

**PENGARUH EKSTRAK METANOL DAUN KELOR (*Moringa oleifera*)  
TERHADAP EKSPRESI IL-6 JARINGAN HEPAR TIKUS WISTAR (*Rattus  
norvegicus*) MODEL KARSINOMA HEPATOSELULER DENGAN INDUKSI  
DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene)**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan**

**Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum**



**Oleh :**

**ALICIA YOLANDRA**

**0910710031**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**



HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**PENGARUH EKSTRAK METANOL DAUN KELOR (*Moringa oleifera*)  
TERHADAP EKSPRESI IL-6 JARINGAN HEPAR TIKUS WISTAR (*Rattus  
norvegicus*) MODEL KARSINOMA HEPATOSELULER DENGAN INDUKSI  
DMBA (*7,12-dimethylbenz(a)anthracene*)**

Oleh :  
Alicia Yolandra  
NIM: 0910710031

Telah diuji pada  
hari : Jumat  
tanggal : 22 Februari 2013  
dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I

Dr.dr.Wisnu Barlianto, Msi. Med, SpA(K)  
NIP. 19730726 200501 1 008

Penguji II

Penguji III

Prof. Dr. dr. M. Rasiad Indra, MS  
NIP. 19500525 198002 1 001

Dr.dr. Endang Sriwahjuni, MS  
NIP. 19521008 198003 2 002

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Kedokteran

Prof.Dr.dr. Teguh W.Sardjono DTM&H, MSc, Sp.Par K  
NIP. 19520410 198002 1 001



## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur yang tak terhingga penulis nyatakan kepada Tuhan Yesus Kristus atas segala kasih karunia dan kekuatan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal tugas akhir yang berjudul “Pengaruh ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap ekspresi IL-6 jaringan hepar tikus wistar (*Rattus norvegicus*) model karsinoma hepatoseluler dengan induksi DMBA (7,12-*dymethylbenz (a) anthracene*)” untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar sarjana kedokteran.

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

1. Dr. Karyono Mintaroem, SpPA, M.Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS, selaku dosen pembimbing pertama, atas kesabaran, dukungan, serta masukan-masukan yang sangat membangun sehingga tugas akhir ini dapat terselesaikan dengan baik.
3. Dr. dr. Endang Sriwahjuni, MS selaku dosen pembimbing kedua atas segala saran dan fleksibilitas acara sehingga mudah ditemui.
4. Dr.dr.Wisnu Barlianto, Msi.Med, SpA(K) selaku dosen penguji atas saran yang telah diberikan dan ketelitian, sehingga dapat menyempurnakan tugas akhir ini.

5. Segenap Anggota Tim Pengelola Tugas Akhir Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
6. Segenap Staf Laboratorium Fisiologi Kedokteran dan Laboratorium Patologi-Anatomi untuk segala bantuan yang sangat berharga dalam proses pembuatan tugas akhir ini.
7. Terima Kasih untuk Papa, Mama, Rocky, dan Aprilia buat perhatian, kasih sayang, serta doa yang tiada henti-hentinya sehingga penulis dapat sampai pada tahap ini. Hanya Tuhan yang dapat membalas segala apa yang sudah kalian berikan.
8. Kelor's Family, Teman-Teman PMK, serta Adik-adik KTB YOSEL yang selalu menemani, mendukung, dan menegur.
9. Rekan-rekan pelayan di GMS Malang, terlebih ce Meyen dan ce DJ, yang selalu menemani, mendukung, dan menegur untuk lebih sungguh dalam melayani Tuhan, termasuk dalam hal studi.
10. Kepada semua pihak yang telah membantu penyelesaian tugas akhir ini baik secara langsung maupun tidak langsung.

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

Malang, 17 Februari 2013

Penulis

## ABSTRAK

Yolandra, Alicia. 2013. *Pengaruh Ekstrak Metanol Daun Kelor (Moringa oleifera) Terhadap Ekspresi IL-6 Jaringan Hepar Tikus Wistar (Rattus norvegicus) Model Karsinoma Hepatoseluler dengan Induksi DMBA (7,12-dymethylbenz (a) anthracene)*. Tugas Akhir, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS (2) Dr.dr.Endang Sriwahjuni, MS.

Interleukin-6 (IL-6), adalah sitokin multifungsi yang penting dalam respon imun, pertahanan sel, apoptosis, dan proliferasi. Ekspresi Interleukin-6 meningkat pada penderita karsinoma hepatoseluler, dan telah diketahui peran Interleukin-6 dalam patogenesisnya. Daun kelor (*Moringa Oleifera*) mengandung berbagai senyawa antioksidan, dalam golongan polifenol, yang termasuk didalamnya adalah *Quercetin* dan *Kaempferol*. Kedua zat ini dapat menurunkan ekspresi Interleukin-6 melalui pengikatan *Reactive Oxygen Species* (ROS), sehingga aktivasi NF- $\kappa$ B pun terhambat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap ekspresi IL-6 jaringan hepar tikus wistar (*Rattus norvegicus*) model karsinoma hepatoseluler dengan induksi DMBA (7,12-dymethylbenz (a) anthracene). Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental, yaitu rancangan eksperimen sederhana (*post test control group design*) dimana subyek dibagi menjadi 5 kelompok secara random. Tiap kelompok terdiri dari 6 tikus. Kelompok I diberi diet normal tanpa DMBA, kelompok II diberi diet normal dan DMBA, sedangkan kelompok III sampai dengan V (3 kelompok) diberi diet normal dan DMBA selama 45 hari kemudian ditambahkan ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan dosis berturut-turut 20, 40, 80 mg per oral selama 60 hari. Pada akhir perlakuan tikus diterminasi dengan cara pembiusan eter. Kemudian abdomen dibuka, sebagian jaringan hepar diambil untuk dilakukan pemeriksaan ekspresi IL-6 dengan metode imunohistokimia (IHK). Analisis data menggunakan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis* dilanjutkan uji post-hoc *Mann-Whitney*, menunjukkan hasil yang signifikan ( $p < 0,05$ ). Kesimpulan penelitian ini adalah ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan ekspresi IL-6 jaringan hepar tikus wistar (*Rattus norvegicus*) model karsinoma hepatoseluler dengan dosis efektif 80 mg/kgBB/hr/hari.

Kata kunci: ekstrak metanol daun kelor, IL-6, 7,12- dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)

## ABSTRACT

Yolandra, Alicia. 2013. *Effect of Methanol Extract of Moringa oleifera Leaves on IL-6 Expression in Liver Tissue of Hepatocellular Carcinoma Modeled Wistar (Rattus norvegicus) Rats Induced by DMBA (7,12-dymethylbenz (a) anthracene)*. Final Assignment, Medical Faculty of Brawijaya University. Supervisors: (1) Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS (2) Dr.dr.Endang Sriwahjuni, MS.

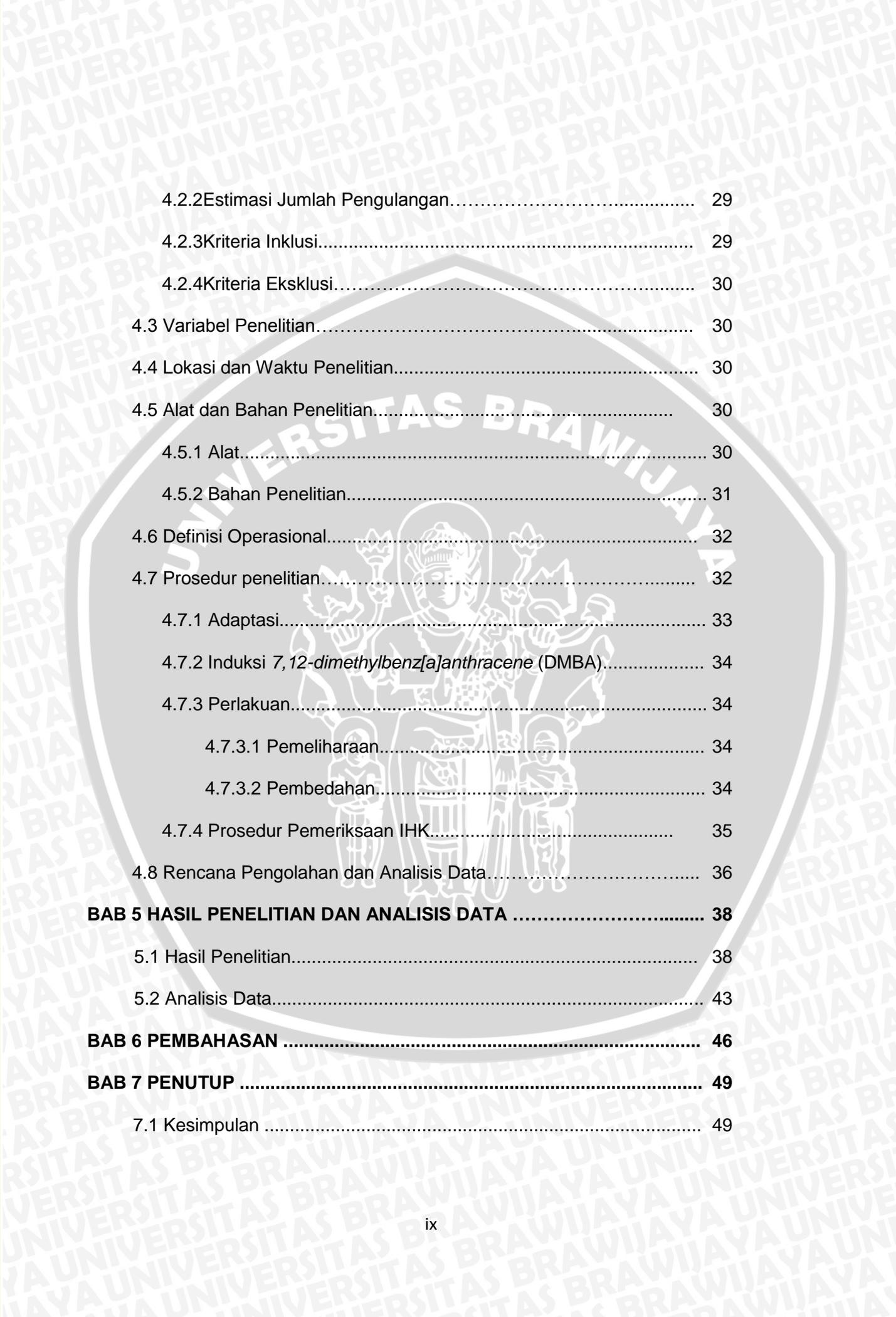
Interleukin-6 (IL-6), is a multifunctional cytokine which has important role in immune response, cell survival, and proliferation. Interleukin-6 expression increase in hepatocellular carcinoma patient, and its role in the pathogenesis has been known. Methanol extract of moringa leaves (*Moringa Oleifera*) contains polyphenol group as antioxidant, such as *Quercetin* and *Kaempferol*. Both compounds decrease the expression of interleukin-6 through *Reactive Oxygen Species* (ROS) binding, so the activation of NF- $\kappa$ B will be inhibited. This study aims to elucidate the effect of methanol extract of moringa oleifera leaves on IL-6 expression in liver tissue of hepatocellular carcinoma modeled wistar (*Rattus norvegicus*) rats induced by DMBA (7,12-dymethylbenz (a) anthracene). This research was using experimental design, i.e. post test control group design where the subjects were divided into 5 groups randomly. Each group consists of 6 rats. Group I given normal diet with no DMBA, group II given normal diet with DMBA, while group III up to V (3 groups) given normal diet and DMBA for 45 days and 20, 40, 80 mg methanol extract of Moringa leaves (*Moringa oleifera*) in a row, given orally for the next 60 days. In the end of the research, the rats were terminated using ether anesthetic. The abdomen was then opened, and some of the liver tissue was taken for IL-6 expression examination using Immunohistochemical method. Data analysis using non-parametric test *Kruskal-Wallis*, followed by post-hoc test *Mann-Whitney*, show significant result ( $p < 0,05$ ). The conclusion was methanol extract of moringa oleifera leaves reduce IL-6 expression in liver tissue of hepatocellular carcinoma modeled wistar (*Rattus norvegicus*) rats with effective dose 80 mg/kgBB/hr/day.

Key Words: Methanol extract of *Moringa oleifera*, IL-6, 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)

DAFTAR ISI

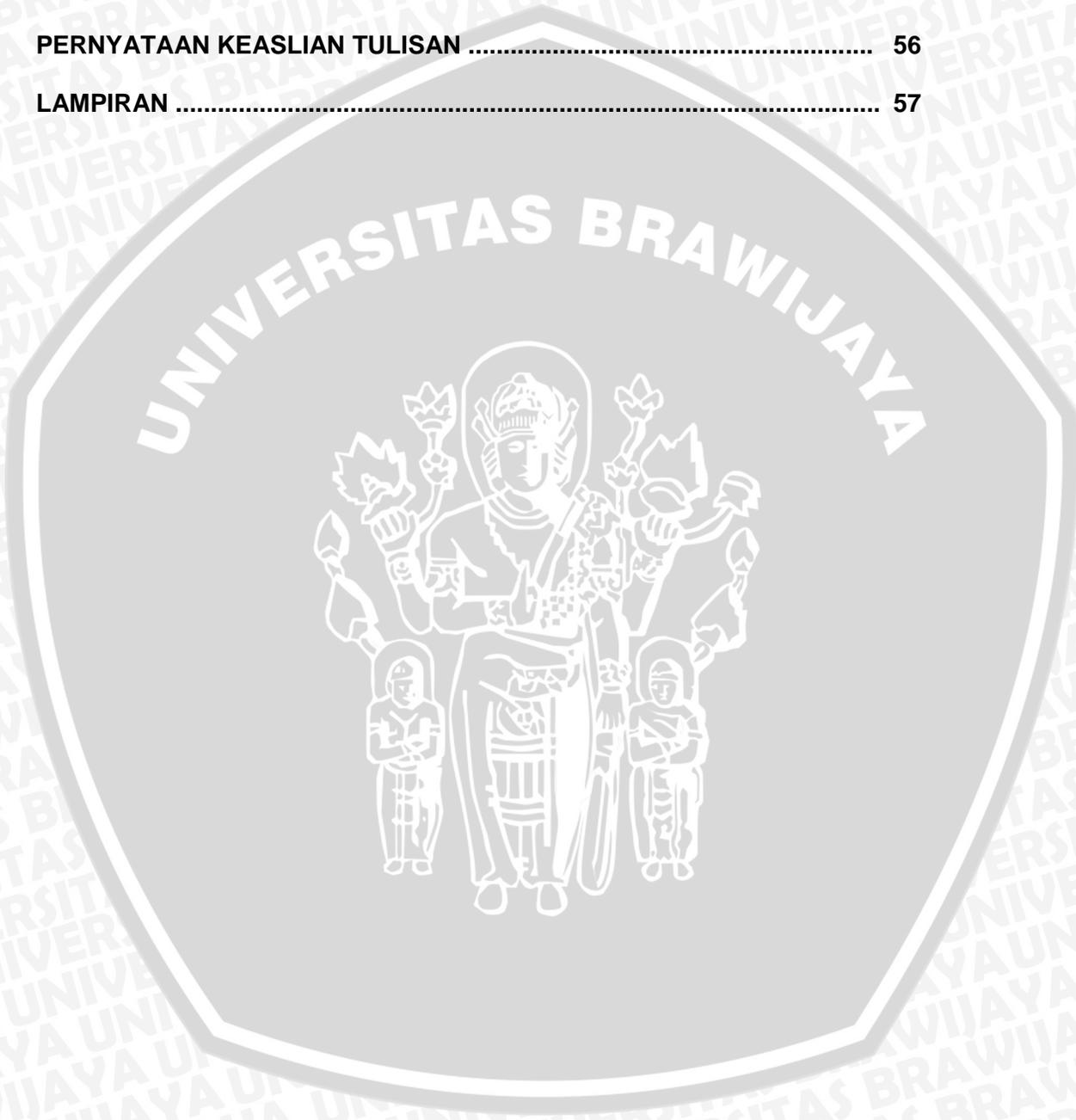
	Halaman
Judul .....	i
Halaman Pengesahan .....	ii
Kata Pengantar .....	iii
Abstrak.....	v
Daftar Isi .....	vii
Daftar Tabel .....	xi
Daftar Gambar .....	xii
Daftar Lampiran.....	xiv
Daftar Singkatan .....	xv
<b>BAB 1 PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>6</b>
2.1 Tumor/ Kanker .....	6
2.1.1 Inflamasi.....	6
2.1.2 Interleukin 6 (IL-6).....	8
2.2 DMBA.....	9
2.3 Kanker Hepar/ Karsinoma Hepatoseluler.....	10
2.3.1 Definisi Kanker Hepar/ Karsinoma Hepatoseluler .....	10

2.3.2 Etiologi Kanker Hepar/ Karsinoma Hepatoseluler.....	10
2.3.3 Patogenesis Kanker Hepar/ Karsinoma Hepatoseluler .....	12
2.3.4 Stadium Kanker Hepar/ Karsinoma Hepatoseluler.....	14
2.3.5 Gejala Kanker Hepar/ Karsinoma Hepatoseluler.....	15
2.3.6 Terapi dan Pencegahan Kanker Hepar/ Karsinoma Hepatoseluler.....	15
2.4 Kelor ( <i>Moringa oleifera</i> ).....	16
2.4.1 Taksonomi.....	16
2.4.2 Penyebaran.....	17
2.4.3 Morfologi.....	17
2.4.4 Kandungan Zat dalam Daun.....	18
2.4.5 Efek Antioksidan.....	20
2.4.5.1 Karotenoid.....	21
2.4.5.2 Senyawa Polifenol.....	22
2.5 Konversi Obat.....	24
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....</b>	<b>25</b>
3.1 Kerangka Konsep.....	25
3.2 Penjelasan Kerangka Konsep.....	26
3.3 Hipotesis Penelitian.....	27
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN.....</b>	<b>28</b>
4.1 Rancangan Penelitian.....	28
4.2 Binatang Coba.....	28
4.2.1 Binatang coba, Objek dan Teknik Randomisasi.....	28



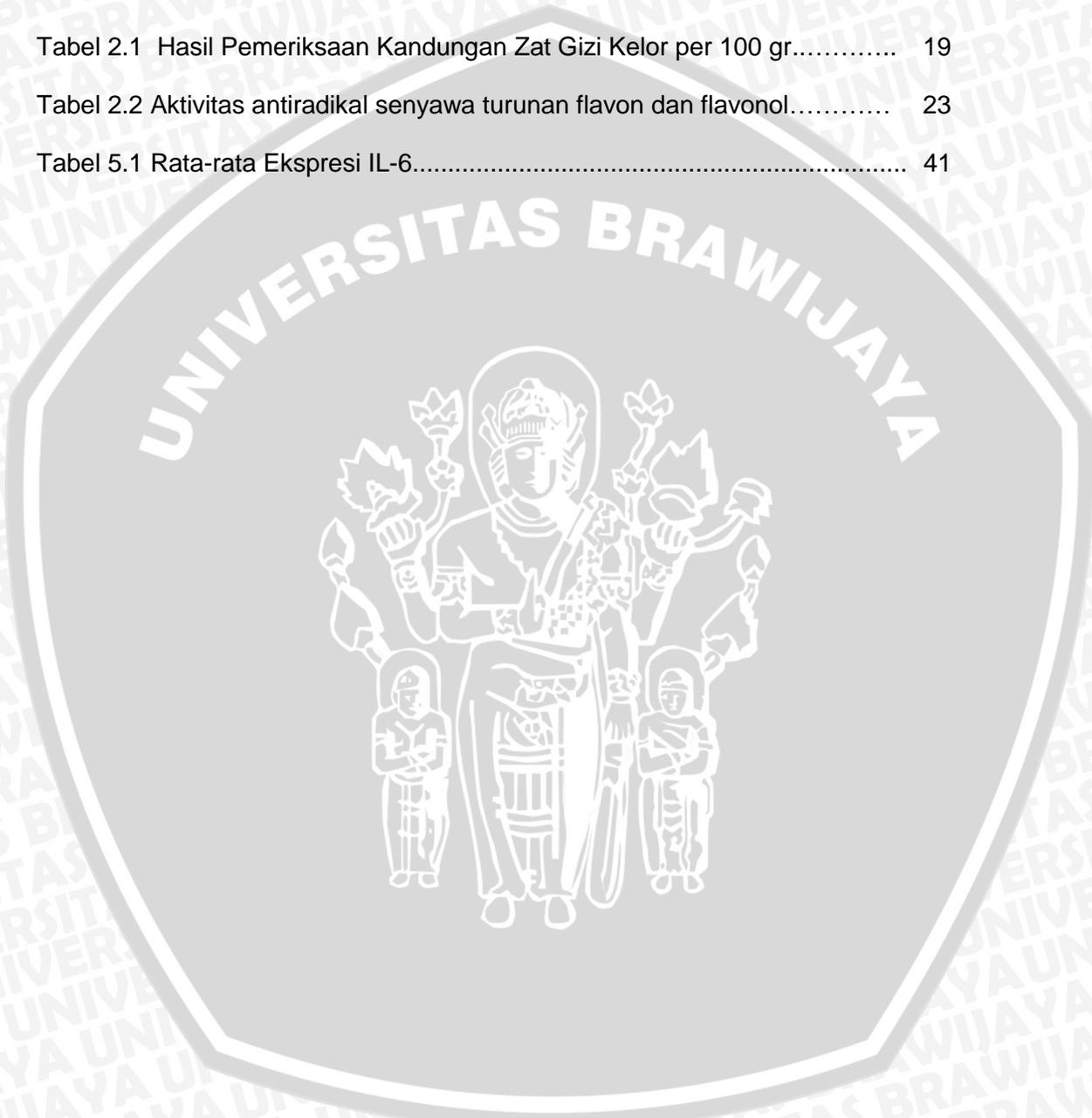
4.2.2	Estimasi Jumlah Pengulangan.....	29
4.2.3	Kriteria Inklusi.....	29
4.2.4	Kriteria Eksklusi.....	30
4.3	Variabel Penelitian.....	30
4.4	Lokasi dan Waktu Penelitian.....	30
4.5	Alat dan Bahan Penelitian.....	30
4.5.1	Alat.....	30
4.5.2	Bahan Penelitian.....	31
4.6	Definisi Operasional.....	32
4.7	Prosedur penelitian.....	32
4.7.1	Adaptasi.....	33
4.7.2	Induksi 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA).....	34
4.7.3	Perlakuan.....	34
4.7.3.1	Pemeliharaan.....	34
4.7.3.2	Pembedahan.....	34
4.7.4	Prosedur Pemeriksaan IHK.....	35
4.8	Rencana Pengolahan dan Analisis Data.....	36
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA .....</b>		<b>38</b>
5.1	Hasil Penelitian.....	38
5.2	Analisis Data.....	43
<b>BAB 6 PEMBAHASAN .....</b>		<b>46</b>
<b>BAB 7 PENUTUP .....</b>		<b>49</b>
7.1	Kesimpulan .....	49

7.2 Saran .....	49
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>50</b>
<b>PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN .....</b>	<b>56</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>57</b>



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Hasil Pemeriksaan Kandungan Zat Gizi Kelor per 100 gr.....	19
Tabel 2.2 Aktivitas antiradikal senyawa turunan flavon dan flavonol.....	23
Tabel 5.1 Rata-rata Ekspresi IL-6.....	41

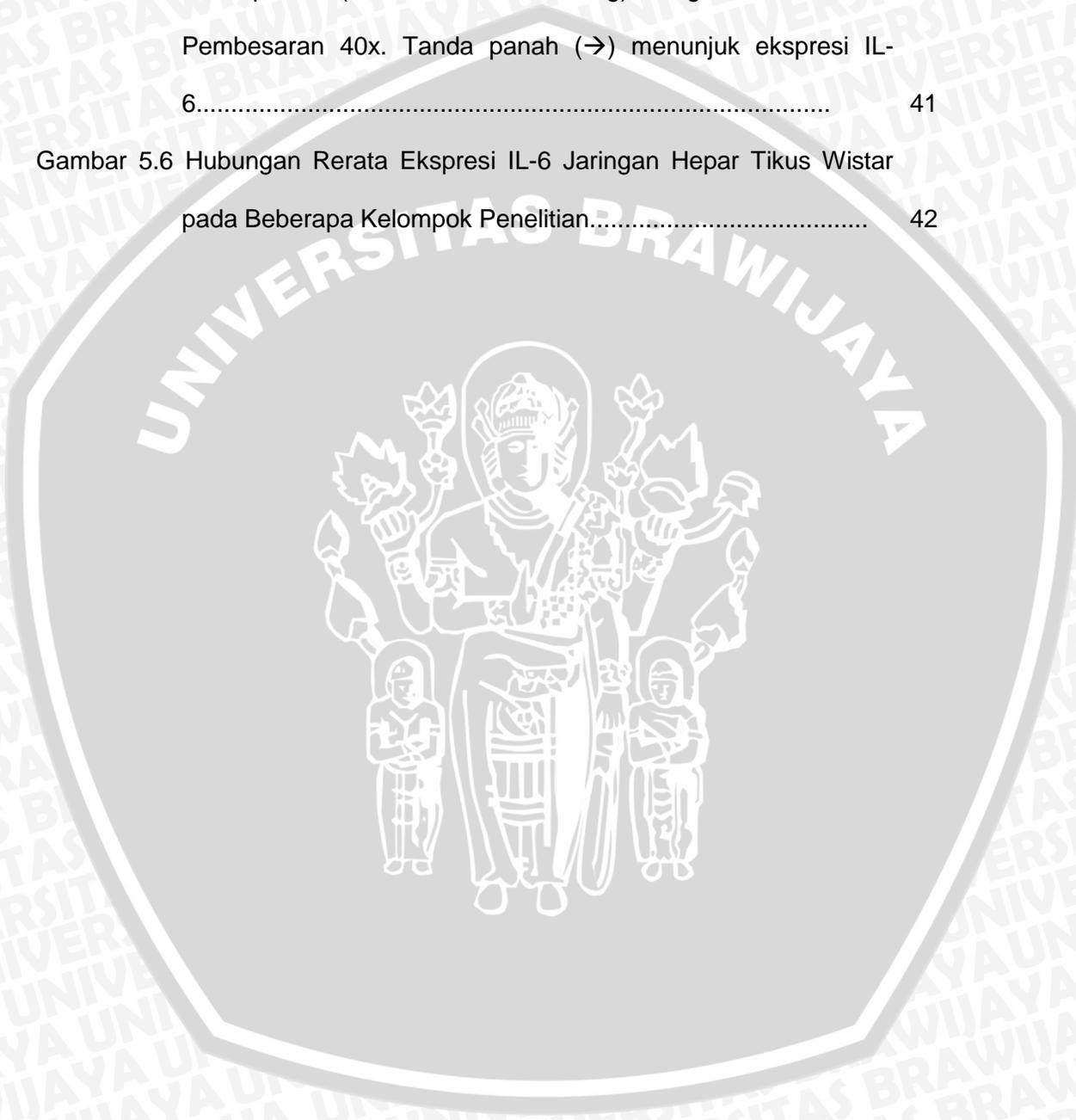


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Inflamasi dan peranannya dalam tumorigenesis.....	7
Gambar 2.2 Peran IL-6 dalam pertumbuhan dan ketahanan sel kanker.....	9
Gambar 2.3 Urutan kronologis lesi selular yang mencapai puncak dalam perkembangan Karsinoma hepatoseluler pada manusia.....	13
Gambar 2.4 <i>Moringa oleifera</i> .....	18
Gambar 2.5 Rumus Translasi Dosis berdasarkan BSA.....	18
Gambar 4.1 Alur penelitian.....	33
Gambar 5.1 Gambaran Histologi Ekspresi IL-6 Jaringan Hepar Tikus Wistar Kelompok 1 (Kontrol negatif) dengan Metode IHK, Pembesaran 40x. Tanda panah (→) menunjuk ekspresi IL-6.....	39
Gambar 5.2 Gambaran Histologi Ekspresi IL-6 Jaringan Hepar Tikus Wistar Kelompok 2 (Kontrol positif) dengan Metode IHK, Pembesaran 40x. Tanda panah (→) menunjuk ekspresi IL-6.....	39
Gambar 5.3 Gambaran Histologi Ekspresi IL-6 Jaringan Hepar Tikus Wistar Kelompok 3 (DMBA + Kelor 20 mg) dengan Metode IHK, Pembesaran 40x. Tanda panah (→) menunjuk ekspresi IL-6.....	40
Gambar 5.4 Gambaran Histologi Ekspresi IL-6 Jaringan Hepar Tikus Wistar Kelompok 4 (DMBA + Kelor 40 mg) dengan Metode IHK, Pembesaran 40x. Tanda panah (→) menunjuk ekspresi IL-6.....	40

Gambar 5.5 Gambaran Histologi Ekspresi IL-6 Jaringan Hepar Tikus Wistar  
Kelompok 5 (DMBA + Kelor 80 mg) dengan Metode IHK,  
Pembesaran 40x. Tanda panah (→) menunjuk ekspresi IL-  
6..... 41

Gambar 5.6 Hubungan Rerata Ekspresi IL-6 Jaringan Hepar Tikus Wistar  
pada Beberapa Kelompok Penelitian..... 42

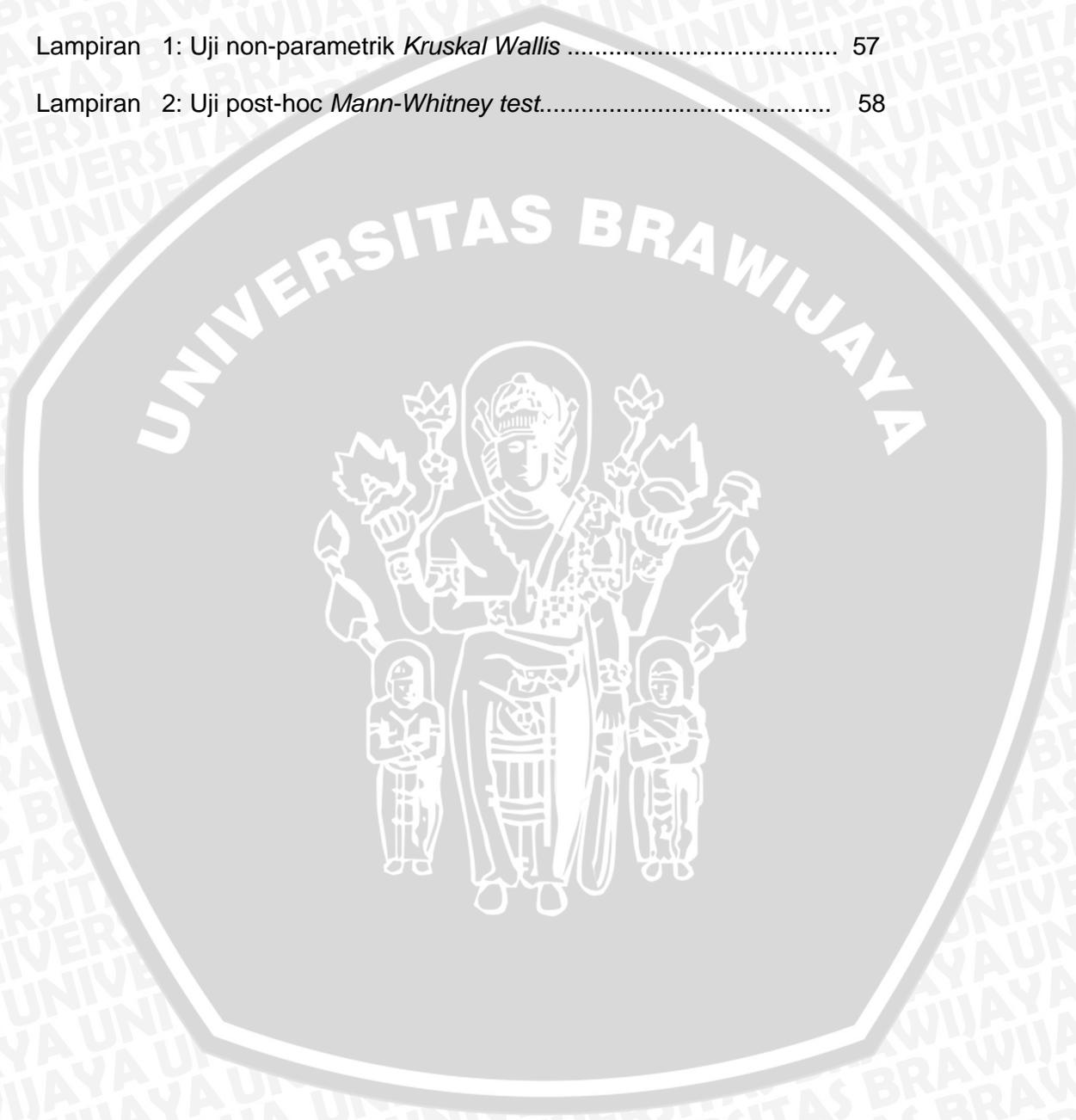


DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1: Uji non-parametrik *Kruskal Wallis* ..... 57

Lampiran 2: Uji post-hoc *Mann-Whitney test*..... 58



## DAFTAR SINGKATAN

ANOVA	: Analysis of Variance
COX-2	: Cyclooxygenase-2
DMBA	: 7,12-dimethylbenz[a]anthracene
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
HED	: Human Equivalent Dose
IHK	: Immuno-Histochemistry Kit
IL-6	: Interleukin-6
NF-κB	: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell
NO	: Nitric Oxide
NOS	: Nitric Oxide Synthase
PAH	: Polycyclic Aromatic Hydrocarbon
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PGE <sub>2</sub>	: Prostaglandin E <sub>2</sub>
ROS	: Reactive Oxygen Species
STAT-3	: Signal Transducers and Activators of Transcription - 3

TGF : Tumor Growth Factor

TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor

TNM : Tumor-Node-Metastase



## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang Masalah

Hepar adalah organ dalam terbesar. Kita tidak dapat hidup tanpa hepar, karena hepar memiliki banyak fungsi penting. Hepar terdiri dari beberapa tipe sel berbeda. Inilah alasan mengapa beberapa tipe tumor ganas (kanker) maupun jinak dapat muncul dari hepar. Setiap jenis tumor ini memiliki penyebab, pengobatan, dan prognosis yang berbeda. (ACS, 2011). Karsinoma hepatoseluler adalah bentuk kanker hepar yang paling umum ditemukan pada orang dewasa pria (Naugler *et al*, 2007). Kadang disebut juga hepatoma karena berasal dari hepatosit (tipe utama sel hepar). (ACS, 2011).

WHO tahun 2000 melaporkan IR (*Incidence Rate*) kanker hepar di dunia yaitu 9 per 100.000 penduduk dengan CFR (*Cause Fatality Rate*) 96,85%. Di Indonesia, pada tahun 2002 IR kanker hepar di Indonesia pada pria 20 per 100.000 penduduk dengan *Sex Spesific Death Rate* (SSDR) 17 per 100.000 penduduk sedangkan pada wanita IR 6 per 100.000 penduduk dengan SSDR 5 per 100.000 penduduk. Berdasarkan sepuluh peringkat utama penyakit kanker di beberapa rumah sakit di Indonesia tahun 2005, pada pasien rawat inap kanker hepar berada di urutan ketiga dengan jumlah penderita kanker hepar 4.177 orang (12,22%) sedangkan pada pasien rawat jalan kanker hepar berada di urutan kelima dengan jumlah penderita 1364 orang (4,55%). (USU, 2010).

Salah satu senyawa yang dapat memicu terjadinya kanker pada manusia adalah senyawa 7,12-dimetilbenz ( $\alpha$ ) antrasen (DMBA). Senyawa 7,12 DMBA adalah zat kimia yang termasuk dalam *polycyclic aromatic hydrocarbon* (PAH) yang dikenal bersifat mutagenik, teratogenik, karsinogenik, sitotoksik, dan immunosupresif (Lukitaningsih, 2004). Senyawa ini ditemukan pada pecahan tar dari asap rokok, sebagaimana pada gas pembuangan mobil dan asap dari tungku perapian. (Lee *et al*, 2002).

Perkembangan dan pertumbuhan tumor dikendalikan oleh beberapa sel inflamasi, yang menghasilkan sitokin yang akan merangsang pertumbuhan dan ketahanan sel keganasan. Identifikasi sitokin tersebut serta mekanismenya merupakan hal yang penting karena penghambatan sitokin pendukung tumor mampu digunakan sebagai tindakan terapi maupun pencegahan. (Grivennikov *et al*, 2009). Inflamasi adalah faktor pendukung mayor dalam karsinogenesis. Karsinoma hepatoseluler menunjukkan kasus klasik kanker yang berhubungan dengan inflamasi. Interleukin-6 (IL-6) adalah sitokin multifungsional yang bertanggungjawab atas respon hepar terhadap infeksi atau inflamasi sistemik, sering disebut “respon fase akut”. Pasien dengan karsinoma hepatoseluler mengalami peningkatan ekspresi IL-6 secara relatif dibandingkan subyek normal. Apakah IL-6 merupakan penyebab atau kontributor karsinoma hepatoseluler masih belum diketahui. Namun demikian, IL-6 diperkirakan berkontribusi pada proliferasi hepatosit. (Naugler *et al*, 2007).

Penanganan medis untuk kanker hepar, seperti kemoterapi, cukup efektif, namun demikian masih mengecewakan, Ablasi dan teknik lokal seperti

kemoembolisasi, radioembolisasi, radiofrekuensi atau siroablasi, dan pembedahan radio-stereostatik bisa sangat berguna dalam mengontrol kanker secara individu, namun dalam jangka waktu tertentu. Pembedahan untuk mengambil tumor mungkin dapat bersifat kuratif bagi beberapa individu dengan kanker hepar, khususnya yang memiliki ukuran tumor kecil dan fungsi hepar yang baik. Namun sebenarnya penyakit ini hampir selalu dapat dihindari dengan perubahan gaya hidup. (Stuart, 2011). Selain itu, produk herbal juga sering dikonsumsi secara spesifik dengan harapan mencegah penyakit, termasuk kanker, dan memperkecil efek dari resiko penyakit tertentu. (Wargovich, 2001)

Mahajan *et al* menyebutkan dalam salah satu penelitiannya bahwa kadar TNF  $\alpha$ , IL-4, and IL-6 dapat diturunkan secara signifikan dengan ekstrak biji Moringa oleifera, dalam hubungannya dengan kandungan antioksidan yang berkaitan dengan aktifitas antiinflamasinya di saluran nafas. (Mahajan *et al*, 2007). Khalafalla *et al* bahkan memperjelas bahwa ekstrak etanol pada Moringa oleifera mampu menghambat 77% aktifitas pembentukan radikal bebas dalam tubuh. Kapasitas antioksidan yang tinggi ini dikarenakan tingginya konsentrasi fenol dan flavonoid dalam ekstrak Moringa oleifera. Tingginya kandungan antioksidan ini nantinya akan berperan dalam proses supresi tumor. (Khalafalla *et al*, 2010).

Dari penjelasan di atas, Moringa mungkin memiliki peran penting dalam menurunkan aktivitas IL-6 sebagai upaya terapi komplementer karsinoma hepatoseluler. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang "Pengaruh ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap ekspresi IL-6

jaringan hepar tikus wistar (*Rattus norvegicus*) model karsinoma hepatoseluler dengan induksi DMBA (7,12-dymethylbenz (a) anthracene)".

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan ekspresi IL-6 jaringan hepar tikus wistar (*Rattus norvegicus*) model karsinoma hepatoseluler dengan induksi DMBA (7,12-dymethylbenz (a) anthracene)?
2. Berapa dosis efektif ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dalam menurunkan ekspresi IL-6 jaringan hepar tikus wistar (*Rattus norvegicus*) model karsinoma hepatoseluler dengan induksi DMBA (7,12-dymethylbenz (a) anthracene)?

## 1.3 Tujuan Penelitian

1. Membuktikan pengaruh pemberian ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dalam menurunkan ekspresi IL-6 jaringan hepar tikus wistar (*Rattus norvegicus*) model karsinoma hepatoseluler dengan induksi DMBA (7,12-dymethylbenz (a) anthracene)
2. Mengetahui dosis efektif ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dalam menurunkan ekspresi IL-6 jaringan hepar tikus wistar (*Rattus norvegicus*) model karsinoma hepatoseluler dengan induksi DMBA (7,12-dymethylbenz (a) anthracene)

#### 1.4 Manfaat Penelitian

##### 1. Bidang ilmiah :

- Menambah wawasan tentang kelor (*Moringa oleifera*), khususnya ekstrak metanol daun kelor.
- Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dalam menurunkan ekspresi IL-6 jaringan hepar tikus wistar (*Rattus norvegicus*) model karsinoma hepatoseluler dengan induksi DMBA (7,12-dymethylbenz (a) anthracene)

##### 2. Bidang umum :

- Menambah pengetahuan masyarakat tentang manfaat daun kelor (*Moringa oleifera*) sebagai upaya preventif terhadap penyakit kanker, terutama kanker hepar/ karsinoma hepatoseluler.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tumor/ Kanker

Tumor adalah struktur seperti organ yang terdiri dari sel kanker, fibroblast, myofibroblas, sel mast, sel endotel, sel inflamasi, *resident macrophage*, yang di sekitarnya terdapat matriks ekstraselular. (Kaler *et al.*,2009). Tumor dapat terbentuk melalui beberapa jalur karsinogenesis antara lain: inflamasi, peningkatan proliferasi, dan penghambatan apoptosis. (Ulrich *et al*, 2006).

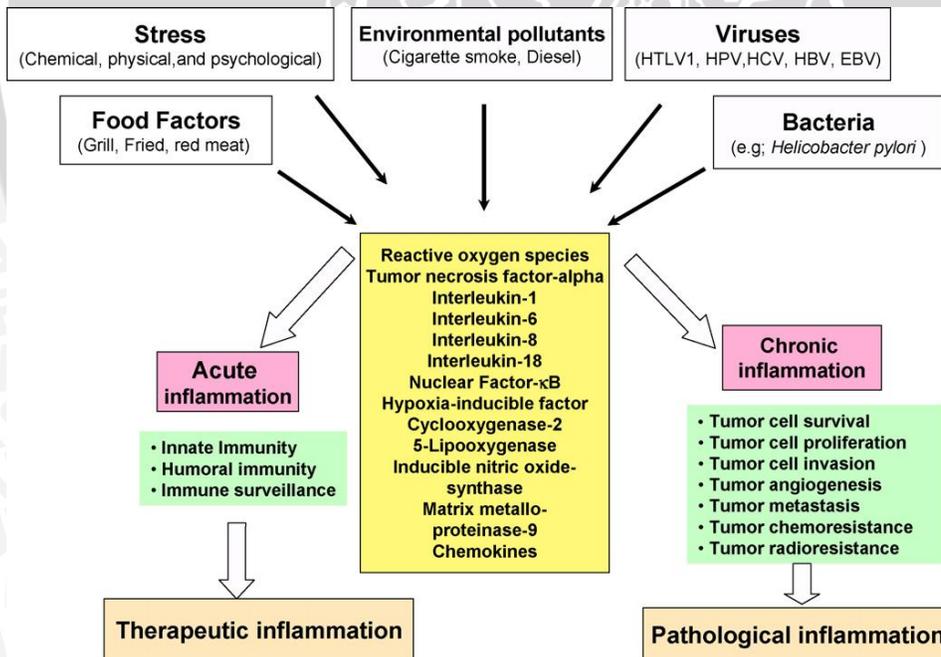
Makrofag adalah sel imun yang paling banyak pada lingkungan mikro tumor dan merupakan regulator utama dari hubungan antara kanker dan inflamasi. *Tumor associated macrophages* (TAMs) yang diturunkan dari monosit dalam sirkulasi dapat membuka peluang terbentuknya lingkungan mikro tumor. Lingkungan mikro tumor ini kemudian kembali menginduksi makrofag untuk mengorganisir suatu kondisi guna mendukung progresi tumor, metastasis dan angiogenesis. (Kaler *et al.*,2009).

##### 2.1.1. Inflamasi

Inflamasi adalah bagian dari respon tubuh terhadap rangsangan lingkungan internal maupun eksternal. Respon ini ada untuk menetralkan kerugian yang mungkin timbul akibat adanya rangsang tersebut di dalam tubuh. Respon ini dapat bersifat pirogenik, dengan ditandai munculnya demam. Saat terjadi inflamasi akut atau demam dalam jangka waktu pendek, hal ini memiliki konsekuensi terapeutik. Namun bila inflamasi berlangsung secara kronis atau terlalu lama, maka hasilnya

dapat berbahaya dan dapat menimbulkan berbagai penyakit, termasuk kanker (tumor ganas) (Aggarwal *et al*, 2006).

Inflamasi kronis mendukung terjadinya mutagenesis onkogenik melalui produksi radikal bebas *reactive oxygen species* (ROS). Bukti eksperimental menunjukkan bahwa produk ini berperan sebagai promotor tumor. Sel imun, yang sering menginfiltrasi tumor dan lesi preneoplastik, memproduksi berbagai sitokin dan kemokin yang mengeluarkan respon inflamasi lokal dan mempertinggi tingkat pertumbuhan dan pertahanan sel premaligna dengan mengaktivasi faktor transkripsi seperti NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Salah satu TGF (*Tumor Growth Factor*) yang bergantung pada adanya NF- $\kappa$ B dan dihasilkan oleh sel myeloid adalah IL-6 (Interleukin 6). (Grivennikov *et al*, 2009).



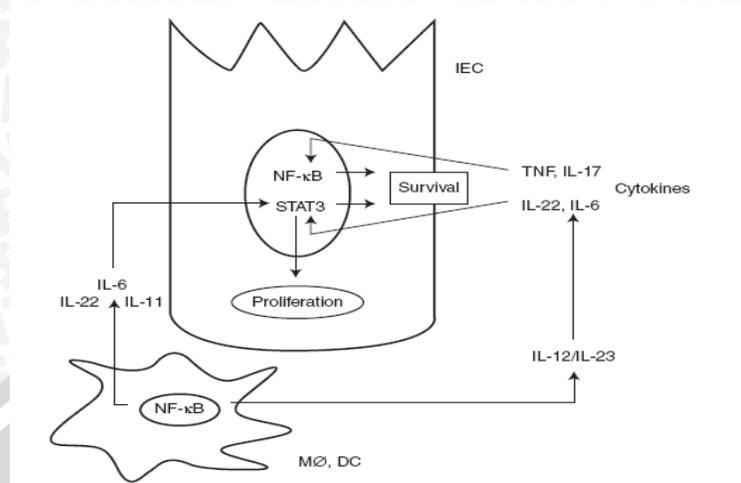
**Gambar 2.1** Inflamasi dan peranannya dalam tumorigenesis (Aggarwal *et al*, 2006).

### 2.1.2 Interleukin 6 (IL-6)

IL-6 adalah salah satu sitokin multifungsi yang penting dalam respon imun, pertahanan sel, apoptosis, dan proliferasi. (Grivennikov *et al*, 2009). IL-6 dapat ditemukan di sel endothel sinusoid dan sel Kupffer pada penyakit hepar akut maupun kronis. Sebagai respon terhadap luka pada jaringan, infeksi, dan stimulus proinflamasi, IL-6 dihasilkan oleh berbagai populasi sel yang berbeda, seperti monosit, sel T, sel B, sel endotel, sel otot polos dan fibroblast. Munculnya IL-6 penting untuk induksi respon fase akut dari hepar (Knolle *et al*, 1996).

Aktivasi makrofag, serta ROS dan NOS dalam peranannya untuk menimbulkan inflamasi akan mengaktifkan proses cyclooxygenase 2 (COX-2) yang memproduksi prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) yang akan diregulasi untuk mensintesis sitokin proinflamasi, seperti TNF- $\alpha$ , dan mediator inflamasi, seperti NO (Shin *et al*, 2011). *Upregulation* dari TNF- $\alpha$  akan memicu faktor NF- $\kappa$ B, dimana transkripsi faktor bertugas meregulasi TNF, chemokine, COX-2, 5-LOX, MMP-9, dan interleukin, termasuk IL-6 (Aggarwal *et al*, 2006).

IL-6 menimbulkan inflamasi kronis dengan mengatur diferensiasi dan pertahanan sel *T-helper pathogenic*. Hal ini memastikan adanya penambahan produksi sitokin lain dan TGF (*Tumor Growth Factor*) secara terus-menerus, yang mana diperlukan untuk pertahanan dan pertumbuhan maupun proliferasi sel kanker (efek *prosurvival* dan *protumorigenic*) (Grivennikov *et al*, 2009). Peningkatan IL-6 ini juga dimediasi oleh STAT 3 dalam memicu perkembangan HCC. (He dan Karin, 2010)



**Gambar 2.2 Peran IL-6 dalam pertumbuhan dan ketahanan sel kanker** (Karin, 2009)

## 2.2 DMBA

Senyawa 7,12-dimetilbenz (α) antrasen (DMBA) yang mempunyai 4 cincin benzene termasuk dalam tujuh *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* (PAH) yang dapat menyebabkan kanker pada manusia. (Lukitaningsih dan Noegrohepar, 2004). Mekanisme aktivasi DMBA melibatkan enzim sitokrom P-450 dan atau peroksidase menjadi intermediate reaktif yang dapat merusak DNA. DMBA akan diubah oleh enzim fase I, sitokrom P450 (CYP), menjadi *Ultimate* carcinogen berupa senyawa epoksida elektrofil yang merupakan metabolit aktifnya. Metabolit epoksida dapat menyebabkan mutasi dalam gen serta mampu mengendalikan siklus sel, sehingga mengakibatkan terbentuknya kanker (Hamid *et al*, 2009).

DMBA sebagai karsinogen yang spesifik organ, memediasi karsinogenesis dengan menginduksi kerusakan DNA, dan membentuk ROS berlebihan, serta memediasi proses inflamasi kronis (Manoharan *et al*, 2008). Dan dalam penelitian ini, kami menggunakan DMBA untuk menginduksi kanker hepar, sebab berdasarkan

penelitian Fauzi et al penggunaan zat ini terbukti secara kuantitatif mampu meningkatkan proliferasi sel berlebih, yang menuju ke arah karsinogenesis (Fauzi et al, 2011).

### **2.3 Kanker Hepar/ Karsinoma Hepatoseluler**

Kanker adalah istilah umum untuk suatu kelompok besar penyakit yang dapat menyerang bagian tubuh mana pun. Istilah lain adalah tumor ganas dan neoplasma. Satu karakteristik kanker adalah pembentukan yang cepat dari sel abnormal yang tumbuh di luar batas lazimnya dan kemudian dapat menginvasi bagian tubuh lain dan menyebar ke organ lain. (WHO 2011). Kemanapun kanker menyebar, penamaannya selalu disesuaikan dengan tempat pertama kanker itu muncul. (ACS, 2011).

#### **2.3.1 Definisi Kanker Hepar/ Karsinoma Hepatoseluler**

Kanker hepar adalah kanker yang bermula di hepar. Beberapa tipe kanker hepar antara lain: Karsinoma Hepatoseluler, *Intrahepatic cholangiocarcinoma*, *Angiosarcoma* atau *hemangiosarcoma*, Hepatoblastoma. Karsinoma Hepatoseluler adalah bentuk kanker hepar tersering pada orang dewasa. Kadang disebut juga hepatoma karena berasal dari hepatosit (tipe sel utama dari hepar). 3 dari 4 kanker yang bermula di hepar adalah jenis ini. (ACS, 2011).

#### **2.3.2 Etiologi Kanker Hepar/ Karsinoma Hepatoseluler**

Faktor risiko adalah apapun yang memengaruhi peluang seseorang terkena suatu penyakit. Setiap kanker memiliki faktor risiko berbeda. Beberapa faktor risiko seperti merokok dapat dikontrol. Selain itu, faktor risiko usia atau riwayat keluarga tidak dapat diubah. Namun memiliki satu faktor risiko, atau bahkan beberapa, tidak

berarti bahwa orang tersebut akan mendapat kanker. Dan banyak orang yang memiliki penyakit, tapi tidak memiliki faktor risiko yang diketahui. (ACS, 2011).

Faktor risiko yang tidak dapat diubah antara lain antara lain *gender*, dimana laki-laki lebih mudah terserang kanker hepar daripada perempuan. Hal ini mungkin dikarenakan beberapa kebiasaan. Faktor resiko lain termasuk ras atau etnik, dimana ras Asia Amerika dan penduduk Pulau Pasifik memiliki tingkat penderita kanker tertinggi. (ACS, 2011).

Selain itu, terdapat juga faktor resiko yang dapat dikendalikan. Di seluruh dunia, faktor risiko tersering, yang sebenarnya dapat dikendalikan, untuk kanker hepar adalah infeksi kronis (jangka panjang) dari virus hepatitis B ataupun C. Infeksi ini mengarah pada terjadinya sirosis. Virus ini menyebar melalui pemakaian jarum yang terinfeksi bersama-sama (seperti dalam pengguna obat terlarang), hubungan seksual tanpa pelindung, melalui jalan lahir, ataupun melalui transfusi darah. Namun demikian, orang yang terinfeksi virus hepatitis A dan E tidak memiliki kecenderungan untuk terserang kanker hepar. Selain itu, penggunaan alcohol yang mengarah pada terjadinya sirosis yang kemudian, juga berhubungan dengan peningkatan risiko kanker hepar. Mengenai penyakit metabolic yang diturunkan, orang dengan hemokromatosis memiliki resiko kanker hepar. Penderita penyakit ini menyerap besi terlalu banyak dari makanannya. Besi tersebut menempati jaringan di seluruh tubuh, termasuk di hepar. Bila ada cukup besi tertimbun di hepar, akan timbul sirosis dan kanker hepar. Kanker hepar juga lebih sering muncul pada penderita diabetes yang juga mengonsumsi banyak alcohol dan/atau menderita hepatitis. Kenaikan berat badan berlebih juga dapat meningkatkan risiko kanker hepar. Bila dilihat dari

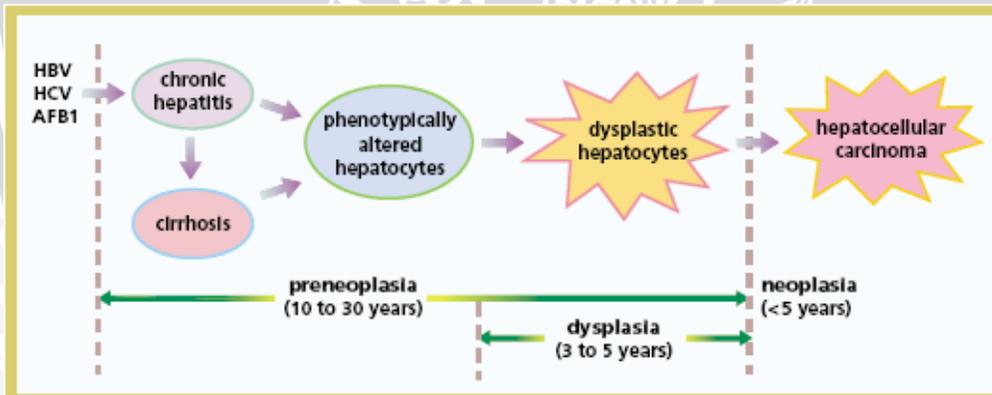
makanan, aflatoxin merupakan substansi penyebab kanker yang terbuat dari jamur yang dapat masuk ke dalam kacang garing, gandum, kacang kedelai, kacang tanah, jagung, dan beras. Paparan jangka panjang terhadap aflatoxin dapat meningkatkan risiko kanker hepar. Pada beberapa atlet, hormone steroid anabolic (hormon lelaki) yang digunakan oleh untuk meningkatkan stamina, penggunaan jangka panjangnya dapat sedikit meningkatkan risiko kanker hepar. Air yang diambil dari sumur yang mengandung arsenic di dalamnya, juga dapat meningkatkan risiko kanker hepar. (ACS, 2011)

### 2.3.3 Patogenesis Kanker Hepar/ Karsinoma Hepatoseluler

Hepar orang dewasa memperlihatkan kemampuan luar biasa untuk beregenerasi setelah reseksi pada pembedahan atau luka pada hepar yang diakibatkan racun. Perbaikan pada jaringan hepar ini muncul melalui proses proliferasi yang cepat dari hepatosit dewasa. Hepatosit yang menunjukkan fungsi spesifik hepar adalah sel yang diam dan memiliki kemampuan untuk masuk kembali dalam siklus sel. Fakta bahwa regenerasi hepar didukung oleh proliferasi aktif dari hepatosit yang berdiferensiasi, dan bukan perluasan dari sel progenitor, merupakan situasi yang unik di antara jaringan dewasa lain. Proliferasi tersebut mulai berjalan dari fase G1 siklus sel, melalui proses rumit dari jalur sinyal rangsang ekstraseluler dan intraseluler, yang menginduksi modifikasi dasar profil ekspresi gen yang dibutuhkan untuk merubah hepatosit dari keadaan diam menjadi proliferasi. Beberapa bukti juga menyebutkan bahwa pengatur siklus sel seperti cyclin-dependent protein kinases (CDKs) dan rekan fungsionalnya, siklin dan CDK inhibitors (CDKIs), menunjukkan ekspresi tertentu pada jalur aktivasi siklus sel.

(Loyer *et al*, 2011). Karsinoma hepatoseluler muncul karena adanya luka yang berkepanjangan, inflamasi, atau pun proliferasi berlebihan dari hepatosit. (Chen *et al*, 2011).

Sudah cukup banyak diketahui mengenai perkembangan dan penyebab Karsinoma hepatoseluler. Kanker ini hampir selalu berkembang dari hepatitis kronis atau sirosis, yaitu kondisi dimana banyak hepatosit mati, ada invasi sel inflamasi, dan deposisi jaringan ikat. Perubahan ini dapat merubah matriks dan lingkungan mikro dari hepar secara drastis. Perubahan hepatocellular yang mendahului munculnya Karsinoma hepatoseluler melibatkan perubahan focus hepatosit secara fenotipik (*foci of phenotypically altered hepatocyte*), yang kemudian menyebabkan dysplasia hepatosit, membentuk nodul. (Thorgeirsson dan Grisham, 2002).



**Gambar 2.3** Urutan kronologis lesi selular yang mencapai puncak dalam perkembangan Karsinoma hepatoseluler pada manusia (Thorgeirsson dan Grisham, 2002)

### 2.3.4 Stadium Kanker Hepar/ Karsinoma Hepatoseluler

Salah satu alat yang digunakan dokter untuk menentukan stadium kanker adalah sistem TNM. Sistem ini mempertimbangkan 3 faktor: Tumor itu sendiri, limfonodi di sekitarnya, dan apakah tumor tersebut sudah menyebar ke organ tubuh lain. Hasilnya dikombinasikan untuk menentukan stadium kanker setiap orang. Terdapat empat stadium: Stadium I sampai dengan IV (satu sampai empat). Stadium ini memberikan gambaran umum kanker, sehingga dokter bisa bekerja sama dengan baik untuk merencanakan pengobatan terbaik.

Karsinoma hepatoseluler dibedakan dari kanker lain karena penanganannya tidak hanya ditentukan oleh stadium (menggunakan sistem TNM), tapi juga oleh seberapa baik hepar dapat bekerja. Misalnya, penyakit dengan stadium awal tidak selalu bisa diambil dengan pembedahan karena heparnya mengalami kerusakan berat (biasanya karena sirosis) dan tidak akan ada hepar tersisa yang cukup untuk menjaga seseorang tetap sehat. Maka dari itu, terkadang kondisi pasien dideskripsikan menggunakan deskripsi antara lain *localized resectable*, dimana kanker hanya ada satu di hepar, dan bagian lain hepar tetap sehat. Kanker dapat diambil dengan *pembedahan*. Yang kedua disebut *localized unresectable*, dimana kanker ditemukan di satu bagian hepar, tapi tidak dapat diambil dengan pembedahan. Yang ketiga adalah *advance*, dimana kanker menyebar ke seluruh hepar dan/atau bagian tubuh lain, seperti paru dan tulang. Yang terakhir disebut *recurrent*, yaitu dimana kanker berulang atau muncul kembali setelah pengobatan. Bila ada pengulangan, kanker mungkin perlu ditentukan lagi stadiumnya (*re-staging*) menggunakan sistem di atas.

### 2.3.5 Gejala Kanker Hepar/ Karsinoma Hepatoseluler

Meskipun deteksi awal sangat diinginkan, pasien dengan kanker hepar fase awal umumnya tidak menunjukkan gejala. Dan sebagai konsekuensi, Karsinoma hepatoseluler sering terdiagnosa lambat, di saat sudah tidak dapat disembuhkan. Kecurigaan adanya penyakit mungkin timbul pertama kali saat pasien mulai mengalami sirosis hepar sehingga muncul ascites, ensefalopati, atau jaundice. Beberapa pasien diawali dengan munculnya rasa sakit abdominal bagian atas, penurunan berat badan, cepat kenyang, atau masa yang teraba di abdomen bagian atas. Gejala lain meliputi *obstructive jaundice*, diare, sakit tulang, sesak, perdarahan intraperitoneal, sindroma paraneoplastik (seperti hipoglikemi, eritrositosis, hiperkalsemia, diare berat yang encer, dermatomyositis (Lamerz et al, 2010)

### 2.3.6 Terapi dan Pencegahan Kanker Hepar/ Karsinoma hepatoseluler

Karsinoma hepatoseluler hampir selalu dapat dihindari dengan perubahan gaya hidup, atau menghindari faktor risiko yang ada. (Stuart, 2011). Dalam menangani kanker hepar sangat penting untuk memperhitungkan stadium (penyebaran) kanker dan sebaik apa hepar tersebut masih bisa bekerja. Tapi usia, status kesehatan secara umum, dan pilihan pasien secara personal juga perlu diperhitungkan. Berdasarkan setiap faktor tersebut, pilihan penanganan meliputi pembedahan, ablasi, embolisasi, radiasi, kemoterapi, Dalam beberapa kasus, dokter mungkin merekomendasikan lebih dari satu macam penanganan. Namun perlu diingat juga, setiap penanganan memiliki resiko dan efek sampingnya sendiri. (ACS 2011).

Pengobatan yang ada saat ini biasanya terfokus pada dosis maksimal yang bisa ditoleransi oleh satu agen obat. Tapi, berdasarkan praktisi obat-obatan Cina tradisional, kombinasi herbal saat ini juga dapat digunakan sebagai alternatif antikanker. (Sagar dan Wong, 2001). Salah satunya adalah *Moringa sp.* Karena spesies ini sudah lama dikenal oleh praktisi dalam ilmu kedokteran, berperan dalam terapi tumor, penelitian kali ini difokuskan pada potensi spesies *Moringa oleifera* untuk prevensi (pencegahan) kanker (Fahey, 2006).

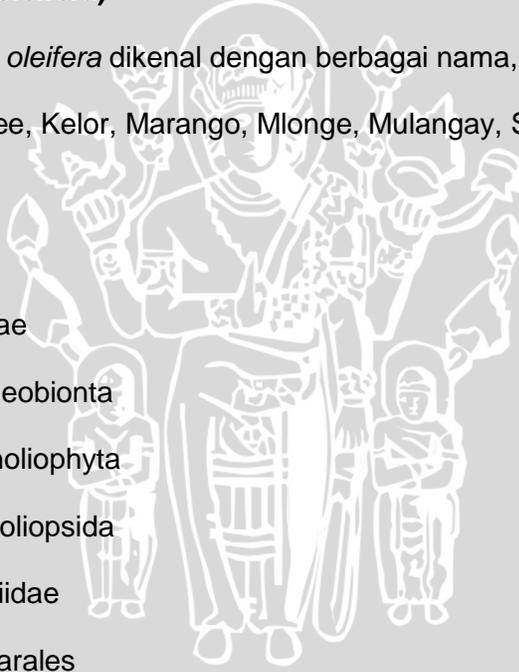
## 2.4 Kelor (*Moringa oleifera*)

Spesies *Moringa oleifera* dikenal dengan berbagai nama, antara lain:

Benzolive, Drumstick Tree, Kelor, Marango, Mlonge, Mulangay, Saijhan dan Sajna.

(Dolcas Biotech, 2008).

### 2.4.1 Taksonomi



Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Dilleniidae
Ordo	: Capparales
Famili	: Moringaceae
Genus	: Moringa
Species	: <i>Moringa oleifera</i> Lam.

(Integrated Taxonomic Information System, 2000)

#### 2.4.2 Penyebaran

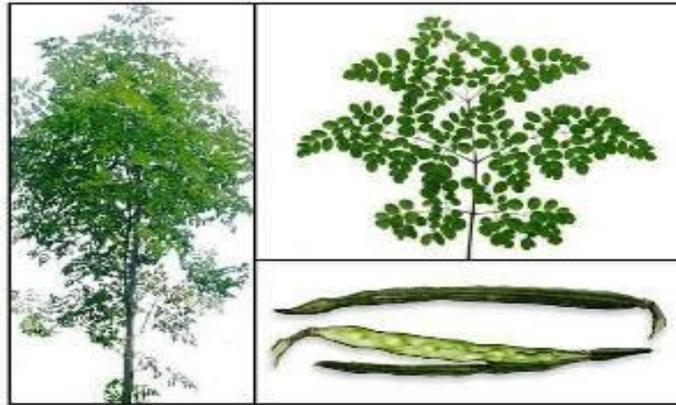
Tanaman kelor, menurut sejarahnya berasal dari kawasan sekitar Himalaya dan India, kemudian menyebar ke kawasan di sekitarnya hingga ke benua Afrika dan Asia Barat. Di Indonesia, tanaman kelor mempunyai nama lokal yaitu Kelor (Jawa, Sunda, Bali, Lampung), Kerol (Buru), Marangghi (Madura), Moltong (Flores), Kelo (Gorontalo), Keloro (Bugis), Kawano (Sumba), Ongge (Bima), Hau fo (Timor). Di daerah pedesaan, tanaman kelor sering ditemukan sebagai tanaman pagar hidup, pembatas tanah, atau penjalar tanaman lain. (UNIMUS, 2008).

#### 2.4.3 Morfologi

Tanaman kelor atau *Moringa oleifera* adalah tanaman yang mampu bertumbuh dengan cepat. Kelor berupa pohon yang selalu ada sepanjang tahun (*perennial*) dan dapat mencapai tinggi maksimum 7-12 meter dan berdiameter 20-40 sentimeter pada daerah setinggi dada (Foidl *et al.*, 2001).

Batang pohon kelor biasanya lurus, tetapi kadang-kadang tidak terbentuk dengan baik. Pohon tumbuh dengan batang yang pendek dan lurus hingga mencapai tinggi sekitar 1,5-2 meter sebelum mulai bercabang. Tetapi kadang dapat mencapai 3 meter. Cabang pohon bertumbuh dengan pola yang tidak terorganisasi dan ujungnya berbentuk payung. Secara bergantian, 2-3 kali daun muda pada tangkai tumbuh di ujung cabang. Panjangnya sekitar 20-70 sentimeter, Berwarna keabu-abuan dan berbulu halus saat muda, bertangkai daun panjang dengan 8-10 pasang pinnae. Bunga kelor berbau harum dan manis, memiliki lebar 2,5 sentimeter majemuk dan dihasilkan di ketiak daun dengan panjang 10-25 sentimeter. Mahkotanya berwarna putih atau krem dan pada bagian dasar terdapat bintik-bintik

kuning. Buah kelor berbentuk 3 lobus polong dengan panjang 20-60 sentimeter. Tiap polong berisi 12-35 biji (Foidl *et al.*, 2001).



**Gambar 2.4** *Moringa oleifera* (Agustini *et al.*, 2011)

#### 2.4.4 Kandungan Zat dalam Daun

Pada umumnya, daun *Moringa oleifera* dapat dimakan dalam keadaan masak atau mentah. Daun ini kaya dengan Vitamin K, A, C, B1, B2, B6, mangan, magnesium, kalsium, kalium, zat besi, protein, niasin, dan serat. Daun juga dapat dikeringkan, lalu dijadikan tepung dan ditambahkan dalam makanan (Richardson, 2009).

Perbandingan jumlah zat gizi yang terkandung dalam *Moringa oleifera* secara umum dengan bagian tumbuhan lain cukup besar. 1 gram daun *Moringa oleifera* mengandung vitamin C 7 kali lebih banyak dibandingkan buah jeruk, vitamin A 4 kali lebih banyak dibandingkan wortel, kalsium 4 kali lebih banyak dibandingkan susu, protein 2 kali lebih banyak dibandingkan susu, dan kalium 3 kali lebih banyak dibandingkan buah pisang (Hsu *et al.*, 2006).

Kelor (*Moringa oleifera*) varietas lokal yang telah diteliti dan ditemukan merupakan varietas unggul. Hal ini telah dibuktikan dari penelitian jenis kandungan,

ketahanan terhadap penyakit, dan ketahanan hidup pada daerah tropis (Therik *et al*, 2009).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan gizi yang terdapat didalam tanaman kelor seperti tersaji pada tabel 2.1.

**Tabel 2.1 Hasil Pemeriksaan Kandungan Zat Gizi Kelor per 100 gram**

(Campden and Chorleywood Food Research Association, 1998)

	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	450	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%

Kandungan gizi *Moringa oleifera* tersebut antara lain mineral kalsium, zat besi, magnesium, fosfor dan seng. Di samping itu, terdapat protein dan vitamin antara lain vitamin A, B1, B2 B3, dan vitamin C (*Ascorbic acid*) yang sangat bermanfaat bagi pertumbuhan anak-anak yang mengalami kekurangan gizi, bahkan tidak kalah dibandingkan dengan hasil penelitian di beberapa negara terhadap varietas tanaman kelor yang ada seperti di Senegal, Amerika dan negara lain yang telah memanfaatkan tanaman tersebut untuk mengatasi gizi buruk dan peningkatan status gizi anak (Therik *et al*, 2009).

Kandungan protein daun *Moringa oleifera* baik yang diekstrak, maupun tidak, cukup tinggi (43,5% pada daun yang diekstrak dan 25,1% pada daun yang tidak diekstrak). Sekitar 95% asam amino esensial termasuk asam amino yang mengandung sulfur pada daun lebih tinggi daripada konsentrasi optimal saat dibandingkan dengan pola asam amino yang direkomendasikan WHO untuk anak-anak 2-5 tahun (Foidl *et al.*, 2001)

#### **2.4.5 Efek Antioksidan**

Tubuh manusia mempunyai beberapa mekanisme untuk melawan dampak yang dihasilkan oleh radikal bebas dan ROS lain. Salah satu lini pertahanan yang penting adalah sistem enzim. Beberapa mineral esensial termasuk selenium, tembaga, mangan, dan seng penting untuk pembentukan aktivitas dari enzim-enzim ini. Karenanya, jika suplai nutrisi dari mineral-mineral tersebut tidak cukup, pertahanan enzimatik terhadap radikal bebas akan rusak. (Bagchi dan Puri, 1998).

Lini kedua pertahanan terhadap dampak dari radikal bebas adalah kehadiran dari anti-oksidan. Sebuah anti-oksidan adalah sebuah molekul stabil yang cukup

untuk mendonasikan sebuah elektron kepada radikal bebas dan menetralkannya. Beberapa anti-oksidan, termasuk glutathione, ubiquinol, dan asam urat, diproduksi selama metabolisme normal tubuh. Anti-oksidan lain yang lebih ringan ditemukan dalam diet. Walaupun ada sekitar 4000 anti-oksidan yang telah teridentifikasi, yang paling terkenal adalah vitamin C, dan karotenoid. Banyak anti-oksidan lain adalah komponen fenol atau polifenol. (Bagchi dan Puri,1998). Kandungan antioksidan dalam kelor antara lain:

#### 2.4.5.1 Karotenoid

Karotenoid adalah kelompok dari pigmen merah, jingga dan kuning yang ditemukan pada tanaman pangan, terutama buah dan sayur. Beberapa karotenoid seperti  $\beta$ -karoten bertindak sebagai *precursor* vitamin A; yang lain tidak.  $\beta$ -karoten efisien pada tekanan oksigen rendah. Selain  $\beta$ -karoten, karotenoid lain yang penting termasuk  $\alpha$ -karoten, lycopene, lutein, zeaxanthine, dan  $\beta$ -cryptoxanthin (Bagchi dan Puri,1998).

Stimulasi dari komunikasi *gap junctional* telah dihipotesiskan menjadi mekanisme biokimia yang paling mungkin dari aktivitas anti-kanker karotenoid. Produk oksidasi karotenoid, terutama analog asam retinoat, berkontribusi terhadap properti biologis ini. Aksi anti-oksidan dari karotenoid tergantung dari kemampuan mereka menghilangkan ROS dan menangkap radikal peroksil. Aktivitas anti-oksidan utama dari karotenoid adalah kemampuannya untuk menghilangkan ROS. Hasilnya adalah karotenoid yang tereksitasi, yang memiliki kemampuan untuk menghilangkan energi yang baru didapat melalui sebuah serial interaksi rotasional dan vibrasional dengan pelarut, sehingga meregenerasi karotenoid asli yang tidak tereksitasi, yang

dapat digunakan kembali untuk siklus pemusnahan ROS selanjutnya. Lycopene adalah pemusnah ROS yang paling efisien. Pencegahan peroksidasi lipid oleh karotenoid dihipotesiskan terutama lewat pemusnahan ROS.  $\beta$ -karoten juga merupakan pemusnah dari radikal peroksidasi, terutama pada tekanan oksigen rendah. Aktivitas ini juga dimiliki oleh karotenoid yang lain (Paiva *et al.*, 1999).

#### 2.4.5.2 Senyawa Polifenol

Polifenol (*polyphenol*) merupakan senyawa kimia yang terkandung di dalam tumbuhan dan bersifat antioksidan kuat. Polifenol adalah kelompok antioksidan yang secara alami ada di dalam sayuran, buah-buahan, kacang-kacangan, minyak zaitun, dan minuman. (Widiastuti, 2009). Senyawa polifenol terdiri dari beberapa subkelas yakni, flavonol, isoflavon, flavanon, flavon, antosianidin, dan katekin. Turunan dari katekin di antaranya adalah epikatekin, epigallo-katekin, apigallo-katekin galat, dan quercetin. Quercetin merupakan antioksidan kuat, dengan kekuatan 4-5 kali lebih tinggi dibandingkan vitamin C dan vitamin E yang dikenal sebagai antioksidan potensial. Selain itu, Kaempferol yang merupakan salah satu jenis flavonoid juga memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. (Middleton *et al.*, 2005).

Jaringan dari berbagai varietas *Moringa oleifera* telah dianalisa dan mengandung banyak flavonoid diikuti 45 antioksidan lainnya. Flavonoid diabsorpsi cepat dan bertahan dengan stabil dalam cairan lumen usus. Flavon (2-fenil-4H-1-benzopyran-4-one) yang merupakan anggota flavonoid berperan sebagai penghambat proliferasi dan menginduksi apoptosis dengan meningkatkan ekspresi bax serta menurunkan ekspresi bcl-2 pada sel-sel kanker. Bax yang meningkat dan bcl-2 yang menurun menyebabkan aktivasi caspase-9. (Erhart *et al.*, 2005). Di

samping itu, Kaempferol dan Quercetin memiliki aktivitas antiradikal yang lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa flavonol lainnya. (Bennett *et al.*, 2003).

**Tabel 2.2 Aktivitas antiradikal senyawa turunan flavon dan flavonol**

(Bennett *et al.*, 2003)

No	Senyawa flavon/flavonol	Aktivitas antiradikal ( % A)
1	Kaempferol	93.5
2	Galangin	91.8
3	Quercetin	89.8
4	Morin	96.5
5	Robinetin	82.3
6	Fisetin	79.0
7	3-hidroksiflavon	66.0
8	Larisitrin	84.6
9	Mirisetrin	72.8
10	3,5,7,3',4',5'pentametoksiflavon	12.6
11	7-hidroksiflavon	2.8
12	Flavon	1.5
13	5-hidroksiflavon	0.6
14	Krisin	1.1
15	8-metoksiflavon	0.7
16	Apigenin	0.7

Flavonoid adalah turunan dari *benzo- $\gamma$ -pyrone* yang memiliki aktivitas anti-inflamasi dengan mengurangi formasi dari *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan spesies nitrogen, prostaglandin, dan leukotrien (Blonska *et al.*, 2003).

Ketika flavonol *quercetin* bereaksi dengan radikal bebas, *quercetin* mendonorkan protonnya dan menjadi senyawa radikal, tapi elektron tidak berpasangan yang dihasilkan didelokalisasi oleh resonansi, hal ini membuat senyawa *quercetin* radikal yang awalnya memiliki energi yang sangat rendah untuk menjadi radikal yang reaktif (Waji dan Sugrani, 2009). Quercetin, yang umumnya didapatkan dari makanan, dikenal karena kemampuannya dalam mencari dan mengikat ROS (Priyadarsini dan Nagini, 2012).

Selain quercetin juga didapat kaempferol, yang juga berfungsi sebagai antioksidan. Kaempferol menunjukkan aktivitas antioksidan dan anti-inflamasi dengan memodulasi NF- $\kappa$ B *signaling cascade* yang berkaitan dengan *Advanced Glycation Endproducts* (AGE) serta gen-gen proinflamasi dengan menekan aktivasi NADPH oksidase yang diinduksi AGE (Kim *et al.*, 2010).

## 2.5 Konversi Obat

Beberapa penelitian menggunakan *Body Surface Area* (BSA) untuk mengkonversi dosis obat antar spesies. Korelasi antara volume darah, protein plasma yang tersirkulasi, dan fungsi renal, dengan BSA, juga sudah dijelaskan. Dengan demikian, BSA berhubungan erat dengan parameter dari biologis mamalia, yang membuat normalisasi dengan BSA layak untuk dipertimbangkan, mengingat cara kerja kebanyakan obat berhubungan dengan proses atau fungsi fisiologis (Reagan-Shaw *et al.*, 2007).

Formula for Dose Translation Based on BSA	
HED (mg/kg) = Animal dose (mg/kg) multiplied by	$\frac{\text{Animal Km}}{\text{Human Km}}$

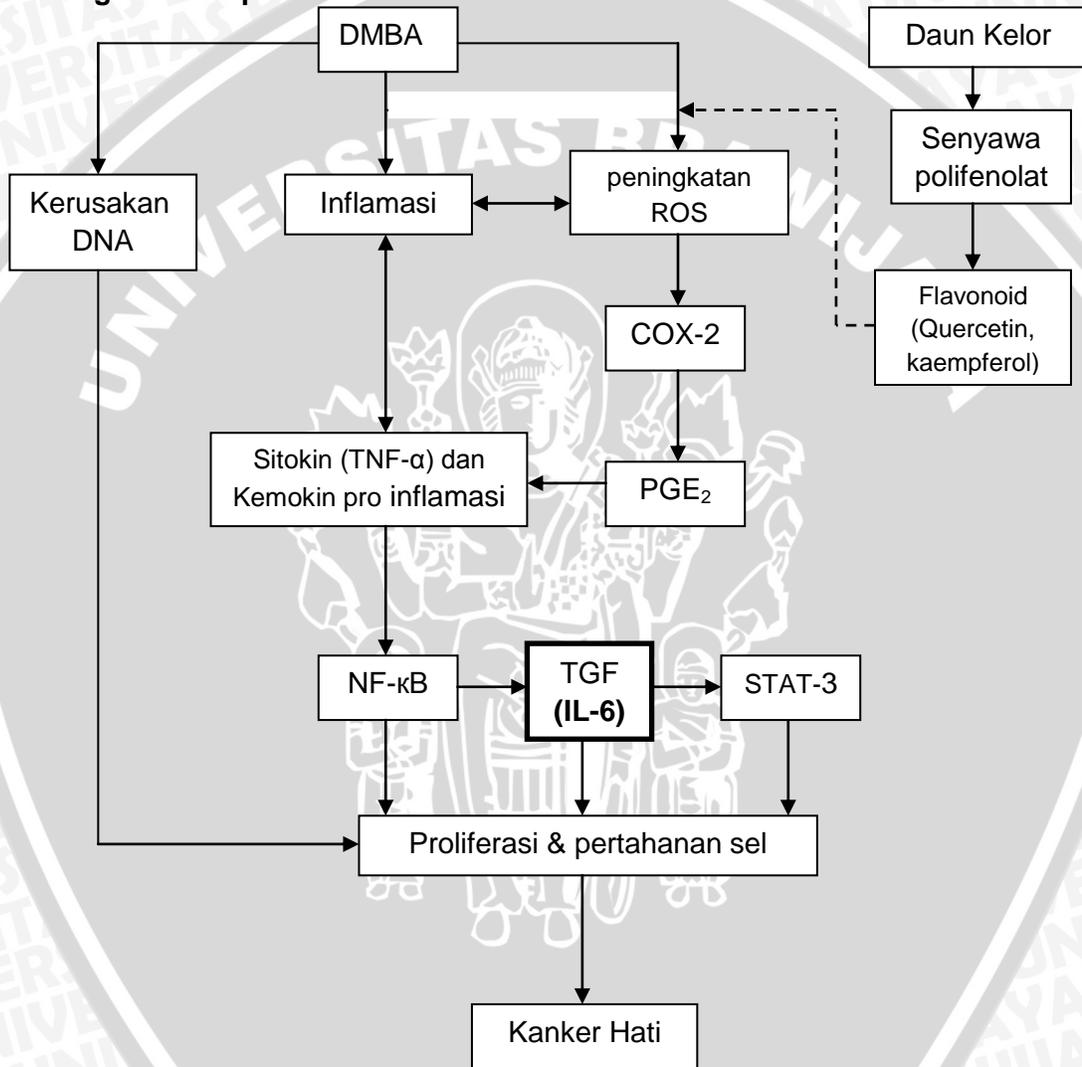
\*HED = Human Equivalent Dose

**Gambar 2.5 Rumus Translasi Dosis berdasarkan BSA (Reagan-Shaw *et al.*,2007)**

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan:



Dicetak tebal : parameter yang diukur dalam penelitian ini.

### 3.2 Penjelasan Kerangka Konsep

Senyawa 7,12-dimetilbenz ( $\alpha$ ) antrasen (DMBA) yang mempunyai 4 cincin benzene termasuk dalam tujuh *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* (PAH) yang dapat menyebabkan kanker pada manusia. Dalam percobaan ini, DMBA digunakan untuk menginduksi kanker hati jenis Karsinoma hepatoseluler melalui proses kerusakan DNA, inflamasi, maupun adanya ROS (*reactive oxygen species*) berlebih. Selain berjalan sendiri, inflamasi kronis juga berhubungan dengan produksi radikal bebas *reactive oxygen species* (ROS) dalam mendukung terjadinya mutagenesis onkogenik.

Sel imun yang dihasilkan dalam inflamasi kronis memproduksi berbagai sitokin (seperti TNF- $\alpha$ ) dan kemokin yang mengeluarkan respon inflamasi lokal dan mempertinggi tingkat pertumbuhan dan pertahanan sel premaligna. Sitokin ini akan mengaktivasi faktor transkripsi, seperti NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Salah satu TGF (*Tumor Growth Factor*) yang bergantung pada adanya NF- $\kappa$ B adalah IL-6 (Interleukin 6). Peningkatan IL-6 ini juga dimediasi oleh STAT 3 dalam memicu perkembangan HCC.

ROS dalam peranannya menimbulkan inflamasi akan mengaktifkan proses cyclooxygenase 2 (COX-2) yang memproduksi prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). PGE<sub>2</sub> akan diregulasi untuk mensintesis sitokin proinflamasi, seperti TNF- $\alpha$ , dan mediator inflamasi, seperti NO. *Upregulation* dari TNF- $\alpha$  akan memicu faktor NF- $\kappa$ B dan proses berlanjut seperti dalam proses inflamasi.

IL-6 yang semakin meningkat karena 2 proses di atas berperan dalam patogenesis kanker, sebagai mediator inflamasi yang berfungsi mentransisi inflamasi akut ke kronis, dimana sel-sel mononuklear semakin banyak dan sel ini bertanggung jawab untuk keluarnya sitokin-sitokin, kemokin dan faktor pertumbuhan sel, yang mana diperlukan untuk pertahanan dan pertumbuhan maupun proliferasi sel kanker (efek *prosurvival* dan *protumorigenic*).

Dengan pemberian ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*), yang mengandung antioksidan senyawa polifenolat golongan flavonoid (*quercetin* dan *kaempferol*) dalam jumlah cukup tinggi, diharapkan ROS dapat berkurang, aktivasi dari NF-kB dalam proses inflamasi juga dihambat. Penurunan kadar ROS dan terhambatnya proses inflamasi akan menyebabkan turunnya espresi IL-6, sehingga proses karsinogenesis akan terhambat.

### 3.3 Hipotesis Penelitian

Pemberian ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan ekspresi IL-6 jaringan hepar tikus wistar (*Rattus norvegicus*) model karsinoma hepatoseluler dengan induksi DMBA (7,12-dymethylbenz (a) anthracene).

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Rancangan Penelitian

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

#### 4.2. Binatang Coba

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

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

Objek penelitian yang dipakai adalah tikus wistar jenis kelamin jantan, dewasa dengan umur  $\pm$  2 bulan. Teknik randomisasi untuk pengelompokan perlakuan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) atau *Randomized Completely Design* (RCD) mengingat baik hewan coba, bahan pakan, dan bahan penelitian lainnya dapat dikatakan homogen. Pada rancangan ini

dimungkinkan setiap hewan coba berpeluang sama untuk mendapat kesempatan sebagai sampel baik dalam kelompok perlakuan maupun dalam kelompok kontrol.

#### 4.2.2. Estimasi Jumlah Pengulangan

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

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

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

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

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

$$5n \geq 21$$

$$n \geq 4.2$$

Dari rumus tersebut, jika banyak perlakuan adalah 5 maka jumlah pengulangan yang dibutuhkan untuk tiap-tiap kelompok perlakuan adalah 4. Sedangkan 2 ekor sisanya untuk cadangan. Jadi untuk 5 kelompok dibutuhkan sebanyak 30 tikus. (Solimun, 2001)

#### 4.2.3 Kriteria Inklusi

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 adaptasi.

#### 4.3. Variabel Penelitian

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian per oral ekstrak metanol daun kelor dengan dosis 20, 40, 80 mg/kgBB/hr. Pemberian per oral ekstrak metanol daun kelor dengan sonde (Parvathy and Umamaheswari, 2007). Pada penelitian ini, ekstrak metanol diberikan 1 setiap hari, selama 60 hari, setelah 45 hari sebelumnya diinduksi DMBA.

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah ekspresi IL-6 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 metanol daun kelor dengan sonde

#### 4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

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

#### 4.5. Alat dan Bahan Penelitian

##### 4.5.1. Alat

1. Alat Pemeliharaan Binatang Coba

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

2. Alat Pembuat Makanan Binatang Coba

Baskom plastik, timbangan, sarung tangan, gelas ukur

3. Alat Pengambilan Sampel

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

4. Alat Pemeriksaan IL-6 jaringan hepar adalah *Immunohistochemistry kit* (IHK), 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.

a. Pakan normal yang terdiri dari comfeed PARS 53% (dengan kandungan air 12 %, protein 11 %, lemak 4 %, serat 7 %, abu 8 %, Ca 1,1 %, fosfor 0,9 %, antibiotika, coccidiostat 53 %) dan tepung terigu 23,5 %, dan air 23,5 %.

2. Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*)

Proses ekstraksi menggunakan 200 gram tepung daun kelor (*Moringa oleifera*) kemudian rendam dengan metanol sampai volume 900 ml, dikocok 30 menit lalu di biarkan semalam. Ambil lapisan atas campuran metanol dengan zat aktif. Tunggu sampai aliran metanol berhenti

menetes pada labu penampung (1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu). Hasil yang diperoleh kira-kira 42 gr atau seperlima dari bahan alam kering. Simpan dalam freezer. (Laboratorium Farmakologi FKUB).

### 3. Bahan Pemeriksaan Immunohistokimia

Jaringan hepar tikus, IL-6 jaringan hepar, IHK *kit unit*.

#### 4.6. Definisi Operasional

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

Perlakuan (Intervensi) adalah pemberian suplementasi ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*). Dari tanaman kelor varietas madura yang telah berumur lebih dari 2 tahun, dipakai daunnya, diolah menjadi tepung lalu diekstrak metanol dengan dosis 0, 20, 40, 80 mg/kgBB/hari dengan cara dimasukkan per oral dengan sonde (Parvathy and Umamaheswari, 2007).

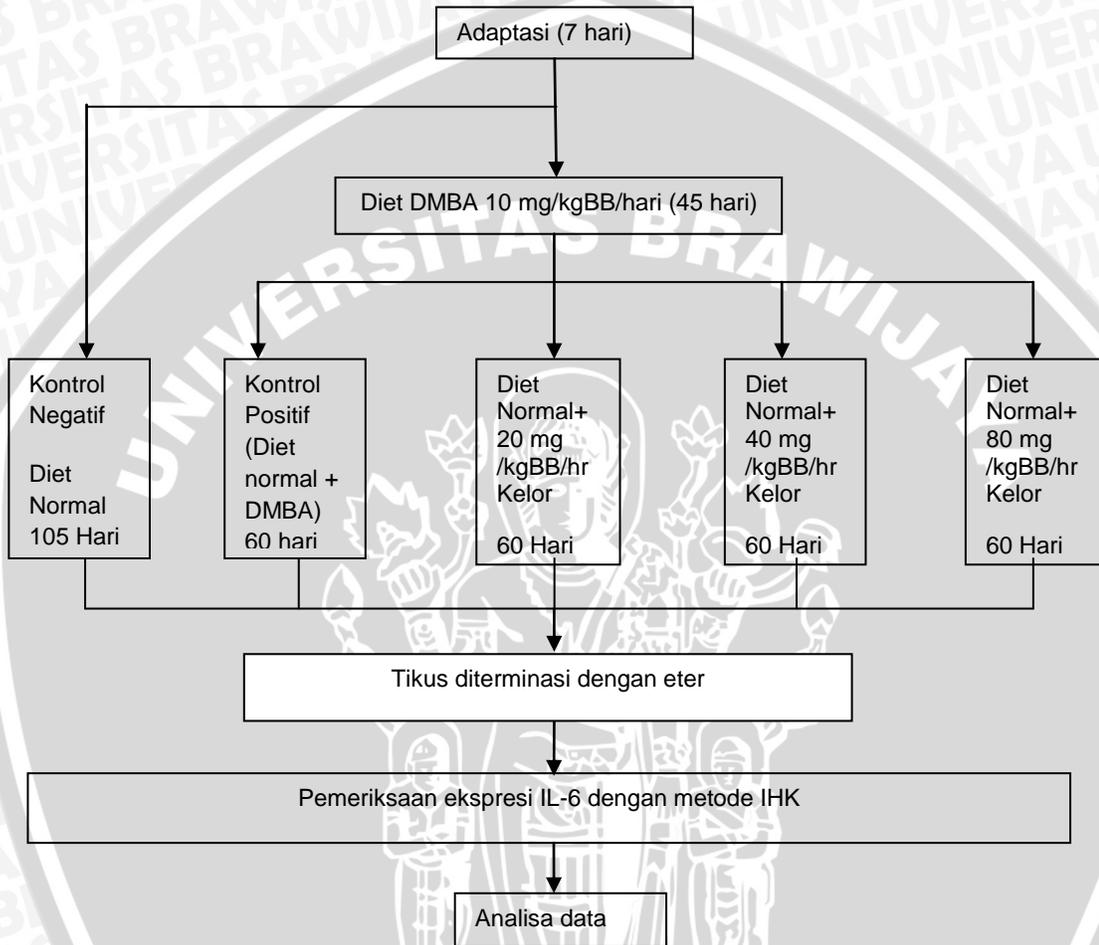
##### 2) Ekspresi IL-6 jaringan hepar

Ekspresi IL-6 jaringan hepar didapatkan dari sel yang mengekspresikan IL-6 per lapangan pandang dari sediaan IHK pada setiap kelompok tikus. Ekspresi IL-6 dihitung dengan satuan sel endotel sinusoid dan sel Kupffer dengan perbesaran mikroskop 400x sebanyak 10 lapangan pandang pada setiap tikus.

#### 4.7. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh pengetahuan mengenai efek ekstrak air daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap ekspresi IL-6 pada jaringan hepar

tikus (*Rattus norvegicus*) wistar dengan diet DMBA. Alur penelitian dapat dijelaskan melalui bagan berikut



Gambar 4.1. Alur penelitian

#### 4.7.1. Adaptasi

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

#### 4.7.2. Induksi 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)

Tikus wistar diberi 10 mg/kgBB/hari 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) per oral (sonde) pada pagi hari pukul 10.00 WIB. Pemberian DMBA dilakukan selama 45 hari. Setelah 30 hari, 1 ekor tikus yang diberi DMBA tanpa ekstrak *Moringa oleifera* diterminasi untuk melihat adanya perkembangan karsinogenesis pada jaringan hepar (Indra, 2011). Dosis yang diberikan dan lama pemberian DMBA pada penelitian ini merupakan salah satu bentuk percobaan untuk mencari dosis optimum dan menghindari kematian tikus.

#### 4.7.3. Perlakuan

##### 4.7.3.1. Pemeliharaan

Dalam masa ini, kelima kelompok tikus mendapat perlakuan yang berbeda. Untuk kelompok I (kontrol negatif), tikus hanya diberi pakan normal (standar) saja. Kelompok perlakuan II hingga V diberi diet DMBA sebanyak 10 mg/kgBB/hari dengan sonde. Selain itu, kelompok II diberi diet normal tanpa pemberian ekstrak metanol daun kelor. Sedangkan, kelompok III diberi ekstrak metanol daun kelor per oral dengan dosis 20 mg/kgBB/hr dengan sonde + diet normal. Kelompok IV diberi ekstrak metanol daun kelor per oral dengan dosis 40 mg/kgBB/hr + diet normal. Kelompok V diberi ekstrak metanol daun kelor per oral dengan dosis 80 mg/kgBB/hr + diet normal. Semua pakan di atas diberikan selama 60 hari.

##### 4.7.3.2. Pembedahan

Pemeriksaan ekspresi IL-6 jaringan hepar tikus wistar pada eksperimen ini memerlukan jaringan hepar tikus. Penelitian ini merupakan penelitian payung, yang meneliti efek ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) pada tikus (*Rattus*

*norvegicus*) Wistar yang diinduksi 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) dengan parameter yang berbeda-beda, antara lain: TNF- $\alpha$ , TRAIL-R1, HSP-70, caspase-3, dan lain-lain. Karena itu, setelah 60 hari pemberian per oral daun kelor ketiga puluh tikus dibunuh dengan cara pembiusan eter. Kemudian abdomen dibuka, sebagian jaringan hepar diambil untuk dilakukan pemeriksaan ekspresi IL-6.

#### **4.7.4. Prosedur Pemeriksaan IHK**

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

Metode Imunohistokimia pemeriksaan ekspresi IL-6 dilakukan dengan cara biakan sel dicuci dengan PBS selama 30 menit dan memfiksasi dengan metanol selama 5 menit. Meringanginkan dan mencuci dengan PBS pH 7,4. Mengaplikasikan 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 10 menit dan mencuci dengan PBS pH 7,4. Mebloking menggunakan serum 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100 dan menginkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Mencuci dengan PBS pH 7,4 dan menetes dengan monoclonal anti p50/p65, dan menginkubasi semalam. Mencuci dengan PBS pH 7,4, menetes dengan antibodi sekunder berlabel biotin dan menginkubasi selama 1 jam. Mencuci dengan PBS pH 7,4 dan menetes dengan SA-HRP (*Strep-Avidin horse radis peroxidase*) selama 40 menit, kemudian mencuci dengan PBS pH 7,4 dan mengaplikasikan cromogen untuk HRP, yaitu DAB

(Diamono Benzidine). *Counterstain* dengan Mayer hematoxilen selama 10 menit membilas dengan air kran dan mencuci dengan dH<sub>2</sub>O. Mengeringkan dan menutup dengan *coverglass* (Sarbini *dkk.*, 2007).

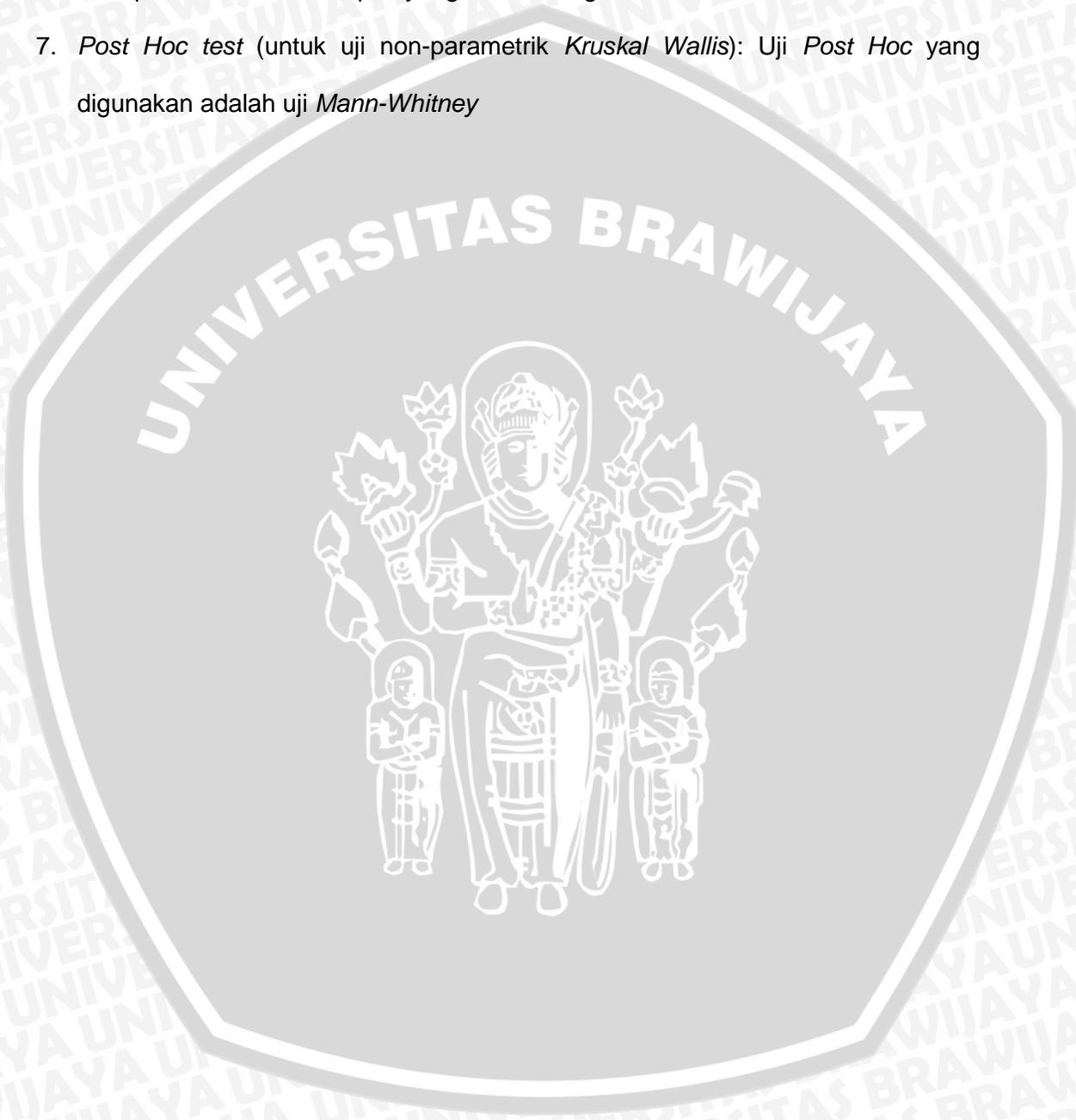
#### 4.8. Rencana Pengolahan dan Analisis Data

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

1. Uji normalitas data: menunjukkan bahwa sebaran data penelitian ini normal ( $p > 0,05$ ). Karena itu, untuk penyajian digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Untuk uji hipotesisnya, digunakan uji parametrik.
2. Uji homogenitas varian: menunjukkan bahwa data yang diperoleh memiliki varian yang homogen ( $p = 0,053$ ), karena itu analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.
3. Uji *One-way* ANOVA: didapatkan nilai rata-rata ekspresi IL-6 pada epitel mukosa jaringan hepar dari kelima populasi memang berbeda ( $p = 0,000$ ). Dengan demikian terdapat minimal 2 kelompok yang berbeda signifikan.
4. *Post Hoc test* (uji Tuckey HSD): Uji *Post Hoc* yang digunakan adalah uji Tuckey HSD dengan tingkat kemaknaan 95% ( $p < 0,05$ ).
5. Uji *Homogenous Subsets*: menunjukkan bahwa terdapat 4 subset yang didapatkan pada data, dan dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara subset sesuai hasil uji *Tukey*.
6. Bila dalam uji homogenitas varian didapatkan varian tidak homogen, analisa dilanjutkan dengan uji non-parametrik *Kruskal Wallis*: didapatkan nilai rata-rata

ekspresi IL-6 dari kelima populasi memang berbeda ( $p < 0,05$ ). Dengan demikian terdapat minimal 2 kelompok yang berbeda signifikan.

7. *Post Hoc test* (untuk uji non-parametrik *Kruskal Wallis*): Uji *Post Hoc* yang digunakan adalah uji *Mann-Whitney*



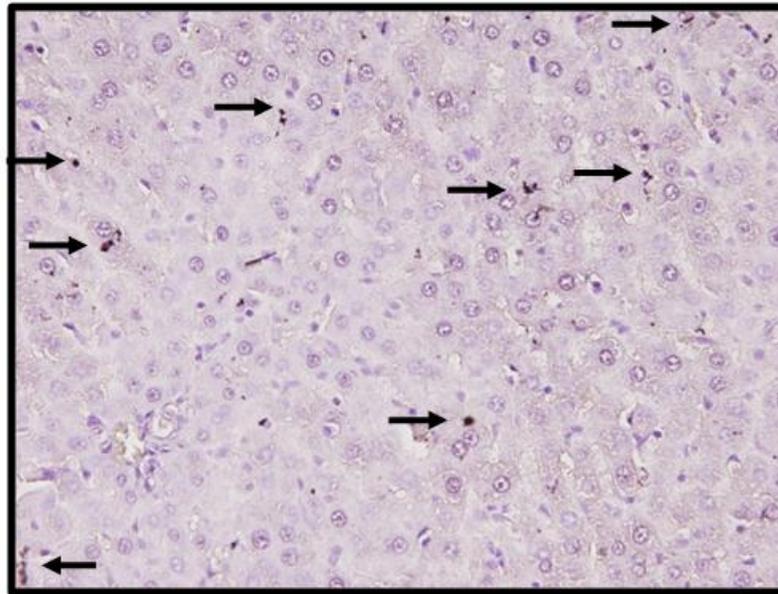
## BAB V

### HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

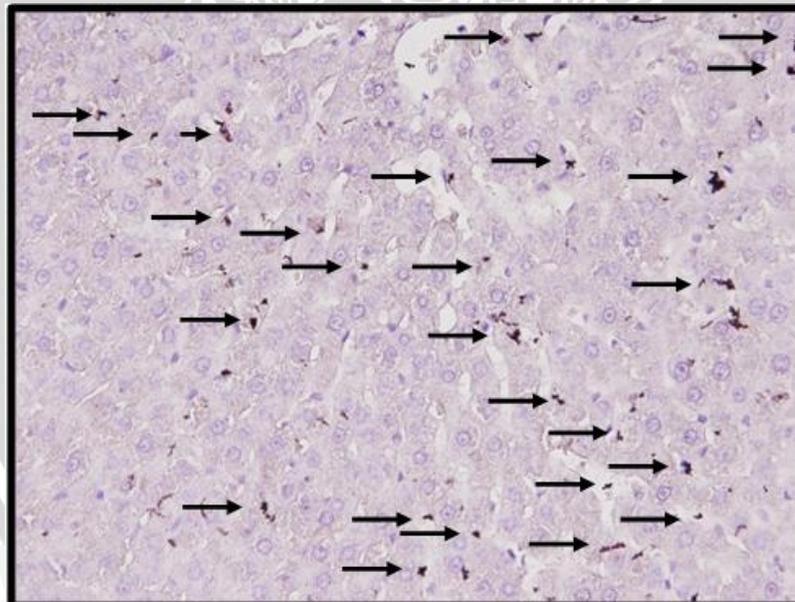
#### 5.1 Hasil Penelitian

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

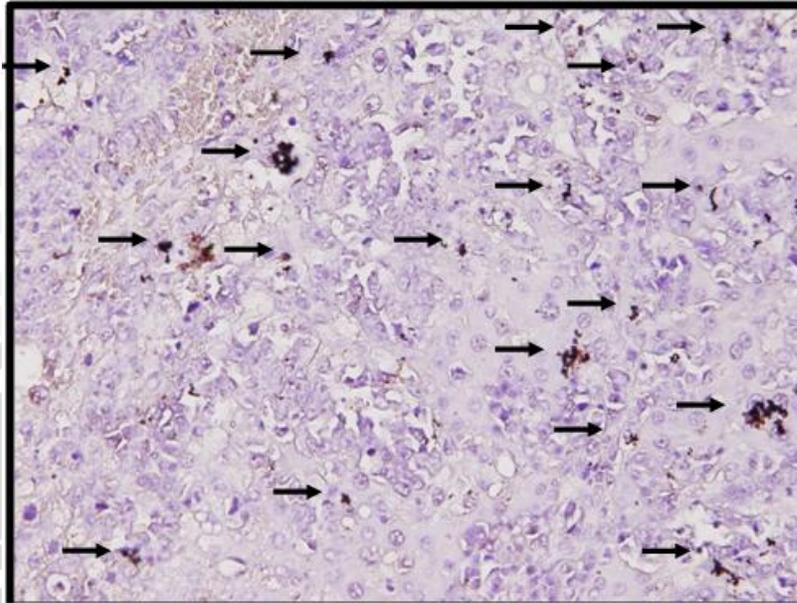
Pemeriksaan ekspresi IL-6 dengan menggunakan pengecatan IHK dan penghitungan sel yang mengekspresikannya di bawah mikroskop, dilakukan terhadap semua kelompok dari jaringan hepar tikus Wistar yang diinduksi DMBA. Pemeriksaan rata-rata ekspresi IL-6 dilakukan terhadap masing-masing kelompok perlakuan ditampilkan pada tabel 5.1. Rata-rata pada masing-masing perlakuan dihitung dengan cara menjumlahkan ekspresi IL-6 pada masing-masing kelompok perlakuan dibagi dengan ekspresi sampel pada masing-masing kelompok perlakuan. Dari lima sampel yang didapat, hanya empat sampel yang diambil karena ekspresi pengulangan yang dibutuhkan untuk tiap-tiap kelompok perlakuan dalam penelitian ini adalah 4.



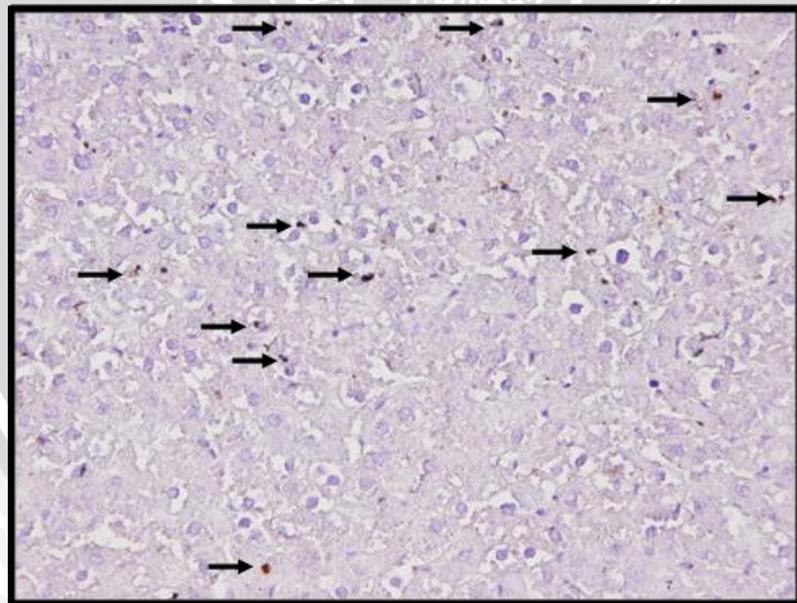
**Gambar 5.1** Gambaran Histologi Ekspresi IL-6 Jaringan Hepar Tikus Wistar Kelompok 1 (Kontrol negatif) dengan Metode IHK, Pembesaran 40x. Tanda panah (→) menunjuk ekspresi IL-6



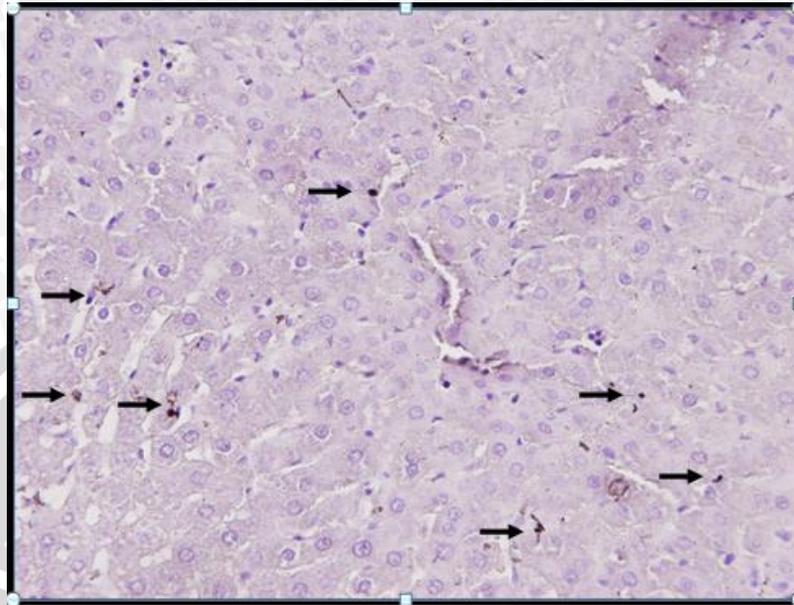
**Gambar 5.2** Gambaran Histologi Ekspresi IL-6 Jaringan Hepar Tikus Wistar Kelompok 2 (Kontrol positif) dengan Metode IHK, Pembesaran 40x. Tanda panah (→) menunjuk ekspresi IL-6



**Gambar 5.3** Gambaran Histologi Ekspresi IL-6 Jaringan Hepar Tikus Wistar Kelompok 3 (DMBA + Kelor 20 mg) dengan Metode IHK, Pembesaran 40x. Tanda panah (→) menunjuk ekspresi IL-6



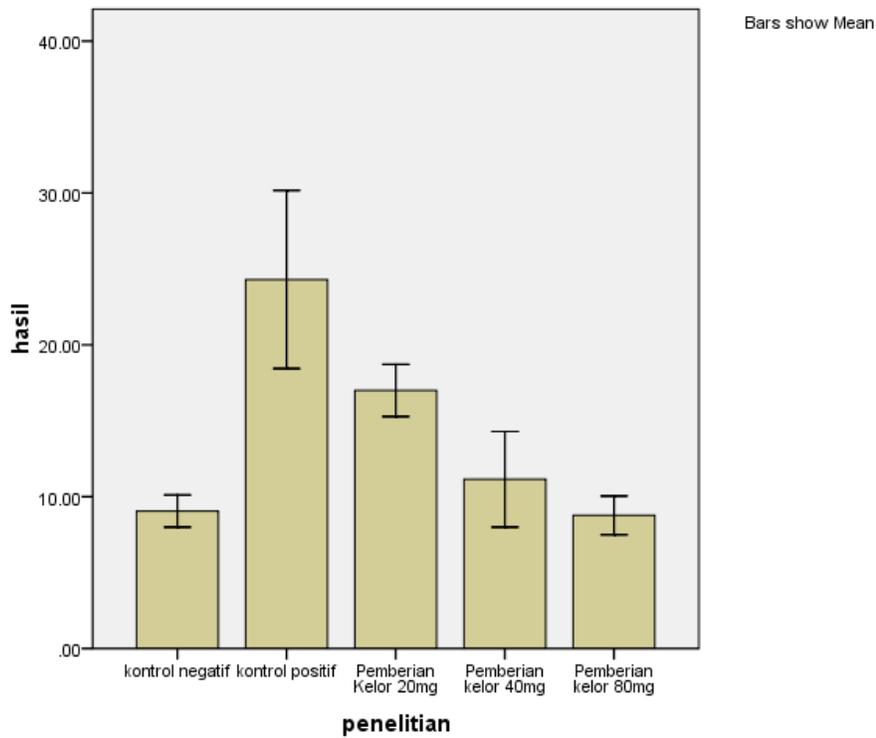
**Gambar 5.4** Gambaran Histologi Ekspresi IL-6 Jaringan Hepar Tikus Wistar Kelompok 4 (DMBA + Kelor 40 mg) dengan Metode IHK, Pembesaran 40x. Tanda panah (→) menunjuk ekspresi IL-6



**Gambar 5.5** Gambaran Histologi Ekspresi IL-6 Jaringan Hepar Tikus Wistar Kelompok 5 (DMBA + Kelor 80 mg) dengan Metode IHK, Pembesaran 40x. Tanda panah (→) menunjuk ekspresi IL-6

**Tabel 5.1 Rata-rata Ekspresi IL-6**

Kelompok	Rerata $\bar{x} \pm SD$ (sel/lap.pandang besar)	Standar Deviasi
Kontrol negatif	9.0500	1.28712
Kontrol positif	24.3000	7.13909
Pemberian kelor 20mg/hr	17.0000	2.09284
Pemberian kelor 40 mg/hr	11.1500	3.82840
Pemberian kelor 80 mg/hr	8.7750	1.55215



**Gambar 5.6 Hubungan Rerata Ekspresi IL-6 Jaringan Hepar Tikus Wistar pada Beberapa Kelompok Penelitian.**

Rata-rata ekspresi IL-6 pada kelompok 105 hari diet normal (kontrol negatif) adalah 9,05 sel (dengan perbesaran mikroskop 400x). Rata-rata ekspresi IL-6 pada kelompok yang 45 hari diet normal + DMBA dan 60 hari diet normal + 0 mg/hari ekstrak kelor (kontrol positif) adalah 24,3 sel (dengan perbesaran mikroskop 400x). Rata-rata ekspresi IL-6 pada kelompok 45 hari diet normal + DMBA dan 60 hari diet normal + 20 mg/hari ekstrak kelor (Perlakuan I) adalah 17 sel (dengan perbesaran mikroskop 400x). Rata-rata ekspresi IL-6 pada kelompok 45 hari diet normal + DMBA dan 60 hari diet normal + 40 mg/hari ekstrak kelor (Perlakuan II) adalah 11,15 sel (dengan perbesaran mikroskop 400x). Rata-rata ekspresi IL-6 pada kelompok 45 hari diet normal + DMBA dan 60 hari diet normal + 80 mg/hari kelor (Perlakuan III) adalah 8,775 sel (dengan perbesaran mikroskop 400x).

Dari gambar 5.2 terlihat rata-rata ekspresi IL-6 yang terendah terdapat pada kelompok perlakuan 45 hari diet normal + DMBA dan diet normal + 80 mg/hari ekstrak kelor (Perlakuan III) yaitu sebesar 8,775 sel (dengan perbesaran mikroskop 400x). Sedangkan rata-rata ekspresi IL-6 tertinggi yang 45 hari diet normal + DMBA dan 60 hari diet normal + 0 mg/hari ekstrak kelor (kontrol positif) yaitu sebesar 24,3 sel (dengan perbesaran mikroskop 400x).

Data yang didapatkan dari hasil penelitian “Pengaruh ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap penurunan ekspresi IL-6 jaringan hepar tikus wistar (*Rattus norvegicus*) model karsinoma hepatoseluler dengan induksi DMBA (7,12-dimethylbenz (a) anthracene)” dianalisis dengan menggunakan program komputer SPSS 16 untuk Windows XP. Rata-rata ekspresi IL-6 berdasarkan gambar 5.2 menunjukkan bahwa pada kelompok P I, P II, P III yang mendapat diet normal, DMBA, dan ekstrak kelor pada berbagai dosis memiliki ekspresi IL-6 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol positif ( $p=0,000$ ).

## 5. 2 Analisis Data

Hasil penelitian tersebut diuji dengan uji normalitas data dan homogenitas varian, seperti tersusun dalam lampiran 7 dan 9. Untuk menguji normalitas distribusi data digunakan Shapiro-Wilk. Didapatkan bahwa distribusi data hasil penelitian ini adalah normal. Sedangkan untuk menguji homogenitas varian digunakan *Levene test*. Dari hasil *Levene test* tampak bahwa data berasal dari populasi-populasi yang memiliki varian tidak homogen ( $p=0,001$ ). Oleh karena data hasil penelitian memiliki distribusi normal, dan varian yang tidak homogen, maka tidak dapat dilakukan pengujian *One-way ANOVA*, sehingga dilakukan uji non parametrik *Kruskal Wallis*.

Uji non parametrik *Kruskal Wallis* (Lampiran 1) dilakukan untuk menguji apakah keempat sampel memiliki rata-rata (*mean*) yang sama. Dari hasil tes tersebut didapatkan nilai rata-rata IL-6 dari kelima populasi memang berbeda ( $p < 0,05$ ). Dengan demikian terdapat minimal 2 kelompok yang berbeda signifikan.

Analisis dilanjutkan dengan *Post hoc test* yang bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes non parametrik *Kruskal Wallis*. Pada analisis ini digunakan *Mann-Whitney test* (Lampiran 2).

Dari hasil *Mann-Whitney test* terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi IL-6 pada jaringan hepar tikus secara nyata antara kontrol negatif dengan kontrol positif ( $p = 0,021$ ), kontrol negatif dengan perlakuan I (45 hari diet normal + DMBA dan 60 hari diet normal + 20 mg/hari ekstrak kelor) ( $p = 0,021$ ), kontrol positif dengan perlakuan II (45 hari diet normal + DMBA dan 60 hari diet normal + 40 mg/hari kelor) ( $p = 0,021$ ), kontrol positif dengan perlakuan III (45 hari diet normal + DMBA dan 60 hari diet normal + 80 mg/hari kelor) ( $p = 0,021$ ).

Analisis antara kontrol negatif dengan perlakuan II (45 hari diet normal + DMBA dan 60 hari diet normal + 40 mg/hari ekstrak kelor) dan perlakuan III (45 hari diet normal + DMBA dan 60 hari diet normal + 80 mg/hari ekstrak kelor) tidak berbeda signifikan ( $p = 0,248$  dan  $p = 0,773$ ). Analisis antara kontrol positif dengan kelompok perlakuan I (45 hari diet normal + DMBA dan 60 hari diet normal + 20 mg/hari ekstrak kelor) tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p = 0,084$ ). Analisis antara perlakuan II (45 hari diet normal + DMBA dan 60 hari diet normal + 40 mg/hari ekstrak kelor) dengan perlakuan III (45 hari diet normal + DMBA dan 60

hari diet normal + 80 mg/hari ekstrak kelor) juga menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ( $p=0,248$ ).

Dari hasil-hasil tersebut dapat dilihat ekspresi IL-6 pada kelompok Perlakuan I sampai III (kelompok III sampai V) cenderung menurun. Oleh karena itu dapat diambil kesimpulan bahwa ekstrak metanol daun kelor memiliki efek penurunan ekspresi IL-6 pada jaringan hepar yang diinduksi DMBA.



## BAB VI

### PEMBAHASAN

Dalam menimbulkan kanker, salah satu hal yg berperan adalah akumulasi dari ROS/ RNS baik melalui jalur eksogen dan endogen, yang kemudian menimbulkan stress oksidatif dan *redox regulation* dalam jalur sinyal sel, sehingga muncul berbagai sel kanker. (Valko *et al*, 2006). Stres oksidatif juga merupakan salah satu mekanisme yang berkontribusi dalam inisiasi dan progresi dari kerusakan hepar dalam berbagai kelainannya. DMBA dalam penelitian ini dimaksudkan sebagai penginduksi kanker hati (Fauzi *et al*, 2011). DMBA sebagai karsinogen yang spesifik organ, memediasi karsinogenesis dengan menginduksi kerusakan DNA, dan membentuk ROS berlebihan, serta memediasi proses inflamasi kronis (Manoharan *et al*, 2008). Sel imun, yang sering menginfiltrasi tumor dan lesi preneoplastik, memproduksi berbagai sitokin dan kemokin yang mengeluarkan respon inflamasi lokal dan mempertinggi tingkat pertumbuhan dan pertahanan sel premaligna dengan mengaktifasi faktor transkripsi salah satunya adalah NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Salah satu TGF (*Tumor Growth Factor*) yang bergantung pada adanya NF- $\kappa$ B dan dihasilkan oleh sel myeloid adalah IL-6 (Interleukin 6). (Grivennikov *et al*, 2009).

*Moringa oleifera* adalah pohon dengan ukuran kecil, dengan tinggi kurang lebih 5 hingga 10 meter. Tanaman ini diusahakan di seluruh dunia karena kegunaannya yang beragam. Setiap bagian *Moringa* dapat digunakan untuk tujuan nutrisi dan/ atau medis. Selain sebagai sumber protein, vitamin, minyak, asam

lemak, elemen makro-mikro mineral yang baik, tanaman ini juga diketahui berfungsi sebagai antiinflamasi, antimikroba, antioksidan, antikanker, pelindung jantung dan hepar, *anti-ulcer*, diuretic, *antiurolithiatic*, dan *antihelminthic* (Farooq, 2012). Ekstrak etanol dan alkohol (metanol) dari daun *Moringa oleifera*, keduanya menunjukkan aktifitas antiinflamasi yang signifikan dibanding dengan referensi dari Natrium diklofenat (Rakesh, 2011). Daun *Moringa oleifera* ini mengandung antioksidan dalam jumlah besar, seperti quercetin, isoquercetin, kaempferol, zeatin, rutin,  $\beta$ -karoten, dan asam askorbat. *Moringa oleifera* menunjukkan aktifitas *hepatoprotective* pada perlakuan sub-kronis dengan substansi ini, yang mungkin berkenaan dengan perlindungan terhadap stress oksidatif. (Das, 2012).

Quercetin sebagai antioksidan meningkatkan beberapa fungsi imunitas saat ditambahkan pada sel imun *in vitro* atau saat diberikan sebagai suplemen untuk manusia atau hewan *in vivo*. Salah satu mekanisme potensial adalah efek antioksidan pada produksi molekul imunoregulator seperti sitokin. Sitokin, seperti interleukin-1 (IL-1), *Tumor Necrosis Factor* (TNF), *Transforming Growth Factor- $\alpha$*  (TGF- $\alpha$ ), dan IL-6, menjadi terdorong untuk merespon bakteri patogen, serta memediasi dan menghambat luka pada sel dan memperbaikinya (Liu *et al*, 2005).

Dengan demikian, pemberian ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) yang mengandung antioksidan senyawa polifenolat golongan flavonoid (*quercetin* dan *kaempferol*) dalam jumlah cukup tertentu, diharapkan dapat meningkatkan respon IL-6 terhadap luka pada sel, sehingga ekspresinya kemudian menurun, dan proses inflamasi maupun karsinogenesis akan terhenti.

Penelitian mengenai ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) yang menurunkan ekspresi IL-6 jaringan hepar tikus wistar (*Rattus norvegicus*) dengan induksi DMBA telah dilakukan. Penelitian ini bersifat eksperimental dimana terdapat 5 perlakuan. Hasil pengukuran terhadap rata-rata ekspresi IL-6 pada kelima kelompok perlakuan menunjukkan bahwa jmlah rata-rata ekspresi IL-6 pada kelompok II (kontrol positif) lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok I (kontrol negatif). Peningkatan ekspresi rata-rata IL-6 disebabkan karena pemberian diet DMBA akan menyebabkan inflamasi yang kemudian meningkatkan radikal bebas dan teraktivasinya makrofag dan mediator inflamasi. Sedangkan pada kelompok III (45 hari diet normal + DMBA + 20 mg/kgBB/hr kelor) didapatkan ekspresi rata-rata IL-6 yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol positifnya. Ekspresi rata-rata IL-6 ini semakin menurun pada kelompok IV (45 hari diet normal + DMBA + 40 mg/kgBB/hr kelor) dan V (45 hari diet normal + DMBA + 80 mg/kgBB/hr kelor), dimana ekspresi rata-rata IL-6 terendah pada kelompok V. Maka dari penelitian ini didapatkan bahwa ekstrak metanol daun kelor dapat menurunkan ekspresi rata-rata IL-6 hepar tikus wistar (*Rattus norvegicus*) diet DMBA dengan dosis efektif 80 mg/kgBB/hr. Dosis ini dapat dipertimbangkan untuk dikonversikan dengan rumus translasi dosis berdasarkan BSA (*Body Surface Area*) untuk mengkonversi dosis obat antar spesies, dalam hal ini untuk kegunaannya bagi manusia.

Dari penelitian ini didapatkan bahwa pemberian ekstrak metanol daun kelor dapat menurunkan ekspresi IL-6 jaringan hepar tikus wistar yang diinduksi DMBA secara signifikan. Namun, dalam penelitian ini belum dapat diketahui dosis optimal, yang bila ditingkatkan tidak memberi efek yang lebih baik atau memberi efek

samping, seperti aktivitas caspase 9 yang berlebihan. Juga belum diketahui rumus yang tepat untuk mengkonversi dosis obat dari tikus wistar ke manusia.



## BAB VII

### PENUTUP

#### 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan ekspresi IL-6 jaringan hepar tikus wistar (*Rattus norvegicus*) model karsinoma hepatoseluler dengan induksi DMBA (7,12-dimethylbenz (a) anthracene)
2. Dosis efektif ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dalam menurunkan ekspresi IL-6 jaringan hepar tikus wistar (*Rattus norvegicus*) model karsinoma hepatoseluler dengan induksi DMBA (7,12-dimethylbenz (a) anthracene) adalah 80 mg/kgBB/hr/hari.

#### 7.2 Saran

Dari penelitian ini, saran yang dapat diajukan adalah:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis optimum dari pemberian kelor.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui konversi dosis pemberian kelor dari tikus wistar ke manusia

## DAFTAR PUSTAKA

- Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G.. 2006. Inflammation and cancer: How hot is the link? in Aggarwal BB (Ed), *Biochemical Pharmacology* 72, Elsevier, Singapore, p.1605-1621.
- Agustini N, Panjaitan T. 2011. Produksi Biomas Kelor (Moringa Oleifera) di Lahan Kering, Beriklim Kering, *Badan Litbang Pertanian Nusa Tenggara Barat*, 14 Maret 2011.
- American Cancer Society. 2011. *Liver Cancer*.s, n.p.
- Bagchi,K., Puri,S. Free Radicals and Antioxidants in Health and Disease. *Eastern Mediterranean Health Journal*. 1998; 4 (2): 350-360.
- Bennett R.N, Mellon FA, Foidl N, Pratt JH, Dupont MS, *et al*. Profiling Glucosinolates and Phenolics in Vegetative and Reproductive Tissues of The Multi – purpose Trees Moringa oleifera L. (Horseradish Tree) and Moringa Stenopetala L. *Publication of Medicine*, 2003; 51(12): 3546-53.
- Bey H.H. 2010. *All Things Moringa*, USA, p.10-12
- Bose C. Moringa oleifera: Medicinal and Socio-Economic Uses. *Medscape General Medicine*, 2007; 9 (1): 26.
- Campden and Chorleywood Food Research Association. 1998. *Analysis of Leaf Powder for Nutritional Composition*. University of Leicester and Church World Service, affiliate of the National Council of Churches.

- Chen ZN. 2011. Links between Liver Inflammation and Hepatocellular Carcinoma: Mechanism and Therapies in He YW, Zhang J (Eds). *Hindawi Publishing Corporation*.
- Das N, Sikder K, Ghosh S, Fromenty B, Dey S. 2012. Moringa oleifera Lam. Leaf Extract Prevents Early Liver Injury and Restores Antioxidant Status in Mice Fed with High-Fat Diet. *Indian Journal of Experimental Biology*.
- Dolcas Biotech. 2008. *Moringa oleifera*. New Jersey, p.1.
- El-Serag H.B. Current Concepts: Hepatocellular Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 2011;365:1118-27.
- Erhart, et al. Flavone initiates a hierarchical activation of the caspase-cascade in colon cancer cells. *Department of Food and Nutrition, Molecular Nutrition Unit*, 2005; 10:611-617.
- Fahey. Moringa oleifera: A Review of the Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophylactic Properties. Part 1, 2005; 1 (12).
- Farooq F, Rai M, Tiwari A, Khan A.A, Farooq S. 2012. Medicinal properties of Moringa oleifera: An overview of promising healer. *Journal of Medicinal Plants research*.
- Fauzi I.A, Amalia F, Sabila N, Hermawan A, Ikawati M, Meiyanto E. 2011. Aktivitas Antiproliferasi Ekstrak Etanolik Herba Ciplukan (*Physalis angulata* L.) Terhadap Sel Hepar Tikus Betina Galur Sprague Dawley Terinduksi 7,12-Dimetilbenz[a]antrasena. *Majalah Kesehatan PharmaMedika*.
- Foild N. 2001. The Potential of Moringa oleifera for agricultural and industrial uses, *What development potential for Moringa products?*, hal. 1-2.

Fred Hutchinson Cancer Research Center. 2006. *Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics*. Nature Publishing group, Washington, USA, p.130-140.

Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida Y, Yu G.Y, *et al.* 2009. IL-6 and Stat3 Are Required for Survival of Intestinal Epithelial Cells and Development of Colitis-Associated Cancer. *Cancer Cell Article*, 2009; 3 (2): 103-104

Hamid I.S, Sugiyanto, Meiyanto E, Widyarini S. 2009. Ekspresi CYP1A1 dan GSTm hepatosit terinduksi 7,12-dimetilbenz(a)antrasena dan pengaruh pemberian ekstrak etanolik *Gynura procumbens*, *Majalah Farmasi Indonesia*, 20(4):198-206.

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

Indra MR, Hernowati TE, Satuman. Pengaruh Ekstrak Daun Kelor (*Moringa Oleifera*) Terhadap Efek Karsinogenik Polutan 7,12 Dimethyl Benz(A)Nthracene (Dmba) Pada Tikus Wistar Melalui Penghambatan Aktifitas Telomerase Dan Induksi Apoptosis, 2011.

Integrated Taxonomic Information System, 2000. *Integrated Taxonomic Information System*. Caribbean, North America, n.p.

Kaler P, Augenlicht L, Klampfer L. Macrophage-derived IL-1 $\beta$  stimulates Wnt signaling and growth of colon cancer cells; a crosstalk interrupted by vitamin D3, 2009; 5 (11): 3892-3902.

Karin M. NF - $\kappa$ B as a Critical Link Between Inflammation and Cancer. *Cold Spring Harbor Perspective in Biology*, 2009; 188:3160-3168

Khalafalla MM, Abdellatef E, Dafalla HM, Nasrallah AA, Aboul-Enein KM, Lightfoot FA, *et al.* Active principle from *Moringa oleifera* Lam leaves effective against two leukemias and a hepatocarcinoma. 2010; 9(49), pp. 8467-8471.

Kim, Lee EK, Kim DH, Yu BP, Chung HY. 2010. *Kaempferol Modulates Pro-inflammatory NF-kappaB Activation by Suppressing Advanced Glycation Endproducts-Induced NADPH Oxidase.*

Knolle PA, Löser E, Protzer U, Duchmann R, Schmitt E, Buschenfelde KHRZ, *et al.* Regulation of endotoxin-induced IL-6 production in Liver Sinusoidal Endothelial Cell and Kupffer Cell by IL-10, *Clin Exp Immunol*, 1997; 107: 555-561.

Lamerz R, Hayes P, Hoffman RT, Lohe F, Shiratori Y, Taketa K. National Academy of Clinical Biochemistry Guidelines for the Use of Tumor Markers in Primary Liver Cancer, NACB: Practice Guidelines And Recommendations For Use Of Tumor Markers In The Clinic *Liver Cancer (Section 3D).*

Lee LL, Lee JSC, Waldman SD, Casper RF, Grynpas MD. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Present in Cigarette Smoke Cause Bone Loss in an Ovariectomized Rat Model. 2002; 30: 917-923.

Lee S, Shin S, Kim H, Han S, Kim K, Kwon J, *et al.* 2011. Anti-inflammatory function of arctiin by inhibiting COX-2 expression via NF-kB pathways. (Abstract). *Journal of Inflammation*, 202:13-23.

Liu J, Liu X, Yue Y, Li J, He T, He Y. 2005. The Inhibitory Effect of Quercetin on IL-6 Production by LPS Stimulated Neutrophils. *Laboratory of Molecular Biology, Luzhou Medical College, Sichuan, China.*

Loyer P. 2011. Regulation of the Hepatocyte Cell Cycle: Signaling Pathways and Protein Kinases in Corlu A, Albrecht J.H, Desdouet C (Eds), *Hindawi Publishing Corporation*.

Lukitaningsih E, Noegrohati S. 2004. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon. Department of The Environment, Water, Heritage and Arts Australia*.

Mahajan SG, Mali RG, Mehta AA, 2007. Effect of *Moringa oleifera* Lam. Seed Extract on Toluene Diisocyanate-Induced Immune-Mediated Inflammatory Responses in Rats,.

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

Middleton E, Kandaswami C, Theoharides T.C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacological reviews*, 2000; 52 (4): 673-751.

Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim KH, Karin M, *et al*. Gender Disparity in Liver Cancer Due to Sex Differences in MyD88-Dependent IL-6 Production. 2007; 121 (2007): 1140485.

Paiva S.A.R, Russell R.M. β-Carotene and Other Carotenoids as Antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, 1999; 18 (5): 426-433.

Parvathy,M., Umamaheswari,A., 2007. *Cytotoxic Effect of Moringa oleifera Leaf Extracts on Human Multiple Myeloma Cell Lines*.

Priyadarsini RV, Nagini S. 2012. Quercetin suppresses cytochrome P450 mediated ROS generation and NFκB activation to inhibit the development of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) induced hamster buccal pouch carcinomas. *Free Radic Res.* 2012 Jan;46(1):41-9.

Rakesh S, Singh V.J. 2011. Anti-Inflammatory Activity of *Moringa Oleifera* Leaf and Pod Extracts Against Carrageenin Induced Paw Edema In Albino Mice. *Department of Pharmacology B.N College of Pharmacy.*

Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. 2007. Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB Journal.*

Sagar dan Wong. The Scientific Basis of Chinese Medicine and Cancer Care: A Western Medicine Perspective. *Alternative Treatment for Cancer*, 2001: 20-21.

Setiawan D. 2008. *Tanaman kelor*. Tugas akhir. Tidak diterbitkan, Universitas Muhammadiyah, Semarang.

Stuart KE, 2011. Liver Cancer At a Glance.

The Cancer Council. 2007. *Understanding Liver Cancer*. New South Wales, p.8-9.

Therik J.W.D, dkk. 2009. Pemanfaatan *Moringa oleifera* Varietas Lokal Dalam Upaya Peningkatan Status Gizi Balita Anak Usia Sekolah dan Ibu Hamil, *Harian Pagi Timor Express*, 10 Maret 2009.

Thorgeirsson dan Grisham. Molecular Pathogenesis of Human Hepatocellular Carcinoma. *Nature Publishing group*, 2002; 31: 339-346.

USU, 2010. Karakteristik penderita kanker hati rawat inap di RS Santa Elisabeth Medan tahun 2005-2009.

Valko M, Rhodes C.J, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological interaction, Science direct, Elsevier.*

Waji,R., Sugrani, A. 2009. *Flavonoid (quercetin).*

Wargovich MJ, Woods C, Hollis DM, Zander ME. Herbs, Cancer Prevention and Health. 2001; 131: 3034S–3036S.

Widyastuti N. 2009. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Dengan Metode CUPRAC, DPPH, dan FRAP serta Korelasinya dengan Fenol dan Flavonoid Pada Enam Tanaman. Skripsi. Tidak diterbitkan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.



**PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Alicia Yolandra

NIM : 0910710031

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, Februari 2013

Yang membuat pernyataan,

Alicia Yolandra

NIM. 0910710031

Lampiran 1: Uji non-parametrik *Kruskal Wallis*

**Ranks**

penelitian	N	Mean Rank
hasil kontrol negatif	4	5.75
kontrol positif	4	18.00
Pemberian Kelor 20mg	4	15.00
Pemberian kelor 40mg	4	8.50
Pemberian kelor 80mg	4	5.25
Total	20	

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	hasil
Chi-Square	14.929
df	4
Asymp. Sig.	.005

a. Kruskal Wallis Test  
 b. Grouping Variable:  
 penelitian



Lampiran 2: Uji post-hoc *Mann-Whitney test*  
Kelompok 1 & 2

**Ranks**

penelitian		N	Mean Rank	Sum of Ranks
hasil	kontrol negatif	4	2.50	10.00
	kontrol positif	4	6.50	26.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	hasil
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: penelitian

Kelompok 1 & 3

**Ranks**

penelitian		N	Mean Rank	Sum of Ranks
hasil	kontrol negatif	4	2.50	10.00
	Pemberian Kelor 20mg	4	6.50	26.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	hasil
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: penelitian

Kelompok 1 & 4

**Ranks**

penelitian		N	Mean Rank	Sum of Ranks
hasil	kontrol negatif	4	3.50	14.00
	Pemberian kelor 40mg	4	5.50	22.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	hasil
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	14.000
Z	-1.155
Asymp. Sig. (2-tailed)	.248
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.343 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: penelitian

Kelompok 1 & 5

**Ranks**

penelitian		N	Mean Rank	Sum of Ranks
hasil	kontrol negatif	4	4.75	19.00
	Pemberian kelor 80mg	4	4.25	17.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	hasil
Mann-Whitney U	7.000
Wilcoxon W	17.000
Z	-.289
Asymp. Sig. (2-tailed)	.773
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.886 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: penelitian

Kelompok 2 & 3

**Ranks**

penelitian	N	Mean Rank	Sum of Ranks
hasil kontrol positif	4	6.00	24.00
Pemberian Kelor 20mg	4	3.00	12.00
Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	hasil
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	12.000
Z	-1.732
Asymp. Sig. (2-tailed)	.083
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.114 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: penelitian

Kelompok 2 & 4

**Ranks**

penelitian	N	Mean Rank	Sum of Ranks
hasil kontrol positif	4	6.50	26.00
Pemberian kelor 40mg	4	2.50	10.00
Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	hasil
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: penelitian

Kelompok 2 & 5

**Ranks**

penelitian	N	Mean Rank	Sum of Ranks
hasil kontrol positif	4	6.50	26.00
Pemberian kelor 80mg	4	2.50	10.00
Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	hasil
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: penelitian

Kelompok 3 & 4

**Ranks**

penelitian	N	Mean Rank	Sum of Ranks
hasil Pemberian Kelor 20mg	4	6.50	26.00
Pemberian kelor 40mg	4	2.50	10.00
Total	8		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	hasil
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: penelitian

Kelompok 3 & 5

**Ranks**

penelitian	N	Mean Rank	Sum of Ranks
hasil Pemberian Kelor 20mg	4	6.50	26.00
Pemberian kelor 80mg	4	2.50	10.00
Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	hasil
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: penelitian

Kelompok 4 & 5

**Ranks**

penelitian	N	Mean Rank	Sum of Ranks
hasil Pemberian kelor 40mg	4	5.50	22.00
Pemberian kelor 80mg	4	3.50	14.00
Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	hasil
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	14.000
Z	-1.155
Asymp. Sig. (2-tailed)	.248
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.343 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: penelitian