi mediator sitotoksik dapat menyebabkan penekanan tumor (Lin *and* Karin, 2007).



**Gambar 2.4: Peran Inflamasi pada Inisiasi dan Promosi Kanker**

Inflamasi berperan dalam pertumbuhan dan perkembangan sel kanker (gambar 2.4) melalui:

- A. Inisiasi Tumor. ROS, RNI dihasilkan oleh sel inflamasi menyebabkan kerusakan oksidatif dan nitrosasi basa DNA yang meningkatkan resiko mutasi DNA pada sel epitel sekitarnya (Hussain and Hofseth, 2003). Sitokin yang dihasilkan sel inflamasi juga meningkatkan ROS intrasetuler dan RNI sel *pre-malignant*. Tumor yang berhubungan dengan inflamasi terjadi karena kontribusi dari ROS, RNI dan produksi sitokin (Grivennikov *et al.*, 2010).
- B. Promosi Tumor. Sitokin diproduksi dan infiltrasi sel imun oleh tumor mengaktifkan faktor transkripsi NFκB atau STAT3 pada sel *pre-malignant* untuk mengontrol proses protumorigenik seperti kelangsungan hidup sel, proliferasi, pertumbuhan, angiogenesis dan invasi (Grivennikov *et al.*, 2010).

## 2.5 Karsinogenesis dan Makrofag

Sel-sel kanker menggunakan beberapa mekanisme untuk menyerang matriks ekstraseluler dan bermetastasis ke organ lain. Interaksi antara sel kanker dan sel-sel stroma di lingkungan mikro tumor memainkan peran penting dalam pertumbuhan tumor dan metastasis. Makrofag adalah sel-sel stroma yang menonjol dalam interaksi ini. Makrofag berhubungan dengan berbagai faktor pertumbuhan, sitokin, kemokin, dan enzim yang mengatur tumor pertumbuhan, angiogenesis, invasi, dan metastasis (Lewis *and* Pollard, 2006).

Makrofag adalah sel yang paling banyak pada kanker, terdiri dari 2 subtype berbeda yang melakukan fungsi yang berlawanan yaitu immunosupresi dibandingkan proinflamasi (Jensen *et al.*, 2009). Aktivasi M1 dipicu oleh *Interferon- $\gamma$*  (IFN- $\gamma$ ), bakteri lipopolisakanida (LPS), atau *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ), dan dimediasi oleh beberapa transduksi sinyal jalur yang melibatkan transduser sinyal dan aktivator transkripsi (STAT), NF $\kappa$ B, dan *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK). Hal ini meningkatkan produksi agen mikrobisidal seperti *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Nitric Oxide* (NO) (Dale *et al.*, 2008), dan berikutnya mempromosikan respon imun inflamasi dengan meningkatkan presentasi kapasitas antigen dan menginduksi kekebalan Th1 melalui produksi sitokin seperti IL-12 (Edwards *et al.*, 2006). Sebaliknya, aktivasi M2 berbeda dengan aktivasi M1, diantaranya stimulasi IL-4/IL-13, induksi IL-10, dan memicu kekebalan kompleks. Diantara banyak perbedaan molekuler antara M1 dibandingkan aktivasi M2, rasio produksi IL-12 dan IL-10 digunakan untuk membedakan makrofag M1 dan M2 (Martinez *et al.*, 2008).

Pada sebagian besar kanker, keberadaan makrofag menguntungkan untuk pertumbuhan tumor dan metastasis. *Tumor Associated Macrophage* (TAM)

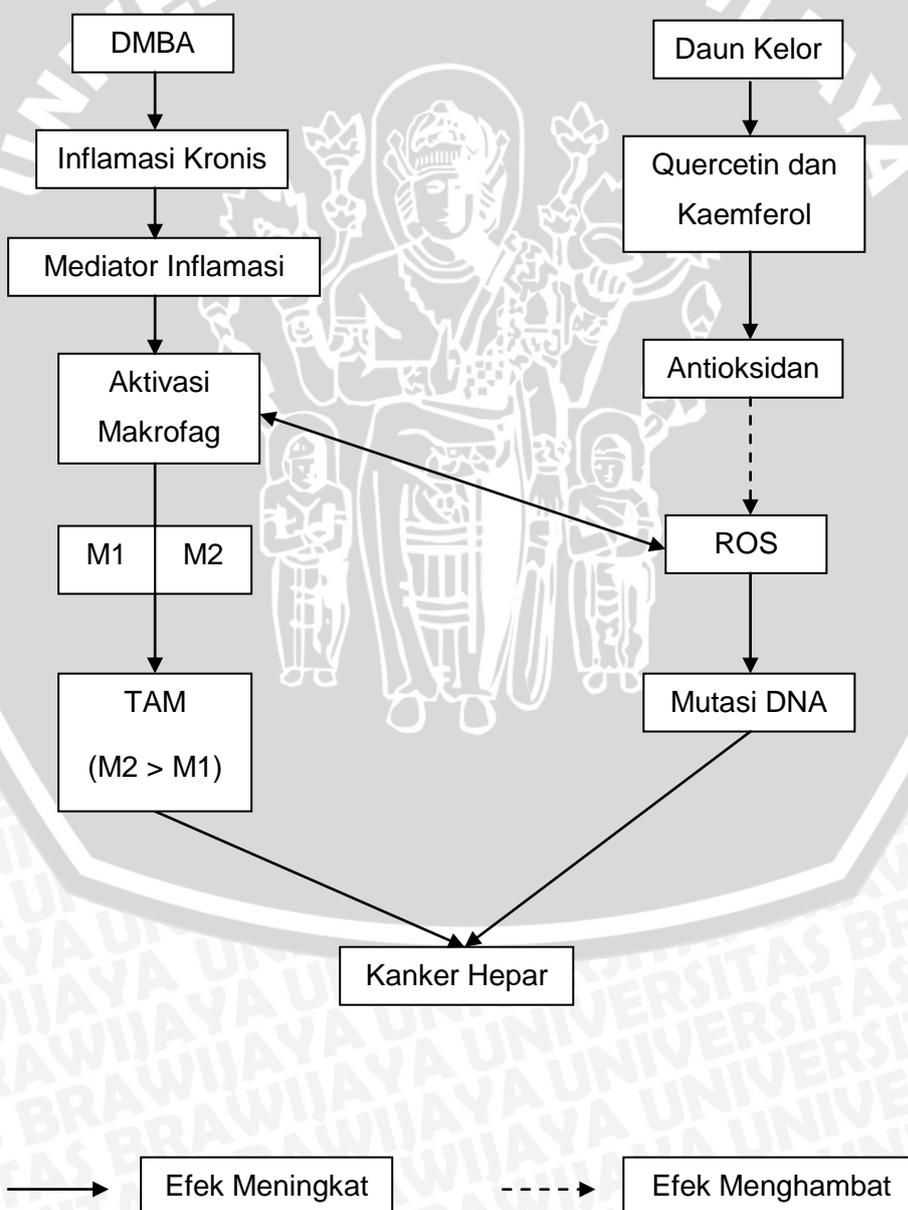
yang berasal dari monosit darah direkrut di lokasi tumor dengan molekul yang diproduksi oleh neoplastik dan sel stroma. TAM memiliki lebih banyak sifat makrofag M2. TAM menghasilkan IL-10 dan mengubah faktor pertumbuhan TGF- $\beta$  untuk menekan respon imun antitumor (Biswas *et al.*, 2006). Selain itu, TAM ikut mempromosikan neoangiogenesis tumor dengan sekresi faktor proangiogenik dan memfasilitasi metastasis tumor (Lin *and* Pollard, 2007). Pergeseran keseimbangan makrofag dari fenotipe tumorisidal menjadi fenotip immunosupresif dengan manipulasi kekebalan dari *host* merupakan target untuk terapi yang bisa diukur dengan parameter molekul CD68 makrofag (Jensen *et al.*, 2002).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep



**Keterangan:**

DMBA (*7,12-dimethylbenz[a]anthracene*) merupakan senyawa polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) yang metabolitnya dapat berikatan dengan DNA dan menyebabkan inisiasi karsinogenesis dan induksi ROS. Sel kanker yang tumbuh dianggap antigen sehingga akan direspon oleh imunitas tubuh dengan inflamasi. Inflamasi kronis berkembang melalui berbagai mediator inflamasi yang terdiri dari sitokin, kemokin dan enzim (COX-2).

Makrofag memiliki kemampuan dapat dengan cepat merubah fungsinya sebagai respon terhadap perubahan lingkungan. Inflamasi mengaktifkan makrofag menjadi 2 sub tipe yang berbeda, yaitu M1 dan M2. Makrofag disebut M1 ketika diinduksi oleh mediator seperti Lipopolisakarida (LPS) dan IFN- $\gamma$ . M1 akan mengekspresikan TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23, menghasilkan ROS, membunuh agen patogen dan mempersiapkan respon imun antitumor. Sedangkan makrofag disebut M2 ketika diinduksi oleh mediator seperti IL-10, IL-4, IL-13 dan glukokortikoid. M2 mempromosikan pertumbuhan sel tumor dan metastasis (Sica *et al.*, 2008).

*Tumor-associated macrophage* (TAM) adalah makrofag yang memiliki lebih banyak fenotip M2. TAM berasal dari monosit darah perifer yang tertarik ke dalam sel tumor oleh kemokin yang diproduksi oleh sel kanker dan sel stroma pada sel tumor. TAM berhubungan dengan berkurangnya aktivitas sitotoksik, rendahnya tingkat pro-inflamasi sitokin, terutama IL-12, tingginya tingkat IL-10 dan TGF, dan rendahnya *Antigen Presenting Cell* (APC). Beberapa studi klinis telah menunjukkan peningkatan jumlah TAM berkorelasi dengan angiogenesis,

metastasis, dan prognosis buruk (Pollard, 2008; Lin EY *et al.*, 2006; Qian B *et al.*, 2009).

Disamping itu, sel dan jaringan tubuh terus menerus terancam kerusakan karena radikal bebas (ROS) dari induksi DMBA dan makrofag. ROS juga dapat menginduksi aktivasi makrofag untuk pertumbuhan maupun apoptosis. Ketidakseimbangan antara antioksidan dengan ROS menimbulkan *oxidative stress* dan memicu kerusakan seluler. *Oxidative stress* berhubungan dengan kanker, penuaan, aterosklerosis, dan inflamasi (Buhler *and* Miranda, 2000).

Ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) yang mengandung quercetin dan kaemferol sebagai antioksidan diharapkan akan mengikat ROS sehingga menekan aktivasi makrofag agar tidak merangsang pertumbuhan kanker hepar. Efek antioksidan dilihat dengan menghitung jumlah makrofag yang diukur melalui marker CD68 makrofag.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Pemberian ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan jumlah CD68 Makrofag pada hepatokarsinogenesis tikus wistar yang diinduksi DMBA.

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian  
Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Rancangan eksperimental yang digunakan adalah rancangan eksperimen sederhana (*post test control group design*) dimana objek dibagi menjadi 5 kelompok (1 sampai dengan 5) secara random. Tiap kelompok terdiri dari 6 tikus kecuali kelompok 2 yang terdiri dari 9 tikus. Kelompok 1 adalah tikus yang tidak diberi diet mengandung DMBA (kontrol negatif), kelompok 2 tikus diberi diet mengandung DMBA saja (kontrol positif), sedangkan kelompok 3 sampai dengan 5 (perlakuan I-III) diberi diet mengandung DMBA dengan ekstrak methanol 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  $\pm$  2 bulan. Teknik randomisasi untuk pengelompokan perlakuan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) atau

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

#### 4.2.2 Estimasi Jumlah Pengulangan

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

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

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

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

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

$$5n \geq 21$$

$$n \geq 4.2$$

Dari rumus tersebut, jika banyak perlakuan adalah 5 maka jumlah pengulangan yang dibutuhkan untuk tiap-tiap kelompok perlakuan adalah 4. Jadi untuk 5 kelompok dibutuhkan sebanyak 20 tikus (Solimun, 2001).

#### 4.2.3 Kriteria Inklusi

1. Strain Wistar
2. Umur 2 bulan
3. Berat badan  $\pm 200$  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 aklimatisasi.

#### 4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian per oral ekstrak methanol daun kelor dengan dosis 20, 40, 80 mg/hari. Pemberian per oral ekstrak methanol daun kelor dengan sonde dilakukan selama 60 hari (Parvathy and Umamaheswari, 2007).

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah ekspresi CD68 Makrofag pada jaringan hepar. Variabel kendali adalah variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti agar objek penelitian selalu terkendali dan dalam keadaan homogen. Variabel kendali dalam penelitian ini meliputi:

1. Kriteria inklusi
2. Pemberian diet DMBA
3. 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. Satu kandang berisi satu ekor tikus.

2. Alat Pengolah Makanan Binatang Coba

Baskom plastik, timbangan, sarung tangan, gelas ukur.

3. Alat Pengambilan Sampel

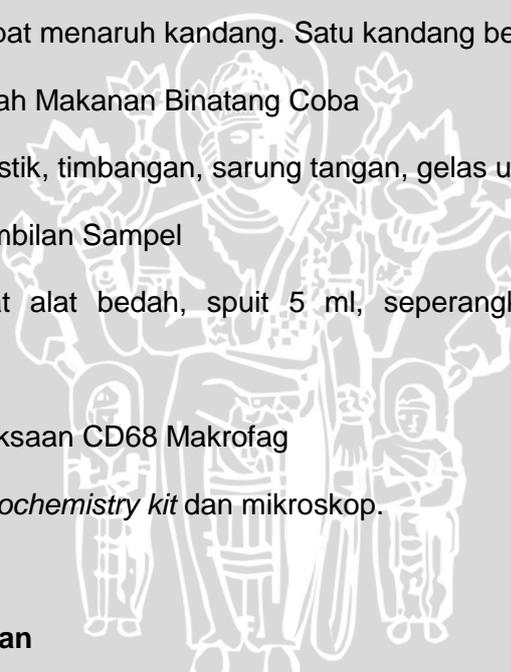
Seperangkat alat bedah, spuit 5 ml, seperangkat tabung reaksi, kapas.

4. Alat Pemeriksaan CD68 Makrofag

*Immunohistochemistry kit* dan mikroskop.

##### 4.5.2 Bahan Penelitian

1. Bahan Makanan Tikus

Pakan tikus dewasa per ekor per hari adalah 50 gram. Dalam penelitian ini terdapat satu macam pakan tikus yaitu diet normal untuk kelima kelompok perlakuan. Adapun komposisi pakan normal akan dijelaskan sebagai berikut: 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 methanol 96%. 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.

## 3. Bahan Pemeriksaan Immunohistokimia

Jaringan dari hepar tikus, antibodi CD68 Makrofag, IHK *kit unit*.

### 4.6 Definisi Operasional

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

Perlakuan (Intervensi) adalah pemberian suplementasi ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) 0, 20, 40, 80 mg/hari dengan cara dimasukkan per oral dengan sonde (Parvathy and Umamaheswari, 2007).

#### 2. Model tikus wistar kanker hepar

Tikus wistar diberi 10 mg/hari 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) per oral (sonde) selama 45 hari.

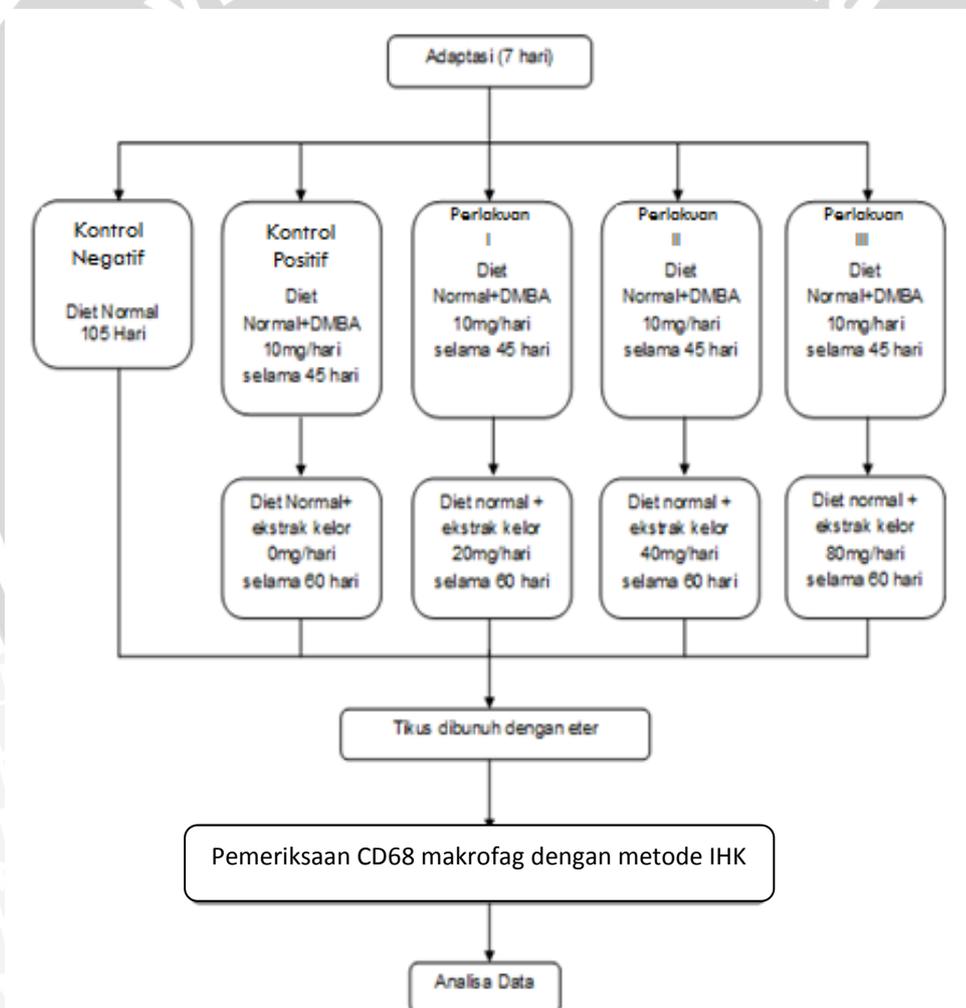
#### 3. Ekspresi CD68 Makrofag dalam jaringan hepar

Ekspresi CD68 Makrofag (berwarna coklat) dihitung dengan metode IHK pada setiap kelompok tikus. Jumlah CD68 Makrofag dihitung

dengan satuan sel dengan perbesaran mikroskop 400x sebanyak 10 lapangan pandang pada setiap tikus.

#### 4.7 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh pengetahuan mengenai efek ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap ekspresi CD68 Makrofag dalam jaringan tikus (*Rattus norvegicus*) wistar dengan diet mengandung DMBA. Alur penelitian dapat dijelaskan melalui bagan berikut.



Gambar 4.1: Alur Penelitian

#### 4.7.1 Adaptasi

Selama proses adaptasi, semua kelompok tikus diberi pakan standar (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 Tikus Model Kanker Hepar

Tikus wistar diberi 10 mg/hari 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) per oral (sonde). Pemberian DMBA dilakukan selama 45 hari. Setelah 45 hari, 1 ekor tikus yang diberi DMBA tanpa ekstrak *Moringa oleifera* dieuthanasia 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 1 (kontrol negatif), tikus hanya diberi pakan normal (standar) saja. Kelompok perlakuan 2 hingga 5 diberi diet DMBA sebanyak 10 mg/hari dengan sonde selama 45 hari. Selain itu, kelompok 2 diberi diet normal tanpa pemberian ekstrak methanol daun kelor. Sedangkan, kelompok 3 diberi ekstrak methanol daun kelor per oral dengan dosis 20 mg/hari dengan sonde + diet normal. Kelompok 4 diberi ekstrak methanol daun kelor per oral dengan dosis 40 mg/hari + diet normal. Kelompok 5 diberi ekstrak methanol daun kelor per oral dengan dosis 80 mg/hari + diet normal. Semua pakan di atas diberikan selama 60 hari.

#### 4.7.3.2 Pembedahan

Pemeriksaan ekspresi CD68 Makrofag dalam jaringan hepar tikus wistar pada eksperimen ini memerlukan jaringan hepar. Penelitian ini merupakan penelitian payung, yang meneliti efek ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) pada tikus wistar model kanker kolon dan hepar dengan parameter yang berbeda-beda. Karena itu, setelah 60 hari pemberian ekstrak methanol daun *Moringa oleifera* per oral, tikus dieuthanasia dengan cara pembiusan eter. Kemudian abdomen dibuka, setelah itu sebagian jaringan hepar diambil untuk diperiksa jumlah ekspresi CD68 Makrofag. Setelah penelitian, tikus dikuburkan di tempat yang aman oleh petugas.

#### 4.7.4. Pemeriksaan Imunohistokimia CD68 Makrofag

Berikut prosedur metode imunohistokimia CD68 Makrofag:

(Eton Bioscience, 2006)

1. Persiapan jaringan.

Setelah dipisahkan, jaringan hepar dibuat sediaan parafin. Lalu dipotong setebal 4-5  $\mu\text{m}$ , kemudian ditetesi air dan dikeringkan dengan memiringkan kaca objek secara vertical untuk memediasi adesi jaringan pada kaca objek. Selain itu juga dilakukan pemanasan slide selama 30 menit pada suhu 60°C atau 37°C selama satu malam.

2. Deparafinisasi dan rehidrasi menggunakan:

Xylo1 10 menit, xylo2 5 menit, serta alcohol absolute, alcohol 95%, alcohol 90%, alcohol 80%, alcohol 70% selama masing-masing 5

menit. Kemudian dibilas dengan PBS 3 kali selama masing-masing 5 menit dan diseka dengan tisu.

3. Lalu ditambahkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% selama 20 menit dan dicuci dengan PBS 3 kali selama masing-masing 5 menit dan diseka dengan tisu.
4. Blocking dengan BSA 1% selama 30 menit lalu bilas dengan PBS 3 kali masing-masing 5 menit dan diseka dengan tisu.
5. Pemberian antibodi primer CD68 Makrofag pada suhu 37°C selama 60 menit, lalu bilas dengan PBS 3 kali masing-masing selama 5 menit dan diseka dengan tisu.
6. Pemberian antibodi sekunder selama 60 menit lalu bilas lagi dengan PBS 2 kali selama masing-masing 5 menit dan diseka dengan tisu.
7. SA-HRP 60 menit, bilas dengan PBS 2 kali masing-masing dan diseka dengan tisu.
8. DAB ± 20 menit, lalu cuci dengan akuades 2x masing-masing 5 menit dan diseka dengan tisu.
9. *Control staining mayer*, hematoxilen 10 detik, lalu dicuci dengan air kran sampai bersih dan dikeringkan dengan tisu.
10. *Mounting* dengan entelan.

Setelah siap, sediaan diperiksa dibawah mikroskop perbesaran 400x untuk melihat ekspresi CD68 Makrofag.

#### 4.7.5. Cara Pemeriksaan Mikroskop

Untuk menghitung jumlah CD68 Makrofag pada preparat jaringan hepar yang sudah diproses sebelumnya dengan metode immunohistokimia digunakan mikroskop potret di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran

Universitas Brawijaya. Preparat diletakkan pada mikroskop dengan perbesaran okular 10x dan perbesaran objektif 10x. Setelah terlihat jaringan hepar, maka perbesaran objektif ditambah menjadi 40x. Pengamatan dilakukan pada 10 lapang pandang yang berbeda supaya hasil yang didapatkan bersifat objektif.

#### 4.8. Pengolahan dan Analisis Data

Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif yaitu:

1. Uji normalitas data menunjukkan bahwa sebaran data penelitian ini normal ( $p > 0,05$ ).
2. Uji homogenitas varian yang menunjukkan bahwa data yang diperoleh memiliki varian yang homogen ( $p > 0,05$ ). Karena data normal dan homogen, analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.
3. Uji *One-way* ANOVA didapatkan nilai rata-rata jumlah ekspresi CD68 TAM dari kelima populasi memang berbeda ( $p < 0,05$ ). Dengan demikian terdapat minimal 2 kelompok yang berbeda signifikan.
4. Analisis data kemudian dilakukan dengan *Post Hoc test* (uji Tuckey HSD), uji *Post Hoc* yang digunakan adalah uji Tuckey HSD dengan tingkat kemaknaan 95% ( $p < 0,05$ ).
5. Untuk melengkapi analisis yang dilakukan, digunakan uji *Homogenous Subsets*. Uji ini 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

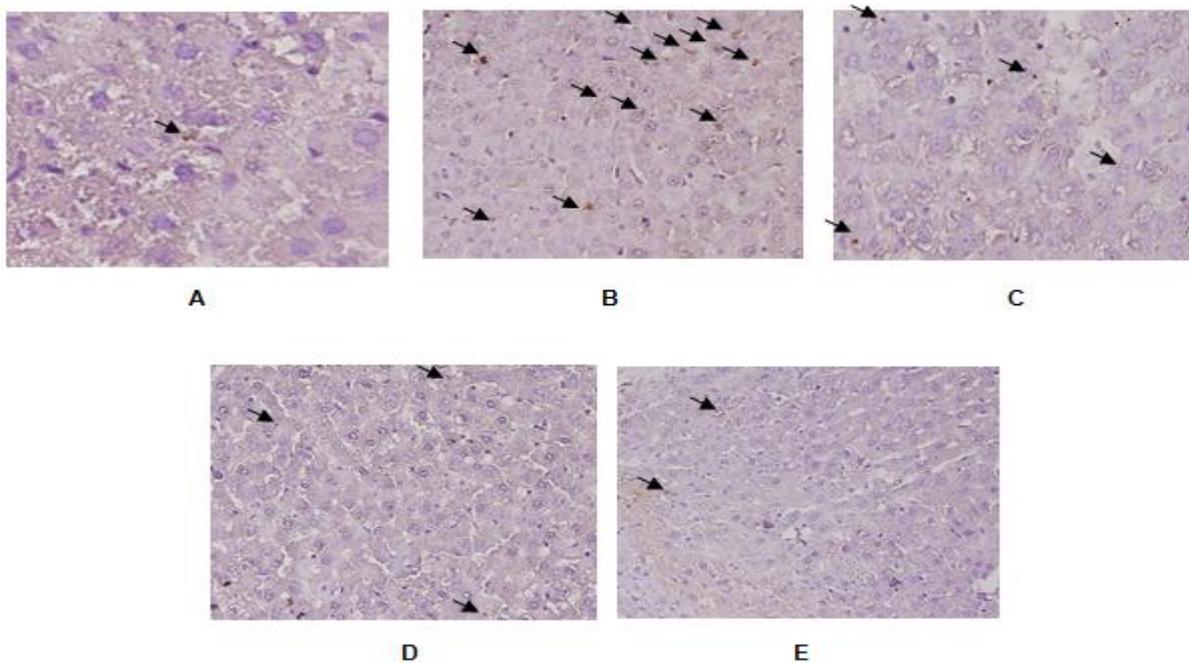
Pada penelitian ini didapatkan data untuk masing-masing kelompok perlakuan. Terdapat lima macam perlakuan, yaitu kelompok 1 adalah tikus diberi diet normal saja selama 105 hari (kontrol negatif); kelompok 2 tikus diberi diet normal dan 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) selama 45 hari (kontrol positif), selanjutnya diet normal tanpa ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*); sedangkan kelompok 3 sampai dengan 5 (Perlakuan I-III) diberi diet normal dan 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) selama 45 hari, selanjutnya diberi asupan ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan dosis berbeda (20, 40 dan 80 mg/hari) secara per oral dengan sonde setiap hari sekali selama 60 hari.

Pemeriksaan jumlah CD68 Makrofag yang teraktivasi dengan menggunakan pengecatan IHK dan dihitung di bawah mikroskop dilakukan terhadap semua kelompok dari jaringan hepar tikus wistar. Pemeriksaan rata-rata jumlah CD68 Makrofag dilakukan terhadap masing-masing kelompok perlakuan ditampilkan pada gambar 5.1. Rata-rata pada masing-masing perlakuan dihitung dengan cara menjumlahkan semua CD68 Makrofag yang teraktivasi pada masing-masing kelompok perlakuan dibagi dengan jumlah sampel pada masing-masing kelompok perlakuan. Dari 6 sampel yang didapat, hanya 4 sampel yang

diambil karena jumlah pengulangan yang dibutuhkan untuk tiap-tiap kelompok perlakuan dalam penelitian ini adalah 4.

**Tabel 5.1 Rata-rata Jumlah CD68 Makrofag Teraktivasi**

Kelompok	Mean	Std. Deviation
1 (Kontrol Negatif)	3,475	.73201
2 (Kontrol Positif)	31,025	3.47886
3 (Perlakuan I)	9,05	1.09087
4 (Perlakuan II)	5,5	.82865
5 (Perlakuan III)	3,875	.27538
Total	10.585	10.78524

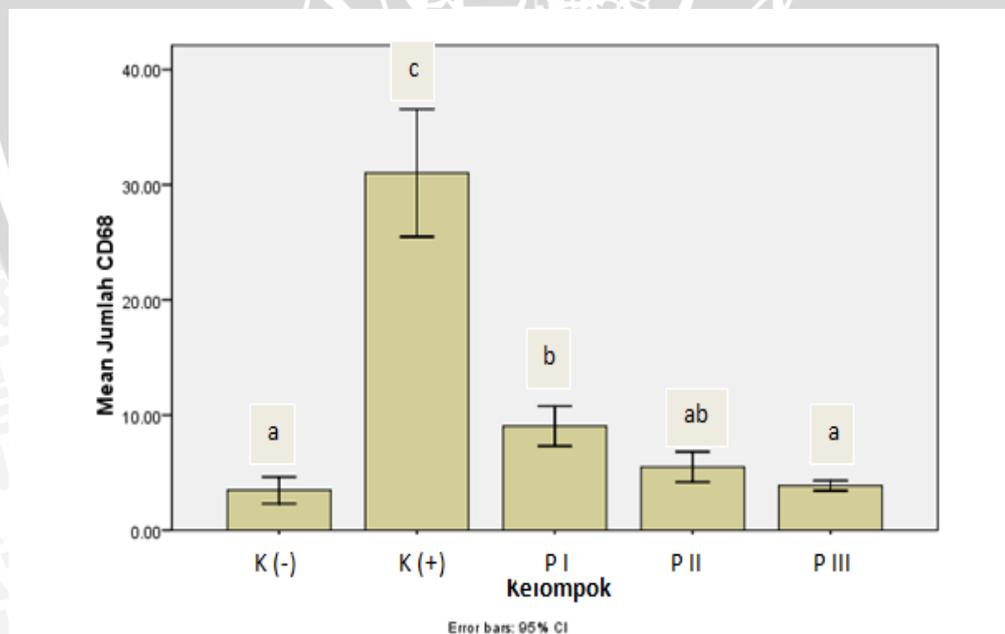


**Gambar 5.1** Irisan Hepar dengan Sel CD68 Makrofag yang Teraktivasi (metode IHC, 400x) Terlihat Berwarna Coklat dan Ditunjuk Tanda Panah

Keterangan: A: Kelompok 1 (Kontrol Negatif), B: Kelompok 2 (Kontrol Positif), C: Kelompok 3 (Perlakuan I), D: Kelompok 4 (Perlakuan II), E: Kelompok 5 (Perlakuan III).

## 5. 2 Analisis Data

Rata-rata jumlah CD68 Makrofag yang teraktivasi pada kelompok 1 (Kontrol Negatif) adalah 3,475 sel (dengan perbesaran mikroskop 400x). Rata-rata jumlah CD68 Makrofag yang teraktivasi pada kelompok 2 (Kontrol Positif) adalah 31,025 sel (dengan perbesaran mikroskop 400x). Rata-rata jumlah CD68 Makrofag yang teraktivasi pada kelompok 3 (Perlakuan I) adalah 9,05 sel (dengan perbesaran mikroskop 400x). Rata-rata jumlah CD68 Makrofag yang teraktivasi pada kelompok 4 (Perlakuan II) adalah 5,5 sel (dengan perbesaran mikroskop 400x). Rata-rata jumlah CD68 Makrofag yang teraktivasi pada kelompok 5 (Perlakuan III) adalah 3,875 sel (dengan perbesaran mikroskop 400x).



**Gambar 5.2 Grafik Rata-rata Jumlah CD68 Makrofag yang Teraktivasi pada Setiap Kelompok**

Keterangan: Kontrol (-) dan Kontrol (+) memiliki perbedaan yang signifikan. Perbandingan Kontrol (+) dengan P I, II, dan III menunjukkan bahwa pemberian ekstrak methanol daun kelor menurunkan CD68 Makrofag seiring dengan peningkatan dosis yang diberikan. Dosis optimal terletak pada PII. Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ).

Dari gambar 5.2 terlihat rata-rata jumlah CD68 Makrofag yang teraktivasi yang terendah terdapat pada kelompok 1 (Kontrol Negatif) yaitu sebesar 3,475 sel (dengan perbesaran mikroskop 400x). Sedangkan rata-rata jumlah CD68 Makrofag tertinggi terdapat pada kelompok 2 (Kontrol Positif) yaitu sebesar 31,025 sel (dengan perbesaran mikroskop 400x).

Data yang didapatkan dari hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan program komputer SPSS 16 untuk Windows. Rata-rata jumlah CD68 Makrofag yang teraktivasi menunjukkan bahwa pada kelompok 3, 4, 5 (Perlakuan I, Perlakuan II, Perlakuan III) yang mendapat diet normal, DMBA, dan ekstrak kelor pada berbagai dosis memiliki jumlah CD68 Makrofag yang teraktivasi lebih rendah dibandingkan dengan kelompok 2 (kontrol positif) ( $p=0,000$ ).

Hasil penelitian tersebut diuji dengan uji normalitas data dan homogenitas varian, seperti tersusun dalam lampiran 3 dan 4. Untuk menguji normalitas distribusi data digunakan Shapiro-Wilk (Lampiran 1). Didapatkan bahwa distribusi data hasil penelitian ini adalah normal. Sedangkan untuk menguji homogenitas varian digunakan *Levene test* (Lampiran 2). Dari hasil *Levene test* tampak bahwa data berasal dari populasi-populasi yang memiliki varian sama ( $p=0,085$ ). Oleh karena data hasil penelitian memiliki distribusi normal, dan varian yang homogen, dapat dilakukan pengujian *One-way ANOVA*.

Uji ANOVA (*Analysis of Variance*) (Lampiran 3) dilakukan untuk menguji variasi dari rata-rata (*mean*) CD68 Makrofag yang teraktivasi di setiap kelompok. Dari hasil tes tersebut didapatkan variasi yang berbeda ( $p=0,000$ ) di setiap

kelompok. Hal ini menunjukkan bahwa pada penelitian ini 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 4).

Dari hasil *Tukey HSD test* terdapat perbedaan jumlah CD68 Makrofag pada jaringan tikus secara nyata antara kelompok 1 (Kontrol Negatif) dengan kelompok 2 (Kontrol Positif) ( $p=0,000$ ), kelompok 1 (Kontrol Negatif) dengan kelompok 3 (Perlakuan I) ( $p=0,003$ ), kelompok 2 (Kontrol Positif) dengan kelompok 3 (Perlakuan I) ( $p=0,000$ ), kelompok 2 (Kontrol Positif) dengan kelompok 4 (Perlakuan II) ( $p=0,000$ ), kelompok 2 (Kontrol Positif) dengan kelompok 5 (Perlakuan III) ( $p=0,000$ ) dan kelompok 3 (Perlakuan I) dengan kelompok 5 (Perlakuan III) ( $p=0,005$ ). Sedangkan analisis antara kelompok 1 (Kontrol Negatif) dengan kelompok 4 (Perlakuan II) ( $p=0,476$ ), kelompok 1 (Kontrol Negatif) dengan kelompok kelompok 5 (Perlakuan III) ( $p=0,997$ ), kelompok 3 (Perlakuan I) dengan kelompok 4 (Perlakuan II) ( $p=0,066$ ), kelompok 4 (Perlakuan II) dengan kelompok 5 (Perlakuan III) ( $p=0,669$ ) tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

Untuk melengkapi hasil dari uji *Tukey* digunakan *Homogeneous Subsets* (Lampiran 5) 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 1 (Kontrol Negatif), kelompok 5 (Perlakuan III), dan Kelompok 4 (Perlakuan II). Pada subset 2 terdapat dua kelompok, yaitu kelompok 4 (Perlakuan II) dan kelompok 3

(Perlakuan I). Pada subset 3 terdapat satu kelompok, yaitu kelompok 2 (Kontrol Positif). Dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara subset sesuai hasil uji *Tukey*.

Dari hasil-hasil tersebut (Gambar 5.2) dapat dilihat jumlah CD68 Makrofag yang teraktivasi telah menurun pada Perlakuan I (kelompok 3) dan mengalami penurunan berturut-turut pada Perlakuan II dan III (kelompok 4 dan 5). Pada Perlakuan I (kelompok 2), hasilnya memiliki perbedaan yang signifikan terhadap Kontrol Positif (kelompok 2) dan Kontrol Negatif (kelompok 1). Sedangkan pada perlakuan II (kelompok 4) dan perlakuan III (kelompok 5), hasilnya memiliki perbedaan yang signifikan terhadap Kontrol Positif (kelompok 2) dan tidak signifikan terhadap Kontrol Negatif (kelompok 1). Oleh karena itu dapat diambil kesimpulan bahwa ekstrak methanol daun kelor memiliki efek penghambatan aktivasi CD68 Makrofag pada jaringan hepar dan dosis optimal terletak pada perlakuan II (kelompok 4) karena merupakan dosis terkecil yang telah mendekati normal.



## BAB 6

### PEMBAHASAN

Penelitian mengenai efek ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap jumlah rata-rata CD68 makrofag tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diberi DMBA telah dilakukan. Paparan DMBA menginduksi perubahan patologi klinik melalui toksisitas yang terjadi pada kulit, hepar, kelenjar *mammae*, dan ginjal. Pada hepar ditandai dengan adanya kerusakan parenkim hepatoseluler, lesi hati, tumor dan kanker (Paliwal *et al.*, 2011). Hal ini sesuai dengan kenaikan jumlah CD68 makrofag setelah tikus diberi diet DMBA tanpa ekstrak methanol daun kelor. Selanjutnya terjadi penurunan jumlah CD68 makrofag setelah pemberian ekstrak methanol daun kelor. Hal ini disebabkan pemberian ekstrak methanol daun kelor mengandung antioksidan (flavonoid) yang akan menghambat radikal bebas dan pada akhirnya aktivasi makrofag akan menurun jumlahnya (Nijveldt *et al.*, 2001). Dosis optimal dalam penelitian ini adalah 40 mg/hari karena pada pemberian dosis tersebut jumlah CD68 makrofag telah mendekati normal.

Pada manusia, dosis yang dipakai dalam penelitian dikonversi dari tikus melibatkan perhitungan berat rata-rata dan *Body Surface Area* (BSA) (Reagan-Shaw, *et al.*, 2007). Faktor konstanta untuk manusia dewasa dengan rata-rata berat 60 kg dan BSA 1,6 m<sup>2</sup> adalah 37 sedangkan untuk tikus dengan rata-rata

berat 0,15 kg dan BSA 0,025 m<sup>2</sup> adalah 6. Jadi dosis 40 mg/hari untuk tikus jika dikonversi untuk manusia menjadi  $40 \times 6/37 = 6,48$  mg/hari.

DMBA menurunkan aktivitas enzim antioksidan yang bersifat kemoprotektif terhadap radikal bebas seperti superoxide dismutase dan katalase pada hepar (Paliwal *et al.*, 2011). Beberapa bukti menunjukkan bahwa DMBA menginduksi produksi *reactive oxygen species* (ROS) yang menghasilkan lipid peroksidasi, kerusakan DNA, dan penipisan sel antioksidan sistem pertahanan sehingga akan terjadi stres oksidatif (Rupjyoti *et al.*, 2003).

Stres oksidatif bertanggung jawab pada terjadinya inflamasi sebagai respon imunitas tubuh. Makrofag adalah kunci terjadinya inflamasi kronis. Makrofag berasal dari monosit yang kemudian berdiferensiasi menjadi 2 kelas utama yaitu M1 dan M2 sehingga memiliki populasi yang heterogen. Monosit menjadi M1 ketika diaktivasi oleh LPS dan IFN- $\gamma$ . M1 menghasilkan IL-12, IL-1, IL-23, TNF- $\alpha$ , dan CXCL10 sehingga memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel neoplastik, ekspresi ROI tinggi dan kemampuan sebagai APC. Disisi lain, monosit akan menjadi M2 ketika diaktivasi IL-4, IL-13, IL-10, atau kortikosteroid. M2 mensekresi IL-10, CCL17, CCL22, dan CCL18. Sel-sel M2 aktif mempromosikan angiogenesis, remodelling, dan perbaikan jaringan yang rusak. Dalam tumor, M2 berperan mendukung promosi tumor, mengontrol inflamasi dengan menurunkan aktivitas M1 dan imunitas adaptif (Martinez *et al.*, 2009).

TAM lebih banyak memiliki fenotip M2. TAM yang berasal dari monosit darah direkrut di lokasi tumor oleh sel stroma neoplastik. Faktor utama yang terlibat dalam rekrutmen monosit adalah kemokin CCL2, M-CSF, dan VEGF. Ketika monosit mencapai massa tumor, mereka dikelilingi oleh beberapa sinyal *microenvironmental* seperti IL-3 dan M-CSF sehingga menginduksi diferensiasi

monosit menjadi makrofag (TAM) dan memproduksi bahan yang diperlukan oleh tumor (CSF, IL-4, IL-10, dan TGF- $\beta$ ). TAM memainkan peran penting dalam pertumbuhan dan perkembangan tumor. TAM menghasilkan beberapa molekul yang mempertahankan kelangsungan hidup sel ganas, memodifikasi protein ECM neoplastik, mempromosikan pembentukan pembuluh darah baru, dan membantu progresifitas sel-sel tumor (Solinas *et al.*, 2009).

Mekanisme potensi anti-tumor makrofag yang berubah menjadi pro-tumor dapat dijelaskan sebagai berikut. Keseimbangan makrofag memiliki efek yang berbeda pada tahapan perkembangan tumor (Mantovani *et al.*, 2009). Pada tahap awal reaksi imun, makrofag efektif dalam penghapusan sel tumor (M1), sedangkan pada aktivasi imun adaptif saat stadium lanjut dan ketika sel tumor telah lolos dari sel-sel imun, makrofag yang diaktivasi cenderung bergeser ke arah M2 yang memiliki fungsi pro-tumor (TAM) (Dunn *et al.*, 2004). Tidak ada teori yang pasti kapan makrofag berpindah fungsi sehingga dibutuhkan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pada titik manakah mulai muncul TAM sebagai tanda terjadinya karsinogenesis.

Dalam uji *in vitro*, sitokin yang diproduksi oleh makrofag (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) menginduksi aktivasi NF $\kappa$ B dalam usus sel kanker dan memproduksi VEGF. Sebagaimana hasil penelitian lain, VEGF dapat meningkatkan angiogenesis dan metastasis pada kanker kolorektal (Jedinak *et al.*, 2010). Selain itu, makrofag juga berhubungan dengan prognosis buruk di sebagian besar tumor. Sebagai contoh, suatu penelitian pada pasien limfoma Hodgkin melaporkan bahwa jumlah CD68 tinggi sangat berkorelasi dengan resistensi terhadap pengobatan dan kelangsungan hidup yang menurun (Steidl *et al.*, 2010). Berdasarkan pemaparan

diatas, jalur makrofag adalah salah satu jalur yang efektif untuk dihambat ketika merencanakan suatu terapi terhadap kanker.

Daun kelor (*Moringa oleifera*) mempunyai peran penting dalam proses inflamasi. Daun kelor mengandung dua jenis zat bioaktif yaitu quercetin dan kaempferol. Kedua jenis zat bioaktif tersebut termasuk dalam bioflavonoid. Flavonoid mempunyai kecenderungan mengikat atom, atau sebagai "scavenging" bagi radikal bebas sehingga tidak terbentuk ROS berlebihan (Nakagawa and Kawagoe, 2000). Oleh karena itu diharapkan daun kelor berperan pula pada proses inflamasi kronis pada hepatokarsinogenesis.

Antioksidan adalah senyawa yang mampu menghambat oksidasi. Antioksidan merupakan senyawa pelindung sel melawan efek merusak dari *Reactive Oxygen Species* (ROS). Ketidakseimbangan antara antioksidan dengan ROS menimbulkan *oxidative stress* dan memicu kerusakan selular. *Oxidative stress* berhubungan dengan kanker, penuaan, atherosklerosis, dan inflamasi (Buhler and Miranda, 2000). Menurut penelitian, daun kelor adalah sumber antioksidan alami yang potensial dengan methanol yang merupakan salah satu pelarut terbaik untuk ekstraksinya. Senyawa bioaktif yang utama ditemukan adalah quercetin dan kaempferol (Shidduraju and Becker, 2003). Sumber lain mengatakan quercetin dan kaempferol dengan bentuk 3'-O-glikosida merupakan flavonol yang dominan pada daun kelor (Manguro and Lemmen, 2007) dengan konsentrasi flavonol quercetin mencapai 100mg/100g daun kelor (Lako *et al.*, 2007).

Quercetin berguna sebagai agen antikanker yang poten untuk menginduksi apoptosis (Akan, 2011). Kaempferol menunjukkan penghambatan yang poten terhadap aktifitas generasi ROS (Sharma *et al.*, 2007). Sebagai antioksidan,

Quercetin dan kaempferol menghambat produksi NO, protein iNOS dan ekspresi mRNA dari aktivasi makrofag. Selanjutnya quercetin dan kaempferol menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B dan STAT-1 sehingga juga mempengaruhi proses inflamasi (Hamalainen *et al.*, 2007).

Efek ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap kadar CD68 makrofag pada tikus strain Wistar yang diinduksi *dimethylbenz[a]anthracene* (DMBA) telah berhasil diteliti. Hasil penelitian menunjukkan potensi kelor sebagai substansi yang mencegah sekaligus menghambat dan mengatasi perkembangan terjadinya karsinogenesis hepar lebih lanjut. Hal ini dimungkinkan karena efek dari kelor yang dapat menurunkan kadar CD68 makrofag pada serum tikus perlakuan. Hasil ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Parvathi dan Umamaheswari (2007) yang mengatakan bahwa ekstrak daun kelor memiliki efek sitotoksik pada sel Multiple Myeloma manusia setelah diterapi.

Peningkatan efek antioksidan quercetin dan kaempferol mungkin terjadi bila dosis pemberian ekstrak metanol daun kelor ditambahkan. Namun karena tidak didapatkan batas dimana penurunan kadar CD68 makrofag berhenti ketika dosis daun kelor ditambahkan, maka pada penelitian ini tidak ditemukan dosis dimana efek antioksidan daun kelor berubah menjadi prooksidan.

## BAB 7 PENUTUP

### 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan jumlah CD68 makrofag pada hepatokarsinogenesis tikus wistar yang diinduksi DMBA. Dosis optimal pada penelitian ini adalah 40 mg/hari.

### 7.2 Saran

Dari penelitian ini, saran yang dapat diajukan adalah:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui apakah terdapat peningkatan efek antioksidan dan efek samping dari daun kelor (*Moringa oleifera*) bila dosis perlakuan ditambah.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis dimana efek antioksidan daun kelor (*Moringa oleifera*) berubah menjadi prooksidan.

## DAFTAR PUSTAKA

Abdel-Hamid, N. M. 2011. *A Survey on Herbal Management of Hepatocellular Carcinoma*. *World J Hepatol*, July 27; 3(7): 175-183

Akan, Zafer. 2011. *Protective Role Of Quercetin: Antioxidants May Protect Cancer Cells From Apoptosis And Enhance Cell Durability*, (Online), ([http://www.webmedcentral.com/wmcpdf/Article\\_WMC001504.pdf](http://www.webmedcentral.com/wmcpdf/Article_WMC001504.pdf)), diakses 30 Oktober 2011)

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Roberts, K., Watson, J.D. 1994. *Molecular Biology Of The Cell*, Third ed, 1255, 1269, 1270, 1282, 1283, Garland Publ Inc, NY and London

Allavena P, Sica A, Solinas G, et al. 2008. *The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages*. *Crit Rev Oncol Hematol* 66:1-9

Anonim. 2008. *Kanker Hati*, (Online), (<http://totalkeehatananda.com/>), diakses 6 November 2011)

Anonim. 2011. *Liver Cancer*, (Online), ([www.cancerhelps.co.id](http://www.cancerhelps.co.id)), diakses 6 November 2011)

Anwar F, Ashraf M, Bhangar MI. 2005. *Interprovenance variation in the composition of Moringa oleifera oilseeds from Pakistan*. *J Am Oil Chem Soc* 82: 45-51

Aravalli, R. N., et al. 2008. *Molecular Mechanism of Hepatocellular Carcinoma*. *Hepatology*, 48: 2047-2063

Baratawidjaja, K. G., Rengganis, I. 2009. *Imunologi Dasar*. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Biswas SK, Gangi L, Paul S, et al. 2006. *A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF- $\kappa$ B and enhanced IRF-3/STAT1 activation)*. *Blood* 107: 2112-22

Bruix J, Sherman M. 2005. *Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases*. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* Nov;42(5):1208-36

Buhler, D.R. and Miranda, C. 2000. *Antioxidant Activities of Flavonoids*. Department of Environmental and Molecular Toxicology, Oregon State University

Carr, Brian I. 2005. *Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis and Treatment*. Jakarta: Humana Press

Chen JJ, Lin YC, Yao PL, Yuan A, Chen HY, Shun CT, Tsai MF, Chen CH, Yang PC. 2006. *Tumor-Associated Macrophages*. *J. Cancer Mol.* 2(3): 101-106

Constantinou, Al., Mehta, R., Husband, A. 2003. *Phenoxodiol, a novel isoflavone derivative, inhibits 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats*. *European Journal of cancer* 39:1012-1018

Corwin, Elizabeth J. 2000. *Buku Saku Patofisiologi*. EGC: Jakarta

Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A., and Oter, S. 2005. *Quercetin, a Flavonoid Antioxidant, Prevent and Protects Streptozotocin Induced Oxidative Stress and Beta Cell Damage in Rat Pancreas*. *Pharmacol Res*, 51 (2) : 117-123

Czauderna, P., Perilongo, G. 2004. *Hepatocellular Carcinoma*, (Online), (<http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-Hepatocellulercarcinoma.pdf>, diakses 9 November 2011)

Della Porta, G. And Terracini, B., 1969. *Chemical carcinogenesis in infant animals*. *Prog. Exp. Tumor Res.*,11, 334

Depkes. 2007. *Survei Kanker Global Indonesia*, (Online), ([www.depkes.go.id](http://www.depkes.go.id), diakses 10 November 2011)

Dillard CJ, German JB. 2000. *Phytochemicals: nutraceuticals and human health: A review*. *J Sci Food Agric* 80: 1744–1756

D'souza J, Kulkarni AR. 1993. *Comparative studies on nutritive values of tender foliage of seedlings and mature plants of Moringa oleifera Lam.* J Econ Taxon Bot 17: 479–485

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. 2004. *The Three Es of Cancer Immunoediting.* Annu Rev Immunol 22:329–360

Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, et al. 2006. *Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations.* JLeukoc Biol 80:1298–307

Estrella MCP, Mantaring JBV, David GZ. 2000. *A double blind, randomised controlled trial on the use of malunggay (Moringa oleifera) for augmentation of the volume of breastmilk among non-nursing mothers of preterm infants.* Philipp J Pediatr 49: 3–6

Eton Bioscience Inc. 2006. *CD68 Immunohistochemistry: Protocol.* (Online), <http://www.etonbio.com/Products/Immunohistochemistry%20Assay%20Kit/product.php?sku=310005#2>, diakses tanggal 17 November 2011)

Faizi S, Siddiqui BS, Saleem R. 1995. *Fully Acetylated Carbamate and Hypotensive Thiocarbonated Glycosidea from Moringa Oleifera.* J. Phytochemistry. 38:957-963

Fuglie LJ. 1999. *The Miracle Tree: Moringa oleifera: Natural Nutrition for the Tropics.* Church World Service, Dakar. 68 pp

Grivennikov, S. I., Greten, F. R., Karin, M. 2010. *Immunity, Inflammation, and Cancer.* NIH Public Access March 19; 140(6): 883–899

Guevara AP, Vargas C, Sakurai H, et al. 1999. *An Antitumor Promoter from Moringa Oleifera Lam.* Mutat Res. 440:181-188

Hamalainen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, Mollanen E. 2007. *Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin and daidzein inhibit STAT-1 and NF- $\kappa$ B activations, whereas flavone isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- $\kappa$ B activation along with their inhibitory effects on iNOS expression and NO production in activated macrophages.* Mediators Inflamm.: 45673 – 45683

Hanahan D & Weinberg RA. 2000. *The Hallmark of Cancer*. Cell 100: 57-68

Hosokawa, N., Hirayoshi, K., Kudo, H., Takechi, H., Aoike, A., Kawai, K., and Nagata, K. 1992. *Inhibition of the activation of heat shock factor in vivo and in vitro by flavonoids*. MoL Cell. Biol., 12: 3490-3498

Inoue, M.; Nishikawa, M.; Park, A.M.; Kira, Y.; Imada, I.; Utsumi, K. 2003. *Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life*. Curr. Med. Chem., 10, 2495–2505

Integrated Taxonomic Information System, 2000. *Moringa oleifera* Lam., (Online), ([http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=503874](http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=503874), diakses 6 Desember 2011)

Jedinak A, Dudhgaonkar S, Sliva D. 2010. *Activated Macrophages Induce Metastatic Behavior of Colon Cancer cells*. Immunobiology 215:242–249

Jensen, T.O, Schmidt, H., Møller H. J., *et al.* 2008. *Macrophage Markers in Serum and Tumor Have Prognostic Impact in American Joint Committee on Cancer Stage I/II Melanoma*. Blood 2008;112:935–45

Kerr, M., 2004, *Liver Cancer Fastest Growing Cancer in US*, (Online), (<http://www.nlm.nih.gov>, diakses 2 Desember 2011)

Khiong, K., Adhika, O. A., Chakravitha, M. 2010. *Inflammation, Immunity, and Cancer: The Role of Transcription Factors NF- $\kappa$ B and STAT3*. Majalah Kedokteran Indonesia, Volum: 60, Nomor: 8, Agustus 2010

Knecht, P., *et al.* 1997. *Dietary Flavonoids and the Risk of Lung Cancer and Other Malignant Neoplasms*, Am. J. Epidemiol, 146 : 223

Koishi, M., Hosokawa, N., Sato, M., Nakai, A., Hirayoshi, K., Hiraoka, M., Abe, M., and Nagata, K. 1992. *Quercetin, an inhibitor of heat shock protein synthesis, inhibits the acquisition of thermotolerance in a human colon carcinoma cell line*. Jpn. J. Cancer Res., 83: 1216-1222

Kumar, V., Cotran, R. S., Robbins., S. L. 2007. *Buku Ajar Patologi*. Jakarta: EGC

Lako, J., Trener r y, V. C., Wahlqvist, M.L., Wattanapenpaiboon, N., Subramaniam, S. And Premier, R. 2007. *Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods*. Food Chemistry 101: 1727-1741

Lewis CE, Pollard JW. 2006. *Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments*. Cancer Res 66(2):605-612

Lin EY, Li JF, Gnatovskiy L, et al. 2006. *Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer*. Cancer Res 66:11238-46

Lin, W., Karin, M. 2007. [A Cytokine-Mediated Link between Innate Immunity, Inflammation, and Cancer](#). J Clin Invest. 117(5):1175-1183

Manguro L. O., Lemmen P. 2007. *Phenolics of Moringa oleifera Leaves*. Nat. Prod. Res. 21, 56-68

Mantovani A, Sica A, Allavena P, Garlanda C, Locati M. 2009. *Tumor-Associated Macrophages and The Related Myeloid-Derived Suppressor Cells as A Paradigm of The Diversity of Macrophage Activation*. Hum Immunol 70:325-330

Marsh, J. W., Dvorchik, I., Bonham, C. A. and Iwatsuki, S. 2000. *Is the pathologic TNM staging system for patients with hepatoma predictive of outcome?*. Cancer, 88: 538-543

Martinez FO, Sica A, Mantovani A, et al. 2008. *Macrophage activation and polarization*. Front Biosci 13:453-61

Martinez, F. O., Helming, L., Gordon, S. 2009. *Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective*. Annu. Rev. Immunol. 27, 451-483

Melendez-Colon, V., Luch, A., Seidel, A., and Baird, W. M., 1999. *Cancer Initiation by Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Results from Formation of Stable DNA Adducts rather than Apurinic Sites*. Carcinogenesis 20 (10), 1885-1891

Morimitsu Y, Hayashi K, Nakagama Y, Horio F, Uchida K, Osawa T. 2000. *Antiplatelet and anticancer isothiocyanates in Japanese horseradish, wasabi*. BioFactors 13: 271-276

Nakagawa, K; Kawagoe M. 2000. *Differential Effects of Flavonoid Quercetin on Oxidative Damages Induced by Hydrophilic and Lipophilic Radical Generators in Hepatic Lysosomal Fractions of Mice*. Journal of Health Science. 46: 509-512

Nijveldt, R.J., E. van Nood, D.E.C van Hoorn, P.G. Boelens, K. Van Norren & P.A.M. van Leeuwen. 2001. *Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential applications*. Am. J. Clin. Nutr. 74:418-425

Nurulita, A. N. 2011. *Kaempferol dapat Menginduksi Apoptosis melalui Mitochondrial Pathway dan ER Stress Pathway pada Osteosarkoma*, (Online), ([www.ccrcc.farmasi.ugm.ac.id](http://www.ccrcc.farmasi.ugm.ac.id), diakses 10 November 2011)

Ogasawara, M.A.; Zhang, H. 2009. *Redox regulation and its emerging roles in stem cells and stem-like cancer cells*. Antioxid. Redox Signal 5, 1107–1122

Oliveira JTA, Silveira SB, Vasconcelos IM, Cavada BS, Moreira RA. 1999. *Compositional and nutritional attributes of seeds from the multipurpose tree Moringa oleifera Lamarck*. J Sci Food Agric 79: 815–820

Paliwal R, Sharma V, Pracheta, Sharma S, Yadav S, Sharma SH. 2011. *Antinephrotoxic Effect Of Administration Of Moringa Oleifera Lam In Amelioration Of Dmba-Induced Renal Carcinogenesis In Swiss Albino Mice*. Biol Med 3: 25-35

Parvathy, M., Umamaheswari, A., 2007. *Cytotoxic Effect of Moringa oleifera Leaf Extracts on Human Multiple Myeloma Cell Lines*. Ayya Acade Baby Nagar India. Trends in Medical Reseach 2 (1):44-50

Pinnell, S.R. 2003. *Cutaneous Photodamage, Oxidative Stress, and Topical Antioxidant Protection*, J Am Acad Dermatol, 48, 1-19

Pollard JW. 2008. *Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer*. J Leukoc Biol 84:623–30

Pugalendhi, P., S. Manoharan. 2010. *Chemopreventive Potential of Genistein dan Daidzein in Combination during 7, 12 dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) Induced Mammary Carcinogenesis in Sprague-dawley Rats*. Pak. J. Biol. Sci., 13: 279-386

Qian B, Deng Y, Im JH, et al. 2009. *A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth.* PLoS One;4:e6562

Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. *Dose translation from animal to human studies revisited.* FASEB J. 2007;22:659–661

Ruddon RW. 2008 *The Epidemiology of Human Cancer.* In: Cancer biology, 4th ed. New York: Oxford University Press Inc;2007.p.70-116

Rundle A, Tang D, Hibshoosh H, Estabrook A, Schnabel F, Cao W, Grumet S & Perera FP. 2000. *Carcinogenesis* 2. 7: 1281-1289

Rupjyoti B., Jawahira T., Azad MRH. 2003. *Chemomodulatory effect of Moringa oleifera, Lam. on hepatic carcinogen metabolizing enzymes, antioxidant parameters and skin papillomagenesis in mice.* Asian Pacific J. of Cancer Prevention 4: 131-139

Scambia, G., Ranelletti, F. O., Benedetti Panici, P., Piantelli, M., De Vincenzi, R., Ferrandina, O., Bonanno, O., Capelli, A., and Mancuso, S. 1993. *Quercetin induces type-II estrogen-binding sites in estrogen-receptor negative (MDA-MB231) and estrogen receptor-positive (MCF-7) human breast cancer.* Int. J. Cancer, 54: 462-466

Schuler, P. 1990. *Natural Antioxidant Exploited Commercially.* In : Hudson B.J.F. (ed). Food Antioxidants. Elsevier Applied Science. London. Pp.99-170

Sharma, V., Joseph, C., Ghosh, S., et al. 2007. *Kaempferol Induces Apoptosis in Glioblastoma Cells through Oxidative Stress.* Mol Cancer Ther 6:2544-2553

Sica A, Allavena P, Mantovani A. 2008. *Cancer related inflammation: The macrophage connection.* Cancer Lett 267:204–215

Siddhuraju, P., Becker, K. 2003. *Antioxidant Properties of Various Solvent Extracts of Total Phenolic Constituents from Three Different Agroclimatic Origins of Drumstick Tree (M. oleifera Lam.) Leaves.* J. Agric. Food Chem. 51, 2144-2155

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

Solinas, G., Germano, Mantovani, A., Allavena, P. 2009. *Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation*. Journal of Leukocyte Biology:86

Steidl C et al. .2010. *Tumor-Associated Macrophages and Survival in Classic Hodgkin's lymphoma*. N Engl J Med 362:875–885

Touati, D. 1992. *Regulation and Protective Role of the Microbial Superoxide Dismutases*. In: Scandalios (ed), *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.p231-261

Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. 2006. *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. *Chem. Biol. Interact.*, 160, 1–40

Weimer, T. L., Reddy, A. P., Harttig, U., Alexander, D., Stamm, S. C., Miller, M. R., Baird, W., Hendricks, J., and Bailey, G., 2000. *Influence of  $\beta$ -Naphthoflavone on 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene Metabolism, DNA Adduction, and Tumorigenicity in Rainbow Trout*. *Toxicological Sciences*, 57, 217-228

Wijayakusuma, Hembing. 2008. *Atasi Kanker dengan Tanaman Obat*. Jakarta: Puspa Swara

WHO. 2008. *Global Burden of Cancer*, (Online), ([www.who.int](http://www.who.int), diakses 5 November 2011)

**PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Firdah Zuniar Fadhilah

NIM : 0910710073

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, 31 Desember 2012

Yang membuat pernyataan

(Firdah Zuniar Fadhilah)

NIM. 0910710073

LAMPIRAN

Lampiran 1: *Test of Normality* (Uni Normalitas Data)

perlakuan	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
hasil 1	.303	4	.	.816	4	.134
2	.276	4	.	.945	4	.682
3	.159	4	.	.997	4	.990
4	.185	4	.	.982	4	.913
5	.237	4	.	.939	4	.650

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 2: *Test of Homogeneity of Variances* (Uni Homogenitas Varian)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.515	4	15	.085

Lampiran 3: Uji ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2166.333	4	541.583	185.590	.000
Within Groups	43.772	15	2.918		
Total	2210.105	19			

Lampiran 4: *Post Hoc Test*

(I) perakuan	(J) perakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-27.55000*	1.20793	.000	-31.2800	-23.8200
	3	-5.57500*	1.20793	.003	-9.3050	-1.8450
	4	-2.02500	1.20793	.476	-5.7550	1.7050
	5	-.40000	1.20793	.997	-4.1300	3.3300
2	1	27.55000*	1.20793	.000	23.8200	31.2800
	3	21.97500*	1.20793	.000	18.2450	25.7050
	4	25.52500*	1.20793	.000	21.7950	29.2550
	5	27.15000*	1.20793	.000	23.4200	30.8800
3	1	5.57500*	1.20793	.003	1.8450	9.3050
	2	-21.97500*	1.20793	.000	-25.7050	-18.2450
	4	3.55000	1.20793	.066	-.1800	7.2800
	5	5.17500*	1.20793	.005	1.4450	8.9050
4	1	2.02500	1.20793	.476	-1.7050	5.7550
	2	-25.52500*	1.20793	.000	-29.2550	-21.7950
	3	-3.55000	1.20793	.066	-7.2800	.1800
	5	1.62500	1.20793	.669	-2.1050	5.3550
5	1	.40000	1.20793	.997	-3.3300	4.1300
	2	-27.15000*	1.20793	.000	-30.8800	-23.4200
	3	-5.17500*	1.20793	.005	-8.9050	-1.4450
	4	-1.62500	1.20793	.669	-5.3550	2.1050

Lampiran 5: *Homogeneous Subsets*

perakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1	4	3.4750		
5	4	3.8750		
4	4	5.5000	5.5000	
3	4		9.0500	
2	4			31.0250
Sig.		.476	.066	1.000

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

