

**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK METHANOL DAUN KELOR (*Moringa oleifera*)
TERHADAP KADAR CASPASE-3 JARINGAN HEPAR PADA PROSES
KARSINOGENESIS TIKUS MODEL KANKER HEPAR YANG DIINDUKSI
DMBA (7,12 dimethylbenz(α)anthracene)**

TUGAS AKHIR

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



Oleh :

LILYCIA ELISABETH L.
0910710090

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013**

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

EFEK PEMBERIAN EKSTRAK METHANOL DAUN KELOR (*Moringa oleifera*)
TERHADAP KADAR CASPASE-3 JARINGAN HEPAR PADA PROSES
KARSINOGENESIS TIKUS MODEL KANKER HEPAR YANG DIINDUKSI
DMBA (7,12 dimethylbenz(a)anthracene)

Oleh :
Lilycia Elisabeth L.
NIM: 0910710090

Telah diuji pada

Hari : Senin
Tanggal : 11 Februari 2013

Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I

Dr. dr. Retty Ratnawati, MSc
NIP. 19550201 198503 2 001

Penguji II/Pembimbing I

Penguji III/Pembimbing II

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

Dr. dr. I Ketut Gede Muliarta, SpPA
NIK. 090347226

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kedokteran

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

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yesus Kristus atas segala kasih karunia dan berkat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul "Efek Pemberian Ekstrak Methanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Terhadap Kadar Caspase-3 Jaringan Hepar pada Proses Karsinogenesis Tikus Model Kanker Hepar yang Diinduksi DMBA (7,12 dimethylbenz(α)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. dr. Karyono Mintaroem, SpPA selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS selaku dosen pembimbing pertama atas segala kebaikan, kesabaran, saran, dan ketelitiannya agar terselesainya tugas akhir ini.
3. Dr. dr. I Ketut Gede Muliarta, SpPA selaku dosen pembimbing kedua atas kebaikan, saran, dan dukungan yang bermanfaat bagi terselesainya tugas akhir ini.
4. Dr. dr. Retty Ratnawati, MSc selaku penguji tugas akhir atas ketelitiannya dan masukan-masukan yang sangat membangun sehingga tugas akhir ini dapat terselesaikan dengan baik.
5. Segenap Anggota Tim Pengelola Tugas Akhir Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

6. Segenap Staf Laboratorium Fisiologi Kedokteran, terutama Mas Harris, Mbak Umi, Pak Satuman, Mbak Kiky, Mas Didin, dan Mas Budi, untuk segala bantuan yang sangat berharga dalam proses pembuatan tugas akhir ini.
7. Rekan sepenelitian Kelor yaitu, Heidi, Hilda, Katarina, Hendra, Mucus, Radhit, Ayaz, Yolan, Firdah, Anis, Aan, Riza, Ivan, dan Mayya untuk kerja sama yang telah terjalin selama masa penelitian dan proses pembuatan tugas akhir ini.
8. Papa, mama, serta kedua adik penulis, Sahala dan Sony, yang telah mendukung penulis baik dalam kasih, doa, dan dukungan yang luar biasa.
9. Agustinus Sunarya Adi Sumarta, untuk semua kasih, dukungan, semangat, dan doa yang selalu mengalir untuk penulis.
10. Teman-teman PD 2009, terutama Eillen, Andriana, Oca, Nying-nying, Ditaris, Erlangga, Benny, dan lain-lain yang membantu dan memberi semangat hingga terselesainya tugas akhir ini.
11. Kepada semua pihak yang telah membantu penyelesaian tugas akhir ini baik secara langsung maupun tidak langsung.

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

Malang, 12 Februari 2013

Penulis

ABSTRAK

L, Lilycia, Elisabeth. 2013. **Efek Pemberian Ekstrak Methanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Terhadap Kadar Caspase-3 Jaringan Hepar pada Proses Karsinogenesis Tikus Model Kanker Hepar yang Diinduksi DMBA (7,12 Dimethylbenz(a)anthracene)**. Tugas Akhir, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS. (2) Dr. dr. I Ketut Gede Muliarta, SpPA

Caspase-3 adalah protein yang berperan sangat penting dalam proses terjadinya apoptosis. Caspase-3 berperan sebagai eksekutor apoptosis. Pada kanker, proses apoptosis akan tertekan. Ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) mengandung flavonoid, yaitu quercetin dan kaempferol, yang berperan sebagai antioksidan yang diharapkan dapat meningkatkan apoptosis untuk menurunkan progresivitas kanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap kadar caspase-3 jaringan hepar pada tikus wistar yang diinduksi DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene). Penelitian ini menggunakan studi eksperimental yang dilakukan pada 30 ekor tikus wistar jantan yang dibagi secara random menjadi 5 kelompok. Pada kelompok I, tikus diberi diet normal saja (kontrol negatif) selama 104 hari, kelompok II (kontrol positif) tikus diberi diet normal dan DMBA 10 mg/hari selama 44 hari, sedangkan kelompok III-V diberi diet normal, DMBA selama 44 hari, dan ekstrak methanol daun kelor selama 60 hari dengan dosis berbeda yaitu 20, 40, dan 80 mg/ml secara per oral dengan sonde setiap hari sekali. Parameter yang diukur adalah kadar caspase-3. Pengukuran kadar caspase-3 jaringan hepar pada penelitian ini dilakukan dengan metode ELISA. Analisis data menggunakan metode *One Way ANOVA* dilanjutkan uji *Least Significant Difference (LSD) test*, menunjukkan bahwa pemberian ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) berpengaruh terhadap kadar caspase-3 secara signifikan ($p < 0,05$). Kesimpulan penelitian ini adalah pemberian ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) mampu meningkatkan kadar caspase-3 jaringan hepar tikus wistar yang diinduksi DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene) dengan dosis respon 80 mg/ml.

Kata kunci: ekstrak methanol daun kelor, caspase-3, DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene)

ABSTRACT

L, Lilycia, Elisabeth. 2013. **The Effect of *Moringa oleifera* Leaves (Kelor Leaves) Methanol Extract to Caspase-3 Liver Tissue Level in Carcinogenesis Rat Liver Cancer Models Induced with DMBA (7,12-dimethylbenz(α)anthracene).** Final Assignment, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS. (2) Dr. dr. I Ketut Gede Muliarta, SpPA

Caspase-3 is a protein that plays an important role in the process of apoptosis. Caspase-3 has a role as executor of apoptosis. Process of apoptosis will be suppressed in cancer. Methanol extract of *Moringa oleifera* leaves (Kelor Leaves) contains flavonoid (quercetin dan kaempferol), that have role as antioxidant, are expected to increase apoptosis and inhibit cancer progression. The objective of this research is understanding the administration effect of *Moringa oleifera* leaves (Kelor Leaves) methanol extract to caspase-3 level in the wistar rat liver tissue induced with DMBA (7,12-dimethylbenz(α)anthracene). This study used true experimental design in 30 wistar rats male divided randomly into 5 groups. Group I contained rats given only normal diet (negative control) for 104 days, group II (positive control) was rats given normal diet and DMBA 10 mg/day for 44 days, while group III until V were given a normal diet, DMBA 10 mg/day for 44 days, and later given methanol extract of *Moringa oleifera* leaves with different doses (20, 40, 80 mg/ml) for 60 days orally with sonde, once a day. Parameter calculation in this research is the level of caspase-3. The measurement of caspase-3 liver tissue level in this study was conducted by using ELISA method. The data analysis done by the method of one-way ANOVA followed *Least Significant Difference (LSD) test*, showed that administration of *Moringa oleifera* leaves methanol extract increased the level of caspase-3 significantly ($p < 0,05$). The conclusion of this study is methanol extract of *Moringa oleifera* leaves is able to increased the level of caspase-3 in wistar rat liver tissue induced DMBA (7,12-dimethylbenz(α)anthracene) at 80 mg/ml respon dose of *Moringa oleifera* leaves methanol extract.

Key words: methanol extract of *Moringa oleifera* leaves, caspase-3, DMBA (7,12-dimethylbenz(α)anthracene).

DAFTAR ISI

	Halaman
Judul.....	i
Halaman Pengesahan	ii
Kata Pengantar	iii
Abstrak	v
Abstract	vi
Daftar Isi	vii
Daftar Tabel.....	xi
Daftar Gambar.....	xii
Daftar Lampiran.....	xiii
Daftar Singkatan.....	xiv
 BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Manfaat Teoritis	5
1.4.2 Manfaat Praktis.....	5
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Kanker Hepar.....	6
2.1.1 Definisi Kanker dan Kanker Hepar	6

2.1.2 Faktor Risiko.....	6
2.1.3 Diagnosis dan Pencegahan.....	10
2.1.4 Patogenesis Kanker Hepar.....	12
2.1.5 Tahapan Kanker Hepar	16
2.1.6 Terapi.....	18
2.2 <i>Moringa oleifera</i>	19
2.2.1 Taksonomi	20
2.2.2 Morfologi dan Karakteristik	20
2.2.3.....	Manfaat
	21
2.2.4 Kandungan <i>Moringa oleifera</i>	22
2.2.5 Antioksidan.....	24
2.3 DMBA	26
2.4 Apoptosis.....	28
2.4.1 Jalur Ekstrinsik.....	29
2.4.2 Jalur Intrinsik.....	30
2.4.3 Jalur Perforin atau Granzym	32
2.5 Caspase	33
2.5.1 Caspase-3.....	33
2.6 Hubungan antara <i>Moringa oleifera</i> , Kanker Hepar, dan Caspase-3.....	34

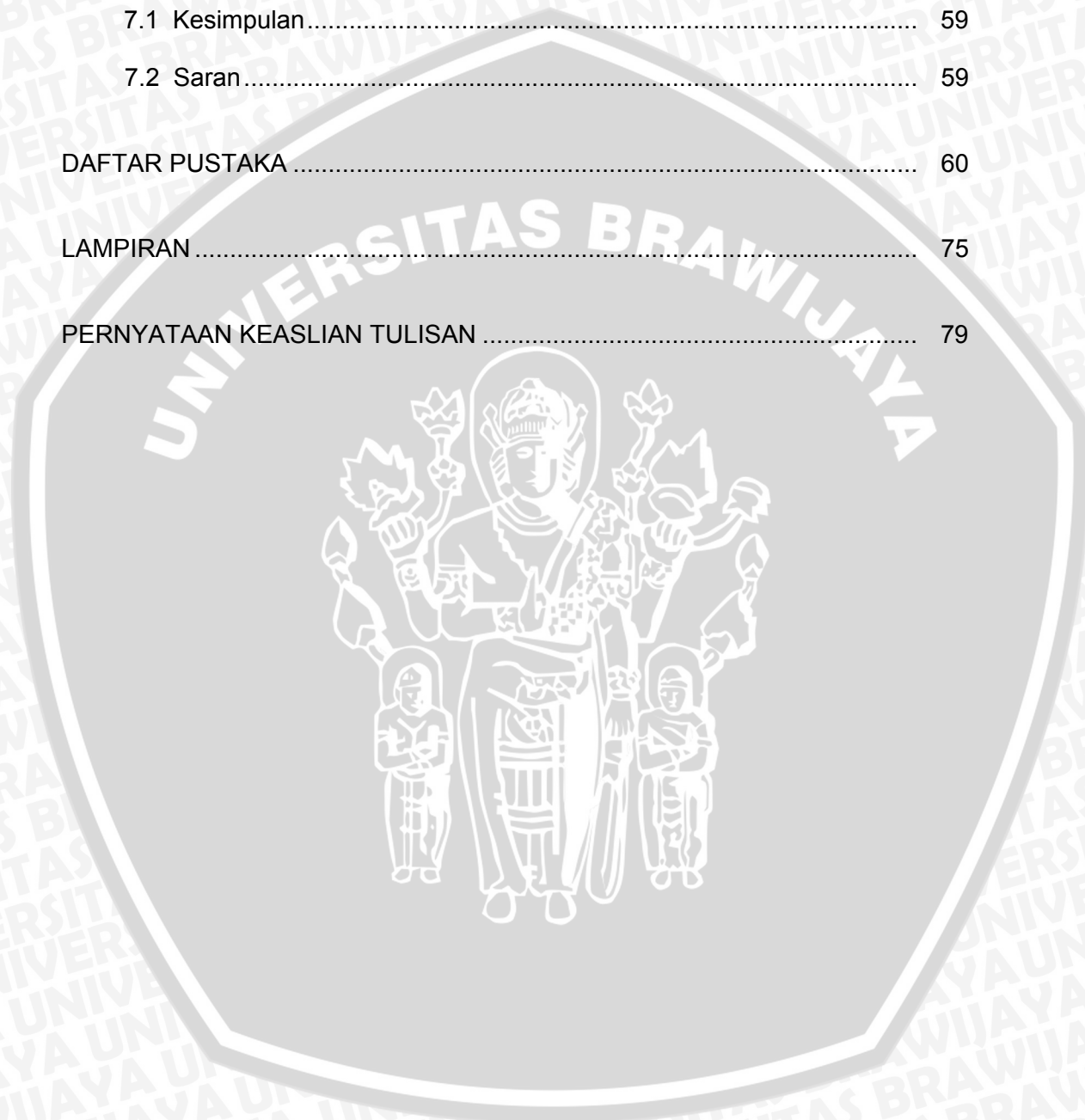
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep	35
3.2 Penjelasan Kerangka Konsep	36
3.3 Hipotesis Penelitian	37

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian	49
5.2 Analisis Data.....	51

BAB 6 PEMBAHASAN	54
BAB 7 PENUTUP	
7.1 Kesimpulan.....	59
7.2 Saran.....	59
DAFTAR PUSTAKA	60
LAMPIRAN	75
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	79



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Hierarki Taksonomi <i>Moringa oleifera</i>	20
Tabel 2.2 Hasil Pemeriksaan Kandungan Zat Gizi Kelor per 100 gram	23
Tabel 2.3 Kandungan Phytokimia Daun Kelor	24
Tabel 2.4 Anggota Pro- dan Anti-Apoptotic Protein BCL-2 Superfamily	32
Tabel 5.1 Data Hasil Pengukuran Kadar Caspase-3 Jaringan Hepar	50



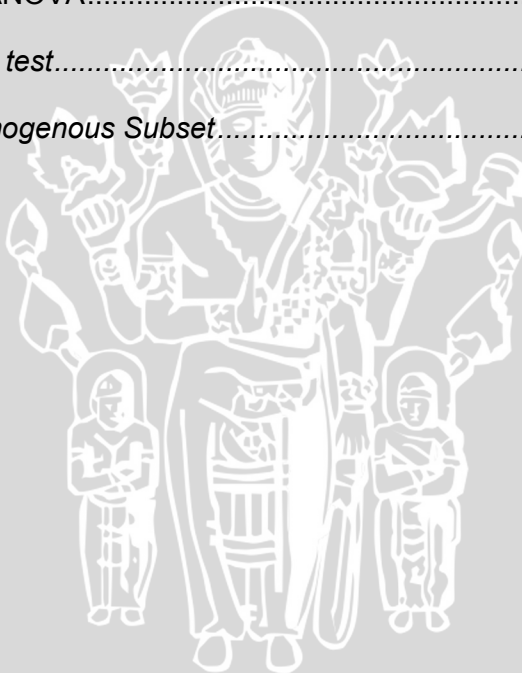
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Kontribusi Genetik, Epigenetik, dan Genomik pada HCC	13
Gambar 2.2 Kronologi Susunan Lesi Sel pada Perkembangan HCC	14
Gambar 2.3 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)	27
Gambar 2.4 Skema Mekanisme Apoptosis	29
Gambar 3.1 Kerangka Konsep	35
Gambar 4.1 Alur Penelitian	44
Gambar 5.1 Grafik Hubungan Antara Kelompok Perlakuan dan Kadar Caspase-3 Jaringan Hepar	50



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Diagram Alur Pembuatan Pakan Normal	75
Lampiran 2 Tabel <i>Test of Normality</i> (Uji Normalitas Data)	76
Lampiran 3 Tabel <i>Groups Statistic</i>	76
Lampiran 4 Tabel <i>Test of Homogeneity of Variance</i>	76
Lampiran 5 Tabel Uji ANOVA	77
Lampiran 6 Tabel <i>LSD test</i>	77
Lampiran 7 Tabel <i>Homogenous Subset</i>	78



DAFTAR SINGKATAN

AFP	: <i>Alfa-fetoprotein</i>
AIF	: <i>Apoptosis inducing factor</i>
AJCC	: <i>American Joint Committee on Cancer</i>
Anova	: <i>Analysis of Variance</i>
Apaf-1	: <i>Apoptotic protease activating factor-1</i>
Apaf-1	: <i>Apoptotic protease activating factor-1</i>
APC	: <i>Anaphase Promoting Complex</i>
Apo2L/DR4	: <i>Apoptosis antigen-2 Ligand/Death Receptor 4</i>
Apo2L/DR5	: <i>Apoptosis antigen-2 Ligand/Death Receptor 5</i>
Apo3L/DR3	: <i>Apoptosis antigen-3 Ligand/Death Receptor 3</i>
Bad	: <i>Bcl-2-associated death promoter</i>
Bak	: <i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
Bax	: <i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	: <i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL-2	: <i>B-Cell Lymphoma 2</i>
BCLC	: <i>Barcelona Clinic Liver Cancer</i>
Bcl-x _L	: <i>B-cell lymphoma-extra large</i>
Bik	: <i>Bcl-2 interacting killer-like</i>
Bim	: <i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i>
CAD	: <i>Caspase-Activated DNase</i>
CASP-3	: <i>Caspase-3, Apoptosis-Related Cysteine Peptidase</i>

Caspase	: Cysteine aspartic acid protease
CCL4	: Carbon tetrachloride
CD8	: Cluster of differentiation 8
COX-2	: Cyclooxygenase-2
CT	: Computed Tomography
CTLs	: Cytotoxic T Lymphocytes
DIABLO	: Direct Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP)-Binding Protein with Low PI
DMBA	: 7,12-dimethylbenz(α)anthracene
DNA	: Deoxyribo Nucleic Acid
Dvl	: Phosphorylation of disheveled
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FADD	: Fas-Associated Death Domain
FasL	: Fas ligand
FasR	: Fas receptor
GSK	: Glycogen Synthase Kinase
HBV	: Hepatitis B Virus
HBx	: Hepatitis B Virus X Protein
HCC	: Hepatocellular Carcinoma
HRK	: Harakiri Protein
HtrA2	: High Temperature Requirement Protein A2
HURP	: Hepatoma Upregulated Protein
IAP	: Inhibitor Of Apoptosis Protein
ICAD	: Inhibitor of Caspase Activated DNAase
IGF-2	: Insulin-like Growth Factor-2

LEF	: <i>Lymphoid Enhancing Factor</i>
MPT	: <i>Mitochondrial Permeability Transition</i>
MRI	: <i>Magnetic Resonance Imaging</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor kappa B</i>
NuMA	: <i>Nuclear Mitotic apparatus protein</i>
OD	: <i>optical density</i>
PAH	: <i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbon</i>
PARP	: <i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PUMA	: <i>p53-upregulated modulator of apoptosis</i>
RAL	: <i>Rancangan Acak Lengkap</i>
RAS	: <i>Rat Sarcoma</i>
Rb	: <i>Retinoblastoma</i>
Rb1	: <i>Retinoblastoma 1</i>
RCD	: <i>Randomized Completely Design</i>
Riskesdas	: <i>Riset Kesehatan Dasar</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RS	: <i>Rumah Sakit</i>
Smac	: <i>Second Mitochondria derived Activator of Caspase</i>
Tcf-4	: <i>Transcription Factor 4</i>
TGF	: <i>Transforming Growth Factor</i>
TGF- α	: <i>Transforming Growth Factor-Alpha</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNFR	: <i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-Alpha</i>
TNM	: <i>Tumor, Nodes, Metastasized</i>

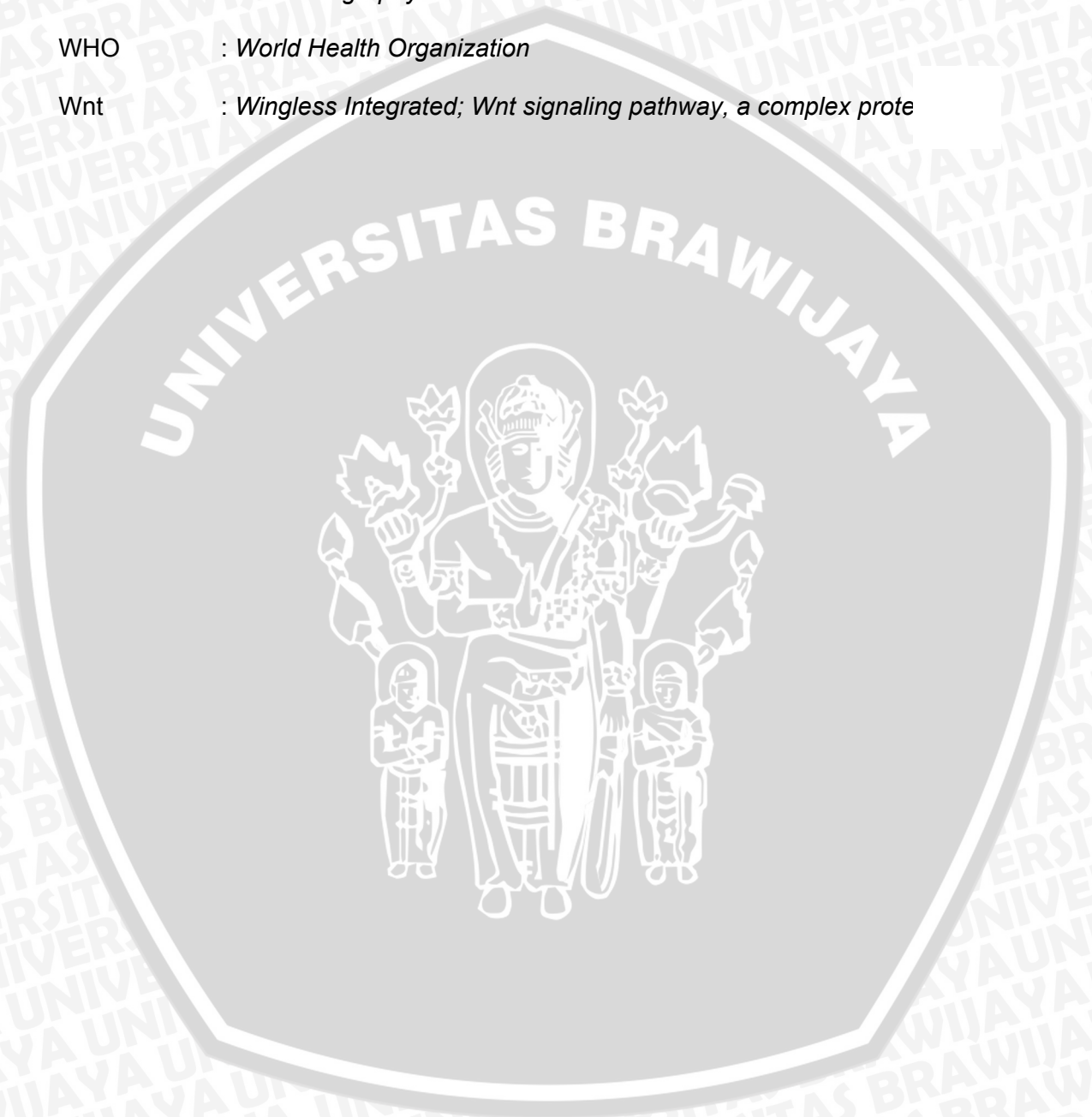
TRADD : (TNFR)1–Associated Death Domain

TRAIL : TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand

USG : Ultrasonography

WHO : World Health Organization

Wnt : Wingless Integrated; Wnt signaling pathway, a complex prote



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Kanker merupakan salah satu penyebab utama kematian di dunia. Berdasarkan data International Agency for Research on Cancer-WHO, kanker menyebabkan 7,6 juta kematian atau sekitar 13% dari total kematian di dunia pada tahun 2008. Lima rangking teratas kanker yang menyebabkan kematian adalah kanker paru, kanker perut, kanker hepar, kanker kolon, dan kanker payudara. Sekitar 30% penyebab kanker yang mematikan adalah karena gaya hidup dan pola makan yang tidak sehat, berat badan yang tidak seimbang, rendahnya konsumsi sayur dan buah, merokok, dan konsumsi alkohol (WHO, 2011). Kanker hepar menyebabkan sekitar 700.000 kematian di dunia dengan *incidence rate* 10,8 dan *mortality rate* 9,9 per 100.000 penduduk (Globocan, 2008).

Riset Kesehatan Dasar tahun 2007 menunjukkan prevalensi tumor/kanker di Indonesia adalah 4,3 per 1000 penduduk. Prevalensi tumor/kanker lebih tinggi pada perempuan (5,7 per 1000 penduduk) dibandingkan laki-laki (2,9 per 1000 penduduk). Sistem Informasi Rumah Sakit (RS) tahun 2008 menunjukkan kanker payudara (18,4%) menempati urutan pertama pada pasien rawat inap di seluruh RS di Indonesia, disusul kanker serviks (10,3%), kanker hepar dan saluran empedu intrahepatik (8,2%), leukemia (7,3%), dan Limfoma non Hodgkin (6,5%). Insiden kanker hepar (hepatoseluler karsinoma) di Asia Tenggara relatif tinggi

pada laki-laki (18,35 per 100.000 penduduk) daripada wanita (5,70 per 100.000 penduduk) (Poedjomartono dan Sudarmanto, 2009). Data Riskesdas 2007 juga menyebutkan, pada golongan umur 15-44 tahun penyakit hati menduduki urutan pertama sebagai penyebab kematiandi pedesaan, sedangkan di daerah perkotaan menduduki urutan ketiga.

Kanker terjadi karena adanya perubahan pada sel normal menjadi sel tumor yang cenderung membelah secara terus-menerus, tidak terkendali, dan tidak terkoordinasi dengan jaringan normal di sekitarnya. Kanker terjadi karena adanya ketidakseimbangan antara proliferasi dan apoptosis (Bree *et al.*, 2002). Proliferasi merupakan pertumbuhan sel yang adalah proses fisiologi normal, namun proliferasi yang cepat dan tidak terkontrol dapat menyebabkan tumor jinak atau ganas (kanker). Apoptosis merupakan cara kematian sel yang terprogram. Apoptosis terjadi jika terdapat sel yang menjadi ancaman atau sel tersebut tidak dibutuhkan lagi (Guyton and Hall, 2006). Apoptosis terjadi lewat dua jalur, yaitu intrinsik dan ekstrinsik (Fulda *et al.*, 2006; Ghobrial *et al.*, 2005; Rowinsky, 2005). Jalur intrinsik dicetuskan oleh sel yang mengalami kerusakan DNA. Jalur ekstrinsik diaktivasi saat pro-apoptosis ligan berikatan dengan reseptor kematian (*death receptor*). *Cysteine aspartic acid protease* (caspase) merupakan enzim protease intraseluler yang dapat berperan dalam kedua jalur apoptosis tersebut. Salah satu enzim yang berperan adalah caspase-3. Caspase-3 merupakan kelompok enzim eksekutor dari caspase yang langsung berperan sebagai eksekutor apoptosis (*death cascade*).

Faktor risiko yang sangat berpengaruh pada kanker hepar adalah infeksi virus hepatitis dan gaya hidup serta pola makan yang tidak sehat. Gaya hidup dan pola makan yang tidak sehat menyebabkan banyak zat kimia asing yang

masuk ke dalam tubuh. Zat kimia asing ini akan dimetabolisme di dalam hepar, karena salah satu fungsi utama hepar adalah sebagai sistem pertahanan terhadap zat kimia asing yang bersifat toksik atau racun (detoksifikasi). Senyawa 7,12-dimetilbenz (α) antrasen (DMBA) merupakan salah satu polutan yang merupakan produk degradasi dari *polycyclic aromatic hydrocarbons* (PAH). PAH merupakan kelompok polutan organik yang dikeluarkan dalam jumlah banyak ke dalam lingkungan. DMBA ini bersifat karsinogenik, sitotoksik, mutagenik, dan menekan sistem imun (Smith *et al.*, 1999; Spitsbergen *et al.*, 2000; Miyata *et al.*, 2001; Wijnhoven *et al.*, 2001; Lindhe *et al.*, 2002; Buters *et al.*, 2003). DMBA biasanya dihasilkan dari pembakaran atau pemasakan yang tidak sempurna dengan suhu tinggi. Salah satu contohnya adalah sate atau ikan dan daging bakar. DMBA yang masuk ke dalam tubuh akan berusaha didetoksifikasi oleh hepar. Kanker hepar diduga terjadi karena berkaitan dengan fungsi hepar untuk detoksifikasi sehingga bisa menyebabkan *chemical injury* di hepar sehingga menginduksi DNA menjadi rusak. DNA yang rusak ini dapat menginduksi terjadinya mutasi atau translokasi sel yang dapat menyebabkan transformasi neoplastik. Hal inilah yang memicu terjadinya kanker (Kumar *et al.*, 2003).

Terapi kanker hepar yang ada saat ini bisa dibagi jadi empat kategori intervensi, yaitu intervensi operasi (reseksi tumor dan transplantasi hepar), intervensi perkutaneus (injeksi ethanol, ablasi dengan panas radiofrekuensi), intervensi trans-arterial (embolisasi atau kemoperfusi), dan intervensi obat-obatan termasuk terapi imun dan gen (Blum, 2005). Hingga saat ini terapi yang menjanjikan untuk dapat memberi respon optimal dan meningkatkan kelangsungan hidup adalah reseksi tumor, tansplantasi hepar, dan intervensi perkutaneus (Blum, 2005). Pengobatan kanker hepar ini membutuhkan biaya

yang mahal. Hal ini juga yang menjadi salah satu penyebab tingginya angka prevalensi terjadinya kanker hepar, disamping pencegahan yang kurang. Salah satu pencegahan yang mudah dan murah untuk dilakukan adalah dengan konsumsi makanan atau minuman herbal sehat yang mengandung nutrisi yang tinggi. Saat ini masyarakat banyak memilih obat tradisional sebagai salah satu obat alternatif atau pencegahan terhadap penyakit, salah satunya adalah daun kelor.

Daun kelor (*Moringa oleifera*) adalah tanaman herbal yang memiliki banyak kandungan yang bermanfaat, antara lain adalah vitamin A, kalsium, vitamin C, potasium, dan protein (Fahey, 2005). Daun Moringa telah dikenal sebagai antibiotik dan proteksi terhadap kanker (Rebecca *et al.*, 2006). Daun Moringa memiliki kandungan flavonoid, yaitu kaempferol dan quercetin, yang merupakan antioksidan. Kaempferol dan quercetin memiliki aktivitas anti-radikal yang lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa flavonol lainnya dan juga terbukti menginduksi apoptosis dengan meningkatkan aktivasi caspase-3 melalui pengaktifan caspase-8 dan caspase-9 (Wang, 2001; Bennett *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2010).

Berdasarkan penjelasan di atas, daun Moringa mungkin memiliki peran penting dalam meningkatkan kadar caspase-3 jaringan hepar sebagai upaya pencegahan kanker hepar. Maka itu penulis memilih melakukan penelitian untuk mengetahui efek pemberian ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) wistar yang diinduksi kanker hepar dengan DMBA terhadap peningkatan kadar caspase-3 jaringan hepar.

1.2 Rumusan Masalah

- Apakah pemberian ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat meningkatkan kadar caspase-3 jaringan hepar pada tikus wistar yang diinduksi DMBA?

1.3 Tujuan Penelitian

- Membuktikan ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) meningkatkan kadar caspase-3 jaringan hepar pada tikus wistar yang diinduksi DMBA.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

- Menambah wawasan tentang kelor (*Moringa oleifera*), khususnya ekstrak methanol daun kelor.
- Menjelaskan dasar teori tentang dosis respon ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) yang mempunyai efek paling besar dalam meningkatkan kadar caspase-3 jaringan hepar pada tikus wistar yang diinduksi DMBA.

1.4.2 Manfaat Praktis

- Menjelaskan dasar teori potensi daun kelor (*Moringa oleifera*) sebagai upaya pencegahan terhadap kanker hepar.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker Hepar

2.1.1 Definisi Kanker dan Kanker Hepar

Kanker adalah penyakit keganasan yang sering berakibat fatal (kematian). Sel-sel kanker berbeda dengan sel-sel tumor jinak, sel kanker memiliki sifat invasif, metastasis, dan sangat anaplastik. Sel kanker dibagi dalam dua kategori besar, yaitu karsinoma dan sarcoma (Dorland, 2002). Karsinoma adalah sel kanker yang berasal dari sel-sel epitel, sedangkan sarcoma berasal dari sel-sel mesenkim.

Kanker hepar merupakan salah satu jenis karsinoma. Kanker hepar adalah kanker yang secara primer berasal dari jaringan hepar, sering juga disebut *hepatocellular carcinoma*. Hepatoseluler karsinoma memiliki pola pertumbuhan berbeda, yaitu (1) beberapa sebagai tumor single yang tumbuh membesar yang secara lambat menyebar ke bagian lain dari hepar, (2) berupa nodul kanker yang kecil dan banyak dan ini banyak terjadi pada pasien yang mengalami sirosis hepar (American Cancer Society, 2011).

2.1.2 Faktor Risiko

Faktor risiko yang dapat meningkatkan kemungkinan seseorang mengalami kanker hepar adalah sebagai berikut:

a) Jenis Kelamin

Kanker hepar lebih sering terjadi pada laki-laki daripada perempuan. Tingkat insiden pada laki-laki sekitar 16% per 100.000, sedangkan pada perempuan sekitar 6% per 100.000 (Globocan, 2008).

b) Usia

Di Amerika Serikat, kanker hepar primer sering terjadi pada lansia dengan usia di atas 60 tahun (American Society of Clinical Oncology, 2011).

c) Ras

Ras Asia memiliki tingkat insiden yang sangat tinggi untuk terjadinya kasus kanker hepar. Di Amerika Serikat, ras asia-amerika dan kepulauan pasifik memiliki tingkat insiden yang tinggi untuk kanker hepar. Urutan setelah itu diikuti oleh ras amerika-indian atau penduduk asli Alaska, ras hispanik atau latin, dan afro-amerika (American Cancer Society, 2011).

d) Infeksi Virus Hepatitis

Infeksi virus hepatitis B dan hepatitis C adalah salah satu faktor risiko tersering yang menyebabkan kanker hepar. Di Asia yang tersering menyebabkan kanker hepar adalah hepatitis B, sedangkan di Amerika Serikat dan Eropa adalah hepatitis C (American Cancer Society, 2011; Gomaa *et al.*, 2008).

e) Pola Makan atau Diet

Menurut WHO 2011, pola makan yang tidak sehat, seperti rendahnya konsumsi buah dan sayuran, merupakan faktor risiko terjadinya kanker. Tingginya konsumsi daging dan protein hewani dapat meningkatkan risiko kanker hepar (Yu SZ *et al.*, 2002; Fukuda *et al.*, 1993; Kurozawa *et al.*, 2004).

f) Diabetes

Berdasarkan penelitian di Amerika Serikat, diabetes merupakan salah satu faktor independen yang dapat meningkatkan kemungkinan terjadinya kanker hepar (Gomaa *et al.*, 2008). Peningkatan risiko terjadinya kanker hepar juga dilaporkan terdapat pada pasien diabetes yang tercatat di Denmark, juga dilaporkan bahwa risiko kanker hepar meningkat tiga kali lipat pada pasien yang dirawat di rumah sakit karena diabetes pada masyarakat Swedia (Davila *et al.*, 2005; Wideroff *et al.*, 1997; Adami *et al.*, 1996).

g) Konsumsi Alkohol yang Berlebihan

Alkohol dapat menyebabkan terjadinya sirosis hepar yang mengarah pada kanker hepar.

h) Penyakit Metabolik yang Diturunkan (*inherited*)

Orang dengan hemokromatosis menyerap zat besi terlalu banyak sehingga dapat menyebabkan penyimpanan zat besi di hepar menjadi penuh dan mengakibatkan terjadi sirosis hepar. Penyakit metabolik lain yang dapat meningkatkan risiko kanker hepar adalah tirosinemia, kekurangan alfa 1-antitripsin, gangguan penyimpanan glikogen, dan penyakit Wilson (American Cancer Society, 2011).

i) Sirosis

Sirosis hepar merupakan penyebab terpenting terjadinya kanker hepar. Sirosis hepar dapat menyebabkan kerusakan DNA atau kromosom sehingga mengarah pada karsinogenesis hepar (Suruki *et al.*, 2006; Ahn and Flamm, 2004).

j) *Schistosomiasis*

Di Mesir, infeksi schistosoma atau *schistosomiasis* merupakan salah satu penyebab penting terjadinya penyakit pada hepar, yang juga dapat memperparah infeksi virus hepatitis C (el-Zayadi *et al.*, 2005; Darwish NM *et al.*, 1992; Darwish MA *et al.*, 1993; Kamel *et al.*, 1992; Hassan *et al.*, 2001).

k) *Obesitas*

Obesitas dapat menyebabkan terjadinya penumpukan lemak di hepar (*fatty liver*) dan sirosis, hal ini menginduksi terjadinya kanker hepar (American Cancer Society, 2011).

l) *Pestisida*

Pestisida merupakan salah satu faktor lingkungan yang meningkatkan risiko kanker hepar. Pestisida dapat berperan sebagai karsinogen epigenetik yang menyebabkan kanker melalui beberapa cara, yaitu inisiasi spontan perubahan gen, sitotoksik dengan proliferasi yang persisten, stress oksidatif, penghambatan apoptosis, menekan komunikasi intraseluler, dan konstruktif reseptor aktivasi (Rakitsky *et al.*, 2000; Ezzat *et al.*, 2005).

m) *Aflatoksin*

Aflatoksin dihasilkan oleh jamur dan dapat mengkontaminasi makanan. Aflatoxin diduga menyebabkan kanker hepar dengan cara mutasi spesifik pada kodon gen supresor tumor p53. Risiko ini meningkat pada pasien hepatitis B dan hepatitis C (American Cancer Society, 2011; Bressac *et al.*, 1991).

n) Anabolik Steroid

Konsumsi anabolik steroid jangka panjang secara perlahan meningkatkan risiko kanker hepar (American Cancer Society, 2011).

o) Arsenik

Konsumsi air yang mengandung arsenik dapat meningkatkan risiko kanker hepar. Hal ini terutama sering terdapat di Asia Timur (American Cancer Society, 2011).

p) *Vinyl chloride* dan *Thorium dioxide* (Thorotrast)

Vinyl chloride adalah zat yang terdapat pada bahan plastik. *Thorotrast* adalah zat kimia yang disuntikkan pada pasien yang akan menjalani tes X-ray. Kedua zat ini meningkatkan risiko kanker hepar (American Cancer Society, 2011).

q) *7,12-Dimethylbenz(a)anthracene* (DMBA)

DMBA dapat mengganggu enzim liver pada katak dan menginduksi kanker hepar atau hepatokarsinogenesis pada tikus (Al-Attar, 2004; Hermawan dkk., 2011; Paliwal *et al.*, 2011). DMBA menginduksi klinikalpatologi melalui racun yang terjadi di kulit, kelenjar mammae, ginjal, dan liver dengan karakterisasi oleh induksi kerusakan parenkim sel hepar seperti lesi hepar, tumor, dan kanker (Paliwal *et al.*, 2011).

2.1.3 Diagnosis dan Pencegahan

Kanker hepar sering sulit dideteksi sejak dini karena tanda dan gejala (*sign and symptom*) jarang ditemukan, kecuali hingga tahap terakhir dari kanker. Jika tumor hepar sudah dapat diraba, kemungkinan tumor itu sudah berukuran besar. Beberapa pemeriksaan yang disarankan untuk deteksi dini

kanker hepar adalah tes darah AFP dan ultrasonografi (USG) (American Cancer Society, 2011).

AFP adalah protein yang biasanya ditemukan pada fetus dengan level yang tinggi dan akan turun setelah kelahiran. Namun, jika protein ini ditemukan pada orang dewasa, maka dicurigai terdapat kanker hepar. Namun tes ini kurang akurat karena beberapa penyakit hepar yang bukan kanker juga meningkatkan level AFP dan terkadang nilai AFP ini tidak meningkat pada beberapa tumor hepar. Pemeriksaan dini yang lebih disarankan adalah USG. Pemeriksaan ini sangat disarankan pada orang yang memiliki risiko kanker hepar (American Cancer Society, 2011).

Diagnosis kanker hepar dapat ditegakkan dari tanda dan gejala yang ada, walaupun hal ini jarang ditemukan, juga dari riwayat medis, pemeriksaan fisik, hingga pemeriksaan penunjang. Pemeriksaan fisik dilakukan dengan melihat ada tidaknya tanda dan gejala pada pasien dan riwayat medis pasien dengan mengetahui faktor risiko kanker hepar yang dimiliki oleh pasien. Pemeriksaan penunjang kanker hepar adalah USG untuk skrining dan dinamis CT atau dinamis MRI untuk diagnosis. Beberapa pemeriksaan penunjang lain adalah laparoskopi, biopsi, tes fungsi hepar, tes darah AFP, tes koagulasi darah, tes infeksi virus hepatitis, hitung darah lengkap, dan tes elektrolit dan kimia darah (American Cancer Society, 2011).

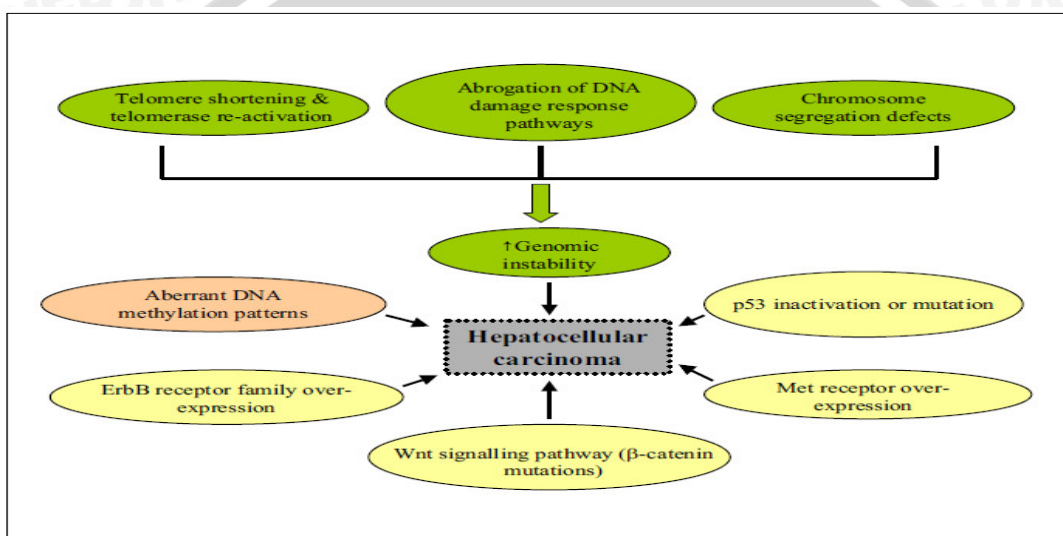
Pencegahan kanker hepar dapat dilakukan dengan vaksinasi hepatitis, mengobati penyakit hepatitis, mengurangi konsumsi alkohol, mengurangi keterpaparan terhadap zat kimia karsinogenik, dan mengobati penyakit metabolik yang meningkatkan risiko kanker hepar.

2.1.4 Patogenesis Kanker Hepar

Proses terjadinya kanker hepar (*hepatocellular carcinoma* atau HCC) atau hepatokarsinogenesis terjadi melalui beberapa cara yang berakumulasi menyebabkan perubahan genetik yang mengakibatkan gangguan pada gen yang berhubungan dengan kanker, seperti onkogen atau gen penekan tumor (*tumor suppressor genes*) (Wong and Ng, 2007; Saffroy *et al.*, 2006).

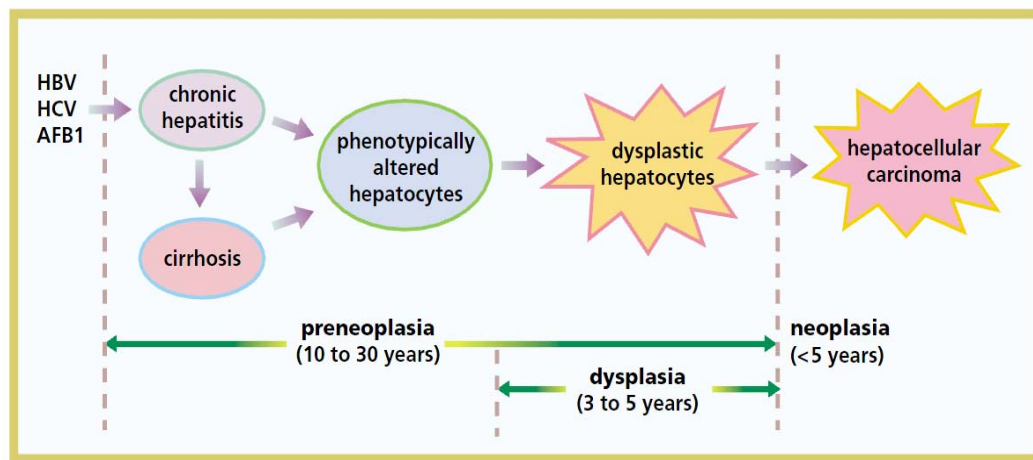
Terdapat kontribusi genetik, epigenetik, dan genomik pada HCC. Secara genetik, *tumor suppressor genes* terpenting yang terlibat dalam perkembangan HCC adalah p53. Secara spesifik dalam pajanan aflatoxin B1, mutasi p53 menyebabkan inisiasi kanker melalui kerja sama dengan kejadian onkogenik lain, yang memungkinkan inaktivasi respon *key checkpoint* seperti apoptosis. Dalam pengaturan regenerasi, stress oksidatif, dan erosi telomere, hilangnya fungsi p53 akan menyebabkan perburukan HCC dengan proliferasi yang berlebihan karena pengaruh telomerase akibat ketidakstabilan kromosomal oleh inaktivasi sinyal kerusakan DNA (Farazi and DePinho, 2006). Jalur Wnt *signaling* juga berperan dalam proses genetik terjadinya HCC. Beberapa gen yang berhubungan dengan kanker, seperti 16^{INK4a} , E-cadherin, COX-2, dan beberapa pola metilasi yang menyimpang diperkirakan berperan dalam proses epigenetik HCC. Pada proses terjadinya HCC terdapat ketidakstabilan genomik yang ditandai dengan (a) pemendekan telomerase yang merupakan gambaran utama dari proliferasi yang berlebihan pada hepar dan reaktivasi telomerase terjadi sekitar 90% pada HCC manusia (Farazi *et al.*, 2003), (b) gangguan segregasi kromosom sebagai bukti peningkatan ekspresi Aurora Kinase A yang mendukung tumorigenesis dan kinase tersebut merupakan target HURP (*hepatoma upregulated protein*), dan (c) gangguan respon terhadap

kerusakan DNA sehingga tidak ada respon perbaikan DNA. Perubahan genomik tersering terjadi pada penambahan 1q, 6p, 8q, 11q, dan 17q, dan kehilangan 1p, 4q, 8p, 13q, dan 17p, dan beberapa target yang dikenal sebagai kanker seperti *RB* (13q), *BRCA2* (13q), *TP53* (17p), *ERBB2* (17q), dan *MYC* (8q) (Farazi and DePinho, 2006) (lihat gambar 2.1).



Gambar 2.1 Kontribusi Genetik, Epigenetik, dan Genomik pada HCC
(Farazi and Depinho, 2006)

Ada tiga hal yang memiliki peran penting dalam hepatokarsinogenesis, yaitu infeksi oleh virus hepatitis, penyakit hepar kronis, dan zat karsinogen dalam makanan (terutama aflatoxin) (Kumar *et al.*, 2003). Empat jalur yang berkontribusi terhadap perubahan genetik, yaitu: (a) jalur p53 berkontribusi terhadap respon kerusakan DNA, (b) jalur retinoblastoma berkontribusi dalam mengontrol siklus sel, (c) jalur *transforming growth factor-beta* (TGF) berkontribusi dalam menghambat pertumbuhan, (d) jalur Wnt berkontribusi dalam adhesi sel dan transduksi sinyal (Saffroy *et al.*, 2006).



Gambar 2.2 Kronologi Susunan Lesi Sel pada Perkembangan HCC
(Thorgeirsson and Grisham, 2002)

Pada HCC, perubahan genomik berawal dalam tahapan preneoplasia, lalu berkembang menjadi displasia hepatosit dan kanker hepar primer (*hepatocellular carcinoma*) (lihat gambar 2.2). Tahapan preneoplasia dapat berlangsung 10-30 tahun, dan displasia hepatosit dapat berlangsung 3-5 tahun (Thorgeirsson and Grisham, 2002).

Pada tahapan preneoplasia terjadi perubahan ekspresi gen yang disebabkan mekanisme epigenetik yang disertai dengan tidak adanya perubahan struktur pada gen atau kromosom (Thorgeirsson and Grisham, 2002). Epigenetik berarti terjadi penyimpangan metilasi DNA dan modifikasi histon yang menyebabkan perubahan transkripsi gen, tapi tidak ikut serta dalam penyusunan DNA (Wong and Ng, 2007). Penyimpangan metilasi DNA dapat berupa hipometilasi ataupun hipermetilasi. Penyimpangan metilasi DNA yang berupa hipermetilasi banyak terjadi di pulau CpG yang mengakibatkan tidak aktifnya gen penekan tumor, seperti retinoblastoma 1 (Rb1) dan p16/INK4A (Wong and Ng, 2007; Wilkens *et al.*, 2001; Sakai *et al.*, 1991; Liew *et al.*, 1999). Hilangnya fungsi p16 akan membatasi fungsi gen penekan tumor Rb1 dan menyebabkan

proliferasi sel yang tidak terkontrol (Serrano *et al.*, 1993). Peningkatan ekspresi TGF- α (*transforming growth factor- α*) dan IGF-2 (*insulin-like growth factor-2*) menyebabkan percepatan proliferasi hepatosit (sel hepar) juga terjadi dalam proses preneoplasia (Kawakita *et al.*, 1992; Grisham, 2001). Peningkatan TGF- α dan IGF-2 merupakan hasil dari produksi sitokin oleh sel inflamasi kronis yang menginfiltrasi karsinogen perusak hepar (*carcinogen-damage liver*), trans-aktivasi virus, dan respon dari hepar yang kehilangan sel (Grisham, 2001; Brechot, 1998; Smela *et al.*, 2001; Diao *et al.*, 2001).

Perubahan genetik terjadi karena adanya mutasi gen, seperti pada gen p53, Rb, RAS, dan β -catenin terjadi dalam proses HCC (Wong and Ng, 2007). Gen p53 berfungsi sebagai gen penekan tumor dan berperan penting dalam keseimbangan antara siklus sel dan apoptosis (Saffroy *et al.*, 2006). Mutasi gen p53 dan β -catenin merupakan mutasi gen tersering yang terjadi pada HCC (Wong and Ng, 2007). Kerja p53 juga dihambat oleh HBV x protein (HBx) yang berlekatan langsung dengan p53, sehingga menghambat aktivitas transkripsional dan menekan p-53-mediati apoptosis. Mutasi dan kehilangan fungsi p-53 menyebabkan ekspresi berlebihan dari onkogen dan kurangnya ekspresi gen penekan tumor. Retinoblastoma (Rb) berperan dalam regulasi gen dalam fase G1 siklus sel. Pada tahap G1 merupakan *check point* untuk memeriksa ukuran sel, nutrisi, faktor pertumbuhan, dan kerusakan DNA dalam siklus sel. Penurunan ekspresi retinoblastoma terjadi pada pasien HCC, namun retinoblastoma lebih sering terinaktivasi karena adanya metilasi pada gen p16. Ekspresi berlebihan dari gen p28/gankyrin, yaitu gen yang berperan dalam degradasi retinoblastoma, juga berperan dalam proses hepatokarsinogenesis (Fu *et al.*, 2002; Dawson *et al.*, 2006). Mutasi pada *Rat Sarcoma Oncogene* (RAS) yang merupakan onkogen

yang dominan dalam menginduksi proliferasi sel, pertumbuhan tumor, dan angiogenesis, akan menghasilkan sebuah lingkungan mikro yang pro-tumorigenesis di sekitar sel tumor. Aktivasi RAS menginduksi banyak produk gen inflamasi, termasuk sitokin pro-inflamasi, yang dapat memproduksi radikal bebas. β -catenin berperan erat dalam mengontrol proliferasi sel, motilitas, dan perkembangan embrionik (Moon *et al.*, 2002). Aktivasi β -catenin berperan penting dalam pertumbuhan HCC (Moon *et al.*, 2004). β -catenin memegang peran kunci dalam jalur Wnt. Jika tidak ada sinyal Wnt, maka β -catenin akan diambil ke kompleks degradasi dan didegradasi melalui kompleks APC, Axin, dan glikogen sintase kinase (GSK)-3 β . Saat berikatan dengan kompleks tersebut, β -catenin difosforilasi oleh GSK-3 β pada residu serine dan threonine. Hiperfosforilasi β -catenin ini kemudian menjadi target degradasi melalui sistem ubiquitin-proteasome. Degradasi lanjutan ini menjaga β -catenin bebas pada level rendah dalam keadaan normal. Jika Wnt teraktivasi, maka akan mengirim sinyal melalui *phosphorylation of disheveled* (Dvl), sehingga akan menekan aktivitas kinase dari GSK-3 β , dan menghasilkan stabilisasi β -catenin. β -catenin akan membentuk kompleks dengan anggota faktor T-sel atau *lymphoid enhancing factor* (LEF) faktor transkripsi dan meningkatkan respon pada stimulus untuk ekspresi proto-onkogen c-Myc dan cyclin (Shtutman *et al.*, 1999; Tetsu *et al.*, 1999).

2.1.5 Tahapan Kanker Hepar

Penilaian tahapan pada kanker hepar berguna untuk menentukan tujuan terapi dan prognosis penyakit dan tahapan ini dilihat dari penyebaran kanker hepar. Ada beberapa tahapan yang berbeda dalam kanker hepar, yaitu berdasar

American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM system, Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) system, Child-Pugh score (*cirrhosis staging system*), dan *Localized resectable, localized unresectable, and advanced liver cancer*.

Stage I: T1, N0, M0: Terdapat single tumor dengan berbagai ukuran yang tidak tumbuh ke dalam pembuluh darah. Kanker tidak menyebar pada daerah lymph node yang dekat atau tempat yang jauh.

Stage II: T2, N0, M0: Tumor single dengan berbagai ukuran yang telah tumbuh ke dalam pembuluh darah atau ada beberapa tumor dan semua lebarnya lebih dari 5 cm atau kurang. Kanker tidak menyebar pada daerah lymph node yang dekat atau tempat yang jauh.

Stage IIIA: T3a, N0, M0: Terdapat beberapa tumor, dan minimal ada satu tumor yang lebarnya lebih dari 5 cm bersilangan. Kanker tidak menyebar pada daerah lymph node yang dekat atau tempat yang jauh.

Stage IIIB: T3b, N0, M0: Terdapat minimal satu tumor dengan berbagai ukuran yang telah tumbuh ke dalam cabang utama dari vena hepar (vena porta dan vena hepatica). Kanker tidak menyebar pada daerah lymph node yang dekat atau tempat yang jauh.

Stage IIIC: T4, N0, M0: Tumor telah tumbuh ke organ didekatnya (selain kandung kemih) atau tumor telah tumbuh ke dalam viseral peritoneum yang menyelubungi hepar. Kanker tidak menyebar pada daerah lymph node yang dekat atau tempat yang jauh.

Stage IVA: Beberapa T, N1, M0: Tumor dengan berbagai ukuran atau jumlah dan telah tumbuh ke dalam pembuluh darah atau organ di dekatnya. Kanker belum menyebar ke organ yang jauh.

Stage IVB: Beberapa T, beberapa N, M1: Kanker telah menyebar ke bagian lain dari tubuh (tumor dengan berbagai ukuran atau jumlah, dan lymph node terdekat ikut terkena atau tidak)(American Cancer Society, 2011).

2.1.6 Terapi

Terapi kanker hepar yang ada saat ini bisa dibagi jadi empat kategori intervensi, yaitu intervensi operasi (reseksi tumor dan transplantasi hepar), intervensi perkutaneus (injeksi ethanol, ablasi dengan radiofrekuensi), intervensi trans-arterial (embolisasi atau kemoperfusi), dan intervensi obat-obatan termasuk terapi imun dan gen (Blum, 2005). Reseksi tumor dilakukan berdasarkan tingkatan stage pasien. Pasien stage I dan II dapat menjalani reseksi total tumor, pasien stage IIIA-IIIC reseksi tumor total tidak bisa dilakukan, sedangkan pada pasien stage IVA-IVB tidak bisa diterapi dengan operasi. Transplantasi hepar hingga saat ini masih sulit dilakukan di Indonesia. Transplantasi dilakukan jika tumor belum menyebar ke organ lain dan secara teori merupakan terapi terbaik untuk HCC karena dapat membuang tumor dan sirosis serta dapat meminimalkan risiko terulangnya HCC (El-Serag *et al.*, 2008).

Injeksi ethanol merupakan salah satu teknik yang sering digunakan. Injeksi dilakukan langsung dengan cara menyuntikkan ke tumor dengan panduan USG atau CT-scan. Ablasi radiofrekuensi dilakukan dengan alat seperti suntik yang berisi elektron (National Cancer Institute, 2009). Embolisasi merupakan teknik untuk menginduksi iskemik pada tumor sehingga mengalami nekrosis, melalui sumbatan di arteri. Embolisasi dilakukan dengan dua cara, yaitu embolisasi tunggal atau dikombinasi dengan selektif intra-arterial kemoterapi. Embolisasi biasanya dilakukan pada pasien yang tidak dapat direseksi dan terapi

perkutaneus gagal atau pada pasien yang pada tahap intermediet. Terapi dengan obat, imun, dan gen merupakan terapi molekuler yang bertujuan untuk menghambat pertumbuhan tumor, angiogenesis, dan telomerase (El-Serag *et al.*, 2008).

Saat ini juga telah dikembangkan terapi herbal. Komposisi herbal menunjukkan efektifitas dan keamanan dalam penelitian terpusat tunggal yang kecil (*small single center study*) untuk pengobatan dan pencegahan *hepatocellular carcinoma* dan sirosis (Li and Martin II, 2010). Terapi herbal kebanyakan mengandalkan kandungan antioksidan yang ada. Salah satu tanaman yang mengandung antioksidan dengan kadar tinggi adalah *Moringa oleifera*. *Moringa oleifera* secara *in vivo* aktivitas antioksidannya dapat menyembuhkan tikus model kerusakan hepatoselular yang diinduksi *carbon tetra chloride* (CCl₄) (Rakesh and Singh, 2010).

2.2 *Moringa oleifera*

Moringa oleifera atau sering disebut kelor di Jawa, merupakan family dari Moringaceae yang merupakan tanaman asli India bagian utara, Pakistan, dan Nepal. Tanaman ini berkembang dan tumbuh baik selain di daerah asalnya, seperti di Asia selatan, Asia tenggara, semenanjung Arab, Afrika tropis, Karibia, dan Amerika selatan tropis (Roloff *et al.*, 2009).

2.2.1 Taksonomi

Tabel 2.1 Hierarki Taksonomi *Moringa oleifera*
(Integrated Taxonomic Information System, 2000)

Hierarki Taksonomi	
Kingdom	Plantae
Subkingdom	Tracheobionta
Divisi	Magnoliophyta
Kelas	Magnoliopsida
Subkelas	Dilleniidae
Ordo	Capparales
Famili	Moringaceae
Genus	Moringa Adans.
Spesies	<i>Moringa oleifera</i> Lam.

2.2.2 Morfologi dan Karakteristik

Moringa oleifera merupakan tanaman yang kecil, cepat tumbuh, berdaun hijau sepanjang tahun, dan biasanya tumbuh dengan tinggi 10-12 meter. 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 puncaknya berbentuk payung (Foidl *et al.*, 2001). Kulit kayu batang pohon kelor biasanya berwarna abu-abu keputihan, tebal, lembut, dan bertekstur retak-retak. Ketika kulit kayu dikupas, maka akan mengeluarkan cairan yang berwarna putih, namun akan jadi coklat kemerahan atau kehitaman (Roloff *et al.*, 2009).

Moringa oleifera biasanya memiliki 2-3 daun muda pada setiap tangkai yang panjangnya bisa mencapai 45 cm dan membentuk spiral pada rantingnya. Daun kelor berbentuk oval dengan lebar 0,6-1 cm dan panjang 1,2-2 cm. Daun ini menyusun 8-10 pasang pada setiap tangkai. Daun ini biasanya berbulu halus saat muda, dan rantingnya juga berbulu halus dan hijau saat muda lalu akan menjadi coklat (Foidl *et al.*, 2001; Roloff *et al.*, 2009). Bunga daun kelor tumbuh dari bagian ketiak (*axilla*) daun. Berwarna putih kekuningan, berbau harum, dengan panjang 10-25 cm. Mahkota bunganya berwarna putih atau krem dengan bintik-bintik kuning di bagian bawah (Morton, 1991).

Buah kelor terjuntai, dengan panjang 20-50 cm dan lebar 2-2,5 cm, memiliki 3 lobus polong dengan tiap polong berisi 12-35 biji. Selama masa pertumbuhan, biji berwarna hijau gelap dan memerlukan waktu 3 bulan untuk matang setelah pembungaan. Setelah matang, biji akan berwarna coklat. Setiap pohon dapat menghasilkan 15.000-25.000 biji pertahun (Foidl *et al.*, 2001; Roloff *et al.*, 2009; Hsu *et al.*, 2006).

2.2.3 Manfaat

Moringa oleifera memiliki banyak manfaat, baik dalam bidang medis dan bahan pangan. Semua bagian *Moringa oleifera* dapat dikonsumsi. Daunnya dapat dimakan sebagai salad atau pun asinan, dapat dimakan segar, dimasak, atau disimpan sebagai bubuk kering untuk beberapa bulan tanpa disimpan di kulkas atau lemari pendingin dan tidak kehilangan kandungan nutrisinya. Kandungan daunnya kaya akan karbohidrat, mineral, zat besi, vitamin A, B, dan C, kalsium, dan protein, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai suplemen protein dan kalsium bagi orang yang butuh nutrisi lebih (Hsu *et al.*, 2006).

Dalam bidang industri, bijinya dapat menghasilkan minyak, dikenal dengan Ben oil, yang dapat digunakan untuk pelumas mesin, memproduksi parfum, dan perawatan rambut (Tsaknis *et al.*, 1999). Juga dapat untuk produksi gas biomassa (daun), makanan ternak (daun dan bijinya), agen pembersih domestik (daun yang hancur), pewarna biru (kayu), tanaman pagar, pupuk (biji), nutrisi daun (sari dari daun), pupuk hijau (daun), getah (dari batang pohon), pembersih madu dan gula tebu (bubuk biji), madu (nektar bunga), pembuat kertas (kayu), tali tambang (kulit kayu), tannin (getah dan kulit kayu), dan pemurnian air (bubuk biji) (Fuglie, 1999).

Dalam bidang medis, *Moringa oleifera* telah lama digunakan sebagai obat alternatif atau tradisional. *Moringa oleifera* menjadi obat tradisional yang berperan penting bagi masyarakat di Asia dan Afrika barat, dan bagi masyarakat Indian tanaman ini dapat mengatasi asites, reumatik, gigitan ular, serta penyakit jantung dan sirkulasi (Roloff *et al.*, 2009). *Moringa oleifera* saat ini telah digunakan luas karena memiliki efek antibiotik, anti-tripanosomal, hipotensi, anti-kejang, anti-radang, penurun kolesterol, dan aktivitas hipoglikemi. Namun saat ini yang sangat diteliti adalah efek antibiotik dan pencegah kanker (Fahey, 2005).

2.2.4 Kandungan *Moringa oleifera*

Moringa oleifera memiliki kandungan setiap 1 gram daun 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).

Tabel 2.2 Hasil Pemeriksaan Kandungan Zat Gizi Kelor per 100 gram
(Fuglie, 1999)

Per 100 gram	Biji	Daun	Tepungdaun
Kadar Air (%)	86.9	75.0	7.5
Calori	26	92	205
Protein (g)	2.5	6.7	27.1
Lemak (g)	0.1	1.7	2.3
Carbohydrate (g)	3.7	13.4	38.2
Fiber (g)	4.8	0.9	19.2
Minerals (g)	2.0	2.3	-
Ca (mg)	30	440	2,003
Mg (mg)	24	24	368
P (mg)	110	70	204
K (mg)	259	259	1,324
Cu (mg)	3.1	1.1	0.57
Fe (mg)	5.3	7	28.2
S (mg)	137	137	870
Oxalic acid (mg)	10	101	1.6%
Vitamin A - B carotene (mg)	0.11	6.8	16.3
Vitamin B -choline (mg)	423	423	-
Vitamin B1 -thiamin (mg)	0.05	0.21	2.64
Vitamin B2 -riboflavin (mg)	0.07	0.05	20.5
Vitamin B3 -nicotinic acid (mg)	0.2	0.8	8.2
Vitamin C -ascorbic acid (mg)	120	220	17.3
Vitamin E -tocopherol (mg)	-	-	113
Arginine (g/16g N)	3.6	6.0	1.33%
Histidine (g/16g N)	1.1	2.1	0.61%
Lysine (g/16g N)	1.5	4.3	1.32%
Tryptophan (g/16g N)	0.8	1.9	0.43%
Phenylalanine (g/16g N)	4.3	6.4	1.39%
Methionine (g/16g N)	1.4	2.0	0.35%
Threonine (g/16g N)	3.9	4.9	1.19%
Leucine (g/16g N)	6.5	9.3	1.95%
Isoleucine (g/16g N)	4.4	6.3	0.83%
Valine (g/16g N)	5.4	7.1	1.06%

Moringa oleifera juga mengandung *alkaloids*, *steroids* dan *triterpenoids*, *tannins*, *anthracenosides*, *reducing sugars*, *flavones*, *saponins*, dan *coumarins* yang memiliki aktivitas biologi pada jaringan hewan coba (Kasolo *et al.*, 2010).

Tabel 2.3 Kandungan Phytokimia Daun Kelor (Kasolo *et al.*, 2010)

Phytochemicals	Ekstak ether	Ekstrak ethanol	Ekstrak air
Gallic tannins	+	+	++
Catechol tennins	+	-	++
Coumarins	-	-	-
Steroid dan triterpenoid	+++	++	++
Flovanoids	++	++	++
Saponins	+	+	++
Anthraquinones	+	++	+++
Alkaloids	+	-	++
Reducing sugars	-	++	++

Flavonoid memiliki aktivitas anti-inflamasi dan antioksidan yang kuat yang bermanfaat sebagai anti-karsinogenik dan anti-mutagenik, juga memiliki efek antimikroba yang secara *in vitro* dapat melawan mikroba spektrum luas dengan menghambat ikatan kimia enzim pada membran mikroba (Cowan, 1999; Liweber, 2009; Nandakumar *et al.*, 2008; Hausteen, 2002). Flavonoid juga dapat menurunkan tekanan darah tinggi (Ayinde *et al.*, 2007; Dhawan and Jain, 2005).

Terpenoids dan steroid dapat melawan bakteri seperti *Staphylococcus aureus* (Cowan, 1999), mencegah kanker (Raju *et al.*, 2004), dan sebagai anti-karsinogenik (Yun, 1996). Reducing sugar berguna untuk memperbaiki tumorigenesis (Ueno *et al.*, 2009) dan menghambat pertumbuhan tumor yang dimediasi karbohidrat (Nangia-Makker *et al.*, 2002), menginduksi respon stress dan apoptosis pada sel kanker payudara manusia.

2.2.5 Antioksidan

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

adalah flavonoid yang terdiri dari beberapa subkelas, yakni flavonol, isoflavon, flavanon, flavon, antosianidin, dan katekin. Flavonoid dapat menginduksi aktivasi dari caspase-2, -3, -8, -9, dan -10, aktivasi caspase-10 dimediasi melalui caspase-1, serta flavonoid dapat menurunkan ekspresi protein anti-apoptosis Bcl-2 (Erhart *et al.*, 2005). Turunan dari katekin diantaranya adalah epikatekin, epigalo-katekin, apigalo-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. Quercetin juga mengaktivasi caspase-3 dan caspase-9. Selain itu, ia juga menurunkan protein anti apoptosis keluarga BCL-2 seperti Bcl-2 serta meningkatkan anggota pro-apoptosisnya seperti Bax (Granado-Serrano *et al.*, 2006). Quercetin juga dapat menghambat Wnt/ β -catenin dan mengurangi aktivitas transkripsionalnya karena menurunkan jumlah protein nuklear β -catenin dan Tcf-4 (Park *et al.*, 2005).

Selain itu, kaempferol yang merupakan salah satu jenis flavonoid juga memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi (Middleton *et al.*, 2000). Melalui regulator apoptosis menunjukkan adanya peningkatan level ekspresi protein sitokrom c, Apaf-1, caspase-9, caspase-3, dan caspase-7 pada pemberian kaempferol yang menunjukkan bahwa apoptosis yang diinduksi kaempferol melalui *mitochondrial-dependent cascade* atau jalur intrinsik (Nurulita, 2011). Kaempferol dan quercetin memiliki aktivitas anti-radikal yang lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa flavonol lainnya dan juga terbukti menginduksi apoptosis dengan meningkatkan aktivasi caspase-3 (Bennett *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2010).

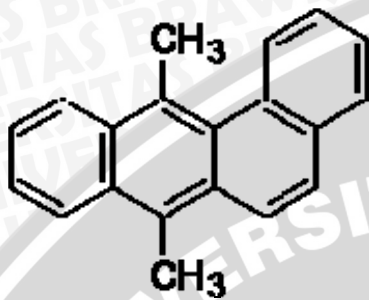
2.3 DMBA

Senyawa 7,12-dimetilbenz(α)antrasen (DMBA) adalah zat kimia yang termasuk dalam *polycyclic aromatic hydrocarbon* (PAH) yang dikenal bersifat mutagenik, karsinogenik, sitotoksik, dan immunosupresif (Smith *et al.*, 1999; Spitsbergen *et al.*, 2000; Miyata *et al.*, 2001; Wijnhoven *et al.*, 2001; Lindhe *et al.*, 2002; Buters *et al.*, 2003). Menurut Division of Occupational Health and Safety National Institutes of Health, DMBA yang mempunyai 4 cincin benzene termasuk dalam tujuh PAH yang dapat menyebabkan kanker pada manusia (Lukitaningsih dan Noegrohati, 2000; Al-Attar, 2004; Anon, 2004). DMBA memiliki rumus molekul $C_{20}H_{16}$. Struktur kimia pada gambar 2.3, menunjukkan senyawa tersebut memiliki 4 macam cincin aromatik yang berikatan khas struktur PAH dengan tiga atau lebih cincin aromatik dan 2 substituen metil (Susilowati, 2010).

Secara alami DMBA dapat ditemukan di alam sebagai hasil dari proses pembakaran yang tidak sempurna, seperti dalam asap tembakau, asap pembakaran kayu, asap pembakaran gas, bensin, minyak, batubara, atau daging (Anon, 2004). Senyawa 7,12- dimetilbenz (α) antrasen dapat ditemukan di dalam air, tanah, maupun udara. Kontaminasi DMBA biasa terjadi melalui makanan atau peroral, inhalasi, maupun kontak kulit. 7,12-dimetilbenz (α) antrasen juga dilaporkan sebagai karsinogen poten pada hewan coba, dengan target utama pada kulit dan kelenjar mammae (Kubatka *et al.*, 2002; Mun'im dkk., 2006).

Dosis tinggi DMBA yang diberikan secara kronik pada hewan coba dapat menyebabkan nekrosis pada adrenal (Haschek dan Rousseaux, 1991). DMBA juga dapat mengganggu enzim liver pada katak dan menginduksi kanker hepar atau hepatokarsinogenesis pada tikus (Al-Attar, 2004; Hermawan dkk., 2011; Paliwalet *et al.*, 2011). DMBA menginduksi klinikalpatologi melalui racun yang

terjadi di kulit, kelenjar mammae, ginjal, dan liver dengan karakterisasi oleh induksi kerusakan parenkim sel hepar seperti lesi hepar, tumor, dan kanker (Paliwal *et al.*, 2011).



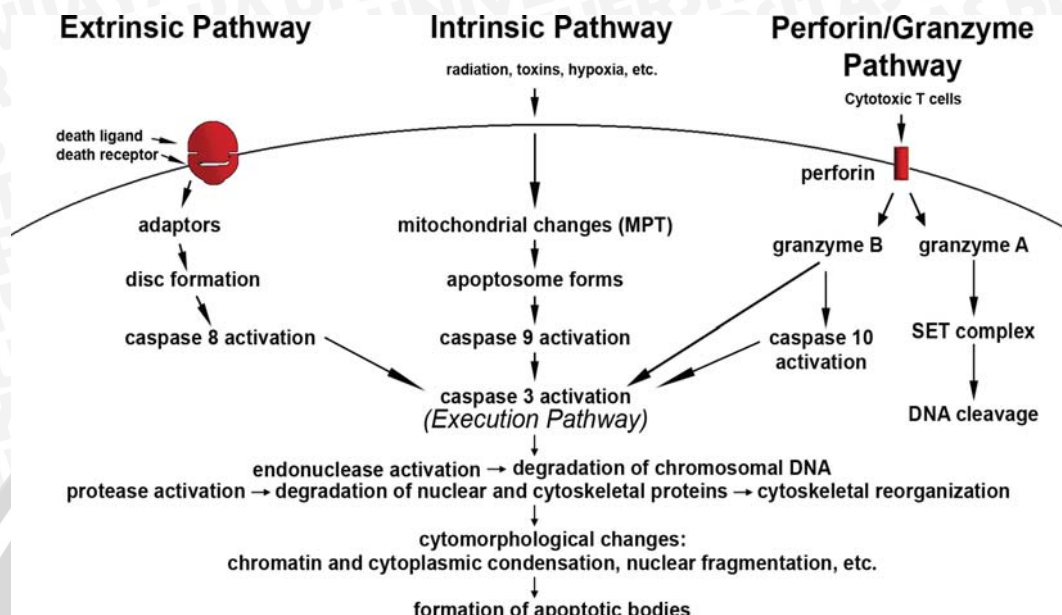
Gambar 2.3 7,12-dimethylbenz(α)anthracene (DMBA) (Sigmaaldrich, 2010)

DMBA menginduksi produksi *reactive oxygen species* (ROS) yang menyebabkan peroksidasi lipid, kerusakan DNA, dan penurunan aktivitas sistem pertahanan antioksidan (Paliwal *et al.*, 2011). Produksi yang sangat berlebihan dari ROS akibat stress oksidatif dapat menginduksi pecahnya untai dan terjadinya modifikasi basa DNA yang berkontribusi pada mutagenesis dan karsinogenesis (Manoharan *et al.*, 2009). DMBA juga terbukti meningkatkan jalur Wnt/ β -catenin pada tikus yang diinduksi tumor mammae (Currier *et al.*, 2005). Aktivitas karsinogenik dari DMBA terjadi melalui aktivasi metabolisme (biotransformasi) untuk menghasilkan karsinogenesis. Jalur metabolisme DMBA melalui aktivasi enzim sitokrom P450 membentuk *proximate carcinogen* dan *ultimate carcinogen*. *Proximate carcinogen* adalah metabolit intermediet yang akan mengalami metabolisme lebih lanjut menjadi *ultimate carcinogen*. *Ultimate carcinogen* berupa senyawa epoksida elektrofil yang adalah metabolit aktifnya merupakan metabolit akhir dari karsinogen induk yang akan membentuk *DNA adduct* yang dapat menyebabkan mutasi dan inisiasi kanker (Dandekar *et*

al., 1986; Melendez-Colon *et al.*, 1999; Rowlands *et al.*, 2001; Weimer *et al.*, 2000).

2.4 Apoptosis

Apoptosis merupakan mekanisme kematian sel yang aktif, terprogram, serta sangat selektif terhadap sel yang berlebih atau telah rusak. Apoptosis berhubungan dengan aktivasi kaskade caspase. Fragmentasi DNA dan isi sel, akibat dari apoptosis selanjutnya akan difagositosis oleh sel imunitas (Ali, 2008). Kematian sel terprogram ini merupakan proses penting dalam pengaturan homeostasis normal. Proses ini menghasilkan keseimbangan dalam jumlah sel jaringan tertentu melalui eliminasi sel yang rusak dan proliferasi fisiologis dan dengan demikian memelihara agar fungsi jaringan tetap normal. Apoptosis ditandai dengan adanya kondensasi kromatin, fragmentasi sel, dan fagositosis sel tersebut oleh sel tetangganya. Dereglasi apoptosis mengakibatkan keadaan patologis, termasuk proliferasi sel secara tidak terkontrol seperti dijumpai pada kanker (Fitriani, 2008). Mekanisme apoptosis merupakan mekanisme yang kompleks. Terdapat 2 jalur utama apoptosis, yaitu ekstrinsik atau jalur reseptor dan intrinsik atau jalur mitokondria (Igney dan Krammer, 2002). Jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik ini akan menginduksi aktivasi caspase-3, hal ini akan mengakibatkan fragmentasi DNA, degradasi sitoskeleton, degradasi protein nuklear, dan ekspresi ligan reseptor sel fagosit (Martinvalet *et al.*, 2005).



Gambar 2.4 Skema Mekanisme Apoptosis (Elmore, 2007)

2.4.1 Jalur Ekstrinsik

Jalur ekstrinsik diinisiasi oleh reseptor apoptosis dari superfamili TNF. Reseptor tersebut dapat diaktivasi oleh FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4, dan Apo2L/DR5 (Chicheportiche *et al.*, 1997; Ashkenazi *et al.*, 1998; Peter and Kramer, 1998; Suliman *et al.*, 2001; Rubio-Moscardo *et al.*, 2005). Saat teraktivasi, reseptor tersebut akan beroligomerisasi dan bersama dengan protein adaptor intraselular akan membentuk bentukan kompleks (Engel dan Henshall, 2009). Contohnya saat reseptor apoptosis diaktivasi oleh FasL atau TNF- α . Saat FasL atau TNF- α berikatan dengan reseptor, maka protein adaptor intraselular, FADD untuk FasL dan TRADD untuk TNF- α , juga akan berikatan dengan reseptor (Hsu *et al.*, 1995; Grimm *et al.*, 1996; Wajant, 2002). Protein adaptor intraselular tersebut akan berikatan dengan pro-caspase-8 dengan cara

dimerisasi, kemudian terjadi aktivasi *autocatalytic* pro-caspase-8. Kemudian caspase-8 yang telah aktif akan mengaktivasi caspase-3 (Elmore, 2007).

2.4.2 Jalur Intrinsik

Jalur intrinsik diinisiasi oleh sel yang akan menghasilkan enzim pro-apoptosis dari mitokondria, seperti respon pada sinyal sel hasil dari kerusakan DNA, kecacatan siklus sel, perlekatan dari matriks ekstraseluler, hipoksia, kehilangan faktor pertahanan sel, dan stress sel (Fulda and Debnatin, 2006; Coultas and Strasser, 2003; Thornberry and Lazebnik, 1998; Letai, 2005). Terdapat 2 sinyal yang dapat mengaktivasi jalur intrinsik, yaitu sinyal positif dan sinyal negatif. Beberapa contoh dari sinyal positif adalah radiasi, *toxin*, hipoksia, hipertermia, infeksi virus, dan radikal bebas, sedangkan sinyal negatif terjadi jika tidak ada faktor pertumbuhan, hormon, dan sitokin sehingga sel gagal untuk mensupresi apoptosis. Semua sinyal tersebut dapat menyebabkan terbukanya lubang *mitochondrial permeability transition* (MPT), hilangnya potensial transmembran mitokondria, dan keluarnya 2 grup protein pro-apoptosis menuju sitosol (Saelens *et al.*, 2004).

Grup pertama protein pro-apoptosis yang dikeluarkan terdiri dari *cytchrome c*, *Smac/DIABLO*, dan *HtrA2/Omi* (Cai *et al.*, 1998; Du *et al.*, 2000; Loo *et al.*, 2002; Garrido *et al.*, 2005). *Cytchrome c* berikatan dan mengaktivasi Apaf-1 sebagai pro-caspase-9 membentuk apoptosome (Chinnaiyan, 1999; Hill *et al.*, 2004). Aktivasi pro-caspase-9 akan mengaktivasi caspase-9 yang nantinya akan mengaktivasi caspase-3. *Smac/DIABLO* dan *HtrA2* akan menginduksi apoptosis dengan menghambat protein inhibitor apoptosis (IAP) (van Loo *et al.*, 2002; Schimmer, 2004). Hambatan IAP saja pada percobaan *gene knockout* gen

IAP tidak cukup menginduksi terjadinya apoptosis (Ekert andvaux, 2005; Hill *et al.*, 2004).

Grup kedua protein pro-apoptosis yang dikeluarkan terdiri dari AIF, endonuklease G, dan CAD. AIF mentranslokasi nukleus dan menyebabkan fragmentasi DNA kedalam 50-300 potongan dan mengkondensasi kromatin nukleus perifer (Joza *et al.*, 2001). Endonuklease G bertranslokasi ke dalam nukleus dan akan memecah kromatin nukleus untuk memproduksi fragmen DNA oligonukleusomal (Li *et al.*, 2001). Kedua protein ini berfungsi tanpa berkaitan dengan kaskade caspase, sedangkan protein CAD akan bertranslokasi ke dalam nukleus setelah diaktivasi oleh caspase-3 (Elmore, 2007).

Kontrol dan regulasi jalur ini melalui anggota protein BCL-2 (Cory and Adams, 2002). Anggota BCL-2 mengatur pengeluaran *cytosome c* dari mitokondria melalui permeabilitas membran. Anggota BCL-2 dapat berupa pro-apoptosis ataupun anti-apoptosis (tabel 2.4). Anggota anti-apoptosis BCL-2 seperti Bcl-2 dan Bcl-X_L menghambat permeabilisasi membran luar mitokondria dengan menghambat pro-apoptosis BCL-2 seperti Bax dan Bak. Protein anti-apoptosis juga menghambat pengeluaran *cytosome c*. Puma dan Noxa merupakan anggota pro-apoptosis yang berhubungan dengan p53-mediati apoptosis. Ekspresi berlebihan dari Puma berhubungan dengan peningkatan Bax, bentuk Bax berubah, translokasi ke mitokondria, menghasilkan c-sitokrom, dan mereduksi membran potensial mitokondria (Liu *et al.*, 2003).

Tabel 2.4 Anggota Pro- dan Anti-Apoptotic Protein BCL-2 Superfamily(Lessene *et al.*, 2008)

BCL-2 superfamily		
Pro-apoptotic		Anti-apoptotic
BH3-only proteins	Multidomain (BH)	BCL-2
BIK	BAX	BCL-X _L
BAD	BAK	BCLW
BIM	BOK	MCL1
HRK	BOO	BCLB
BCLG	BCLG	+ viral homologs
HR	BCLB	
NOXA	BCL-RAMBO	
PUMA		
+ others		

2.4.3 Jalur Perforin atau Granzym

T-sel mediasi sitotoksik merupakan varian tipe IV hipersensitivitas yang disensitisasi melalui sel CD8+ membunuh sel antigen. Sitotoksik T-limposit (CTLs) mampu membunuh target melalui jalur ekstrinsik dan FasL/FasR interaksi dominan dalam cara CTLs-induksi apoptosis (Brunner *et al.*, 2003). Sel T sitotoksik dapat menginduksi apoptosis melalui cara sekresi perforin (*transmembrane pore-forming molecule*). Sekresi perforin diikuti dengan pelepasan 2 *cytoplasmic granule*, yaitu *granzym A* dan *granzym B*, pada lubang yang telah terbentuk (Brunner *et al.*, 2003; Trapani dan Smyth, 2002). *Granzym B* memotong protein pada residu aspartat yang akan mengaktivasi pro-caspase-10 sehingga dapat memotong faktor ICAD (*Inhibitor of Caspase Activated DNAase*)(Sakahira *et al.*, 1998). *Granzym B* juga dapat membantu jalur intrinsik dengan cara pemotongan spesifik Bid dan induksi pengeluaran *cytosome c*. Selain itu, *granzym B* dapat langsung mengaktivasi caspase-3 (Barry dan Bleackley, 2002; Russell dan Ley, 2002). Melalui jalur intrinsik dan aktivasi

langsung caspase-3 merupakan peran *granzym B* dalam menginduksi apoptosis (Goping *et al.*, 2003). Sedangkan *granzym A* berperan dalam apoptosis melalui jalur independen caspase melalui aktivasi DNA-*nicking* via DNase NM23-H1, sebuah produk gen penekan tumor (Fan *et al.*, 2003). DNase memiliki peran dalam mencegah kanker melalui apoptosis sel tumor. Nukleosom merakit protein SET yang normalnya menghambat gen NM23-H1. *Granzym A* protease membelah kompleks SET maka akan menghambat NM23-H1, menghasilkan apoptosis degradasi DNA. SET juga berperan dalam struktur kromatin dan perbaikan DNA (Elmore, 2007).

2.5 Caspase

Kaskade caspase memerankan hal penting dalam induksi, transduksi, amplifikasi, dan eksekusi apoptosis. Caspase dapat dibagi menjadi tiga kategori, yaitu inisiator (caspase-2, -8, -9, dan -10), eksekutor atau efektor (caspase-3, -6, dan -7), dan inflamasi (caspase-1, -4, dan -5) (Cohen, 1997; Rai *et al.*, 2005).

2.5.1 Caspase-3

Caspase-3 merupakan *cytosolic aspartate-specific cysteine protease* yang berperan dalam eksekusi apoptosis yang diaktifkan melalui jalur intrinsik, ekstrinsik, dan perforin dan akan mengakibatkan fragmentasi DNA, degradasi sitoskeletal dan protein nukleus, *cross-linking* protein, pembentukan badan apoptosis, ekspresi ligan untuk reseptor sel fagosit, dan diambil oleh sel-sel fagosit (Elmore, 2007).

Jalur eksekusi mengaktifasi endonuklease sitoplasmik yang mendegradasi materi nuklear dan protein sitoskeletal. Caspase eksekutor

membelah banyak substrat, antara lain sitokeratin, PARP, membran plasmaprotein sitoskeletal alfa fodrin, dan protein nuklear NuMA, yang mengakibatkan perubahan biokimia dalam sel apoptosis (Slee *et al.*, 2001). Caspase-3 merupakan eksekutor terpenting dan diaktivasi oleh caspase inisiator. Caspase-3 memecah antara ICAD (*Inhibitor Caspase-Activated DNase*) dan CAD (*Caspase-Activated DNase*) untuk menghasilkan CAD yang akan mendegradasi kromosom DNA dengan nukleus dan menyebabkan kondensasi kromatin. *Uptake* fagosit merupakan tahapan akhir. Fosfolipid asimetri dan eksternalisasi fosfatidilserin pada permukaan sel apoptosis dan fragmennya merupakan *hallmark* pada fase ini (Elmore, 2007).

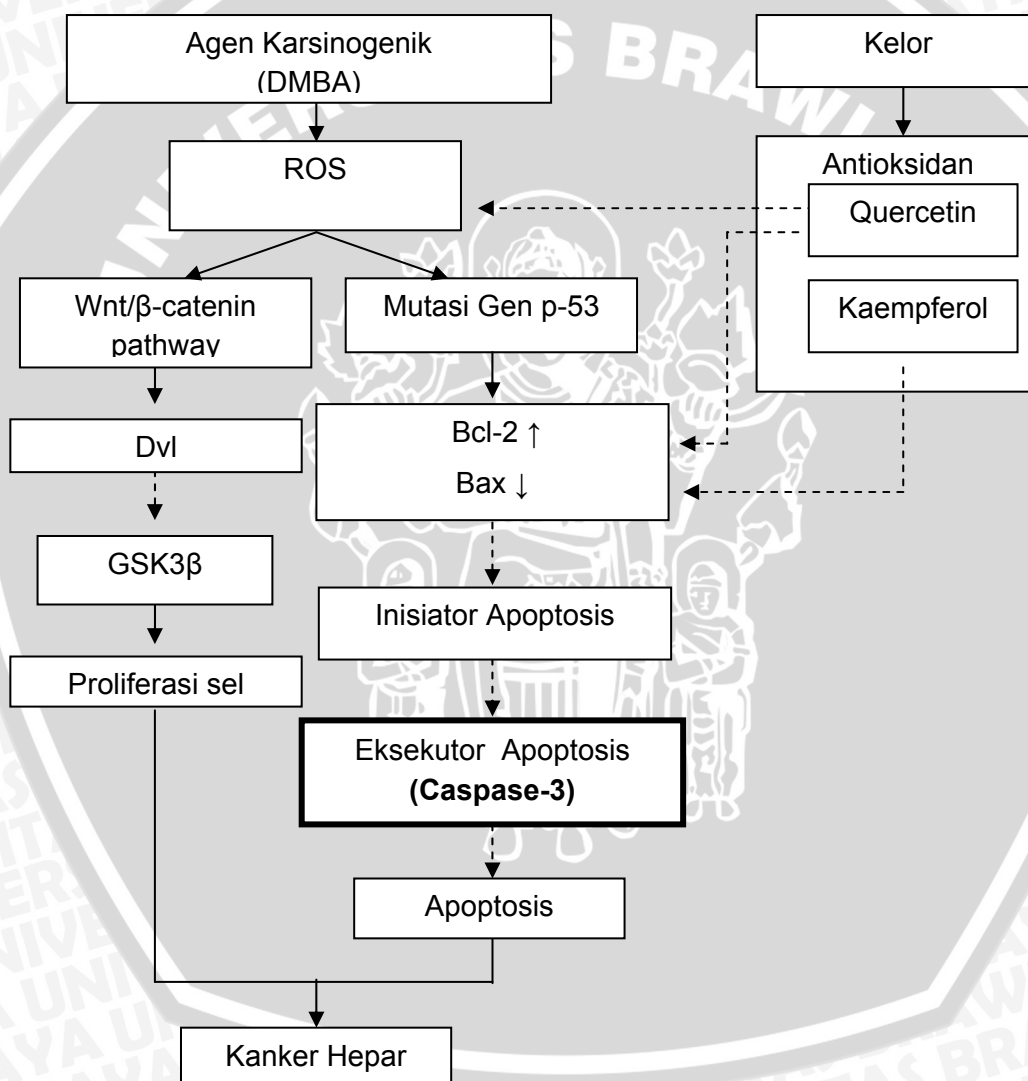
2.6 Hubungan antara *Moringa oleifera*, Kanker Hepar, dan Caspase-3

Pada kanker hepar, proses apoptosis terhambat oleh adanya mutasi gen p-53 yang merupakan gen penekan tumor dan adanya proliferasi yang meningkat karena aktivasi jalur Wnt/ β -catenin (Wong and Ng, 2007). Mutasi gen p-53 menyebabkan peningkatan ekspresi anti-apoptosis Bcl-2 dan penurunan ekspresi pro-apoptosis Bax di mitokondria. Proses ini menghambat *mitochondrial intrinsic apoptotic pathway* sehingga caspase inisiator tidak dapat aktif dan apoptosis tidak dapat terjadi. *Moringa oleifera* mengandung flavonoid, yaitu kaempferol dan quercetin yang dapat menginduksi aktivasi caspase-2, -3, -8, -9, dan -10 sehingga dapat mengaktivasi jalur apoptosis intrinsik dan ekstrinsik serta mengurangi aktivitas dari anti-apoptosis Bcl-2 pada mitokondria dan sebaliknya, meningkatkan ekspresi Bax (Erhart *et al.*, 2005).

BAB3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

Keterangan :



: Yang diteliti ;



: Efek menghambat ;



: Efek meningkatkan

3.2 Penjelasan Kerangka Konsep

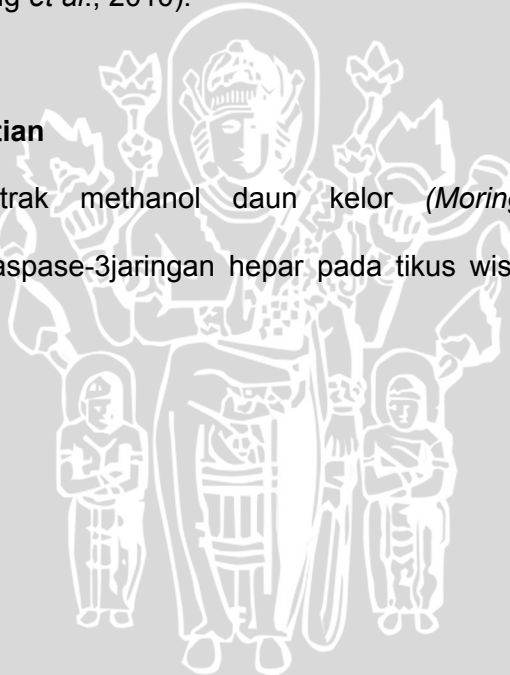
Agen karsinogenik 7,12 dimetilbenz (α) antrasen (DMBA) merupakan zat kimia yang termasuk dalam *polycyclic aromatic hydrocarbon*(PAH) yang dikenal bersifat mutagenik, karsinogenik, sitotoksik, dan immunosupresif (Smith *et al.*, 1999; Spitsbergen *et al.*, 2000; Miyata *et al.*, 2001; Wijnhoven *et al.*, 2001; Lindhe *et al.*, 2002; Buters *et al.*, 2003; Currier *et al.*, 2005). Agen ini menginduksi produksi *reactive oxygen species* (ROS). Produksi yang sangat berlebihan dari ROS akibat stress oksidatif dapat menginduksi pecahnya untai dan terjadinya modifikasi basa DNA yang berkontribusi pada mutagenesis dan karsinogenesis (Paliwal *et al.*, 2011; Manoharan *et al.*, 2009). ROS dapat menyebabkan penurunan fungsi dan mutasi pada gen p53 sehingga apoptosis menjadi terhambat (Royds and Iacopetta, 2006). Selain itu, DMBA juga dapat meningkatkan aktivasi jalur Wnt/ β -catenin yang akan meningkatkan proliferasi sel (Currier *et al.*, 2005). Gabungan antara penurunan apoptosis dan peningkatan proliferasi sel inilah yang dapat memicu terjadinya kanker (Bree *et al.*, 2002).

Mutasi gen p53 akan mengakibatkan peningkatan protein anti-apoptosis, yaitu Bcl-2, dan penurunan protein pro-apoptosis, yaitu Bax. Hal ini menyebabkan penghambatan inisiator caspase, yaitu caspase-9, sehingga caspase-3 sebagai eksekutor apoptosis tidak teraktivasi (Acehan *et al.*, 2002; Bloom, 2009). Akibatnya apoptosis juga akan menurun sehingga menyebabkan terjadinya kanker. Peningkatan aktivasi jalur Wnt/ β -catenin akan meningkatkan *phosphorylation of disheveled* (Dvl), sehingga akan menekan aktivitas kinase dari GSK-3 β , dan menghasilkan stabilisasi β -catenin sehingga terjadi peningkatan proliferasi (Wong and Ng, 2007; Saffroy *et al.*, 2006).

Moringa oleifera mengandung senyawa polifenolat, yakni kaempferol dan quercetin. Kedua zat tersebut merupakan flavonoid yang memiliki fungsi sebagai antioksidan. Quercetin dan kaempferol diketahui dapat menurunkan protein anti-apoptosis keluarga BCL-2 seperti Bcl-2 serta meningkatkan anggota pro-apoptosisnya seperti Bax (Granado-Serrano *et al.*, 2006; Marfeet *et al.*, 2009). Quercetin juga dapat menghambat aktivitas jalur Wnt/ β -catenin (Park *et al.*, 2005) dan juga menghambat aktivitas ROS (Priyadarsini and Nagini S, 2012). Kaempferol dan quercetin menginduksi apoptosis dengan meningkatkan aktivasi caspase-3 (Kang *et al.*, 2010).

3.3 Hipotesis Penelitian

Pemberian ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat meningkatkan kadar caspase-3 jaringan hepar pada tikus wistar yang diinduksi DMBA.



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Rancangan eksperimental yang digunakan adalah rancangan eksperimen sederhana (*post test control group design*) dimana subjek 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 dan ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dalam berbagai dosis.

4.2 Binatang Coba

4.2.1 Binatang Coba, Objek, dan Teknik Randomisasi

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

Objek penelitian yang dipakai adalah tikus wistar jenis kelamin jantan, dewasa dengan umur ± 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, dan tikus yang sakit dalam masa persiapan atau adaptasi.

4.3 Variabel Penelitian

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

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar caspase-3 dalam jaringan. Variabel kendali adalah variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti agar objek penelitian selalu terkendali dan dalam keadaan homogen. Variabel kendali dalam penelitian ini meliputi:

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

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

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

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat

1. Alat Pemeliharaan Binatang Coba

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

2. Alat Pembuat Makanan Binatang Coba

Baskom plastik, timbangan, sarung tangan, dan gelas ukur.

3. Alat Pengambilan Sampel

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

4. Alat pemeriksaan caspase-3 jaringan hepar adalah *Spectrophotometer* atau *Microtiter plate reader* 450 nm.

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, dan coccidiostat 53%), tepung terigu 23,5%, dan air 23,5%.

2. Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*)

Proses ekstraksi menggunakan 42 gram tepung daun kelor (*Moringa oleifera*) kemudian rendam dengan methanol 96% sampai volume 900 ml, dikocok 30 menit lalu dibiarkan semalam. Ambil lapisan atas campuran methanol dengan zat aktif lalu pindahkan ke dalam *rotary evaporator*. Tunggu sampai aliran methanol berhenti menetes pada labu penampung (1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu). Hasil yang diperoleh kira-kira sepertiga dari bahan alam kering. Simpan dalam freezer (Laboratorium Farmakologi FKUB).

3. Bahan Pemeriksaan ELISA

Supernatan ekstrak jaringan hepar, RAT CASPASE-3, CASP-3 ELISA Kit unit.

4.6 Definisi Operasional

1. Ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*)

Perlakuan (intervensi) adalah pemberian suplementasi ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) 0, 20, 40, 80 mg/ml per hari dengan cara dimasukkan per oral dengan sonde (Parvathy and Umamaheswari, 2007) satu kali sehari sekitar pukul 10.00.

2. Tikus model kanker hepar

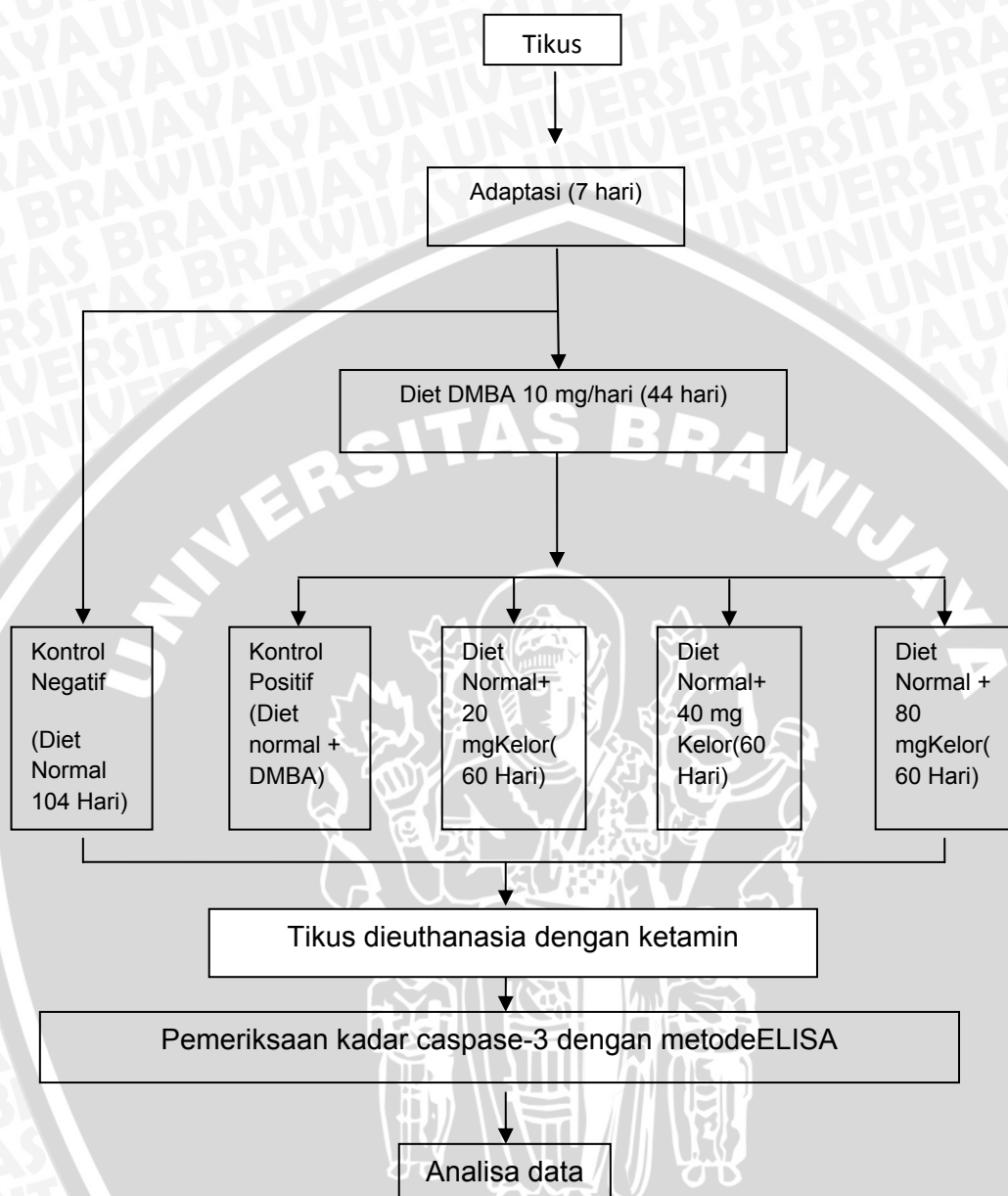
Tikus wistar diberi 10 mg/ml/hari 7, 12-dimethylbenz(α)anthracene (DMBA) per oral (sonde) selama 44 hari.

3. Caspase-3 dalam jaringan hepar

Kadar caspase-3 pada sampel diukur dengan *double-antibody enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Pertama, masukkan sampel pada *wells pre-coated* dengan *one* RAT CASPASE-3, CASP-3 *antibody* untuk menangkap analit yang ada pada solusi, dan lakukan inkubasi dan prosedur pencucian untuk membuang substansi yang tidak terikat. Kemudian, tambahkan *second* HRP-*conjugated* RAT CASPASE-3, CASP-3 *antibody* untuk mengikat analit yang telah tertangkap, diikuti dengan inkubasi dan prosedur pencucian untuk membuang substansi yang tidak terikat antibodi HRP. Akhirnya, tambahkan substrat HRP, inkubasikan untuk deteksi, kemudian akan timbul warna biru. Stop reaksi dan warna akan berubah menjadi kuning ketika *stopping solution* ditambahkan. Intensitas warna kuning secara proporsional berkaitan dengan konsentrasi RAT CASPASE-3, CASP-3 pada sampel (NovaTeinBio, Inc., USA).

4.7 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh pengetahuan mengenai efek ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap kadar caspase-3 pada jaringan hepar tikus (*Rattus norvegicus*) wistar dengan diet DMBA. Alur penelitian dapat dijelaskan melalui bagan berikut:



Gambar 4.1 Alur Penelitian

Keterangan:

Dilakukan adaptasi terhadap tikus selama 7 hari. Selanjutnya, selama 104 hari tikus kelompok perlakuan negatif hanya diberi diet normal, sedangkan tikus kelompok kontrol positif, perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3 diberi diet normal dan DMBA 10 mg/hari selama 44 hari pertama. Pada hari ke-45 sampai hari ke-104 (60 hari), tikus kelompok kontrol positif diberi diet normal tanpa pemberian ekstrak methanol daun kelor, sedangkan kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 diberikan ekstrak methanol daun kelor dengan sonde. Tikus kelompok perlakuan 1 diberi diet normal dan ekstrak methanol daun kelor per oral dengan dosis 20 mg/ml per hari, kelompok perlakuan 2 diberi diet normal dan ekstrak methanol daun kelor per oral dengan dosis 40 mg/ml per hari, kelompok perlakuan 3 diberi diet normal dan ekstrak methanol daun kelor per oral dengan dosis 80 mg/ml per hari. Pada hari ke-105 semua tikus dibius dengan ketamin, kemudian dibedah dan diambil jaringan heparnya. Selanjutnya, dilakukan pemeriksaan kadar caspase-3 dengan ELISA. Setelah didapatkan hasil, dilakukan analisis data.

4.7.1 Adaptasi

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

4.7.2 Induksi 7,12-dimethylbenz(a)anthracene(DMBA)

Tikus wistar diberi 10mg/hari 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) per oral (sonde). Pemberian DMBA dilakukan selama 44 hari. Pada hari ke-30 dan ke-44, masing-masing 1 ekor tikus yang diberi DMBA tanpa ekstrak *Moringa oleifera* dibunuh untuk melihat adanya perkembangan karsinogenesis pada jaringan hepar (Indra, 2011).

4.7.3 Perlakuan

4.7.3.1 Pemeliharaan

Dalam masa ini, kelima kelompok tikus mendapat perlakuan yang berbeda. Untuk kelompok I (kontrol negatif), tikus hanya diberi pakan normal (standar) saja selama 104 hari. Kelompok perlakuan II hingga V diberi diet DMBA sebanyak 10 mg/hari selama 44 hari dengan sonde. Setelah itu, pada hari ke-45 sampai hari ke-104 (60 hari), kelompok II diberi diet normal tanpa pemberian ekstrak methanol daun kelor, sedangkan kelompok III-V diberikan diet normal dan ekstrak methanol daun kelor dengan sonde. Kelompok III diberi ekstrak methanol daun kelor per oral dengan dosis 20 mg/ml per hari + diet normal. Kelompok IV diberi ekstrak methanol daun kelor per oral dengan dosis 40mg/ml per hari + diet

normal. Kelompok V diberi ekstrak methanol daun kelor per oral dengan dosis 80mg/ml per hari + diet normal.

4.7.3.2 Pembedahan

Pemeriksaan kadarcaspase-3 pada jaringanhepar tikus wistar pada eksperimen ini memerlukan jaringan hepar tikus. Penelitian ini merupakan penelitian payung yang meneliti efek ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) pada tikus (*Rattus norvegicus*)wistar yang diinduksi 7,12-*dimethylbenz(α)anthracene* (DMBA)dengan parameter yang berbeda-beda, antara lain: TNF- α , TRAIL-R1, caspase-8, caspase-9, dan lain-lain. Karena itu, setelah 60 hari pemberian per oral daun kelor,semua tikus dibunuh dengan cara pembiusan ketamin. Kemudian abdomen dibuka, sebagian jaringan hepar diambil untuk dilakukan pemeriksaankadarcaspase-3dengan RAT CASPASE-3, CASP-3 ELISA *Kit unit*. Lalu, bangkai tikus yang sudah tidak dipakai dikuburkan di tempat yang aman oleh petugas laboratorium.

4.7.3.3 Cara Pemeriksaan dengan ELISA Caspase-3

1. Induksi apoptosis dengan pemberian 3 dosis berbeda ekstrak daun kelor.
2. Ambil 100 mg sampel lalu digerus.
3. Tambahkan *Lysis Buffer BFF PMFS* lalu pindahkan ke tube.
4. Campur melalui *Vortex* selama kurang lebih 5 detik lalu masukkan dalam lemari es 3 °C selama 10 menit.
5. Sentrifugasi selama 10 menit dengan *microcentrifuge* 5000 rpm.

6. Pindahkan supernatan (ekstrak sitosol) dalam tube dan letakkan dalam es.
7. Setelah dikeluarkan dari refrigerator 2-8 °C, letakkan kit selama 30 menit pada suhu ruang sebelum digunakan.
8. Buatlah *standart* dan *sample dilution* dalam 96-well plate yang bersih. Encerkan 20X *wash solution* ke 1X *wash solution*.
9. Siapkan *standart wells*, uji *sample* dan *blank wells* pada *assay plate/strip*. Pindahkan *diluted standart* 50 µl ke *standart wells*, *diluted sample* 50 µl (10 µl *sample plus* 40 µl *sample diluents*) ke *sample wells*, *sample diluents* saja ke *blank wells*.
10. Inkubasi *plate* selama 30 menit dalam *incubator* 37 °C.
11. Pindahkan cairan dari *wells* sebanyak mungkin, isi *wells* dengan *washing solution*, goyang atau kocok *plate* pada *oscillating shaker* jika tersedia selama 1 menit, pindahkan *washing solution* dan bersihkan sisa cairan dengan kertas absorbent. Ulang pembersihan sebanyak 4 kali.
12. Tambahkan *HRP-conjugated antibody* 50 µl ke setiap *wells*, kecuali *blank well*. Mix dengan *shaking* dengan lembut dan inkubasi selama 30 menit dalam suhu 37 °C.
13. Bersihkan *plate* atau *strip* seperti cara 5.
14. Tambahkan *chromogenic Substrate A* dan *B*; *Substrate A* 50 µl dan *Substrate B* 50 µl ke setiap *well*. Campur dengan lembut, inkubasi selama 15 menit dalam suhu 37 °C.
15. Tambahkan *Stop Solution* 50 µl dengan segera ke setiap *well* di bagian atas reaksi (warna biru berubah jadi kuning).

16. Ukur *optical density* (OD) pada 450 nm selama 15 menit.

17. Buatlah kurva standar (merencanakan OD 450 rata-rata untuk setiap standar pada sumbu Y terhadap konsentrasi pada sumbu X, menggambar kecocokan log-logkurva melalui titik-titik) dan menghitung persamaan regresi linier, kemudian gunakan contoh nilai OD dan regresi persamaan untuk menghitung konsentrasi sampel yang sesuai. Ini harus diingat bahwa sampel telah diencerkan dan konsentrasi sebenarnya harus dibenarkan oleh faktor pengenceran (NovaTeinBio, Inc., USA).

4.8 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.
2. Uji homogenitas varian: menunjukkan bahwa data yang diperoleh memiliki varian yang homogen ($p > 0,05$), karena itu analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.
3. Uji *One-way* ANOVA: didapatkan nilai rata-rata kadar caspase-3 pada jaringan hepar tikus dari kelima populasi memang berbeda ($p < 0,05$). Dengan demikian terdapat minimal 2 kelompok yang berbeda signifikan.
4. *Post Hoc test* (ujiLSD): Uji *Post Hoc* yang digunakan adalah uji *Least Significant Difference (LSD) test* dengan tingkat kemaknaan 95% ($p < 0,05$).

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

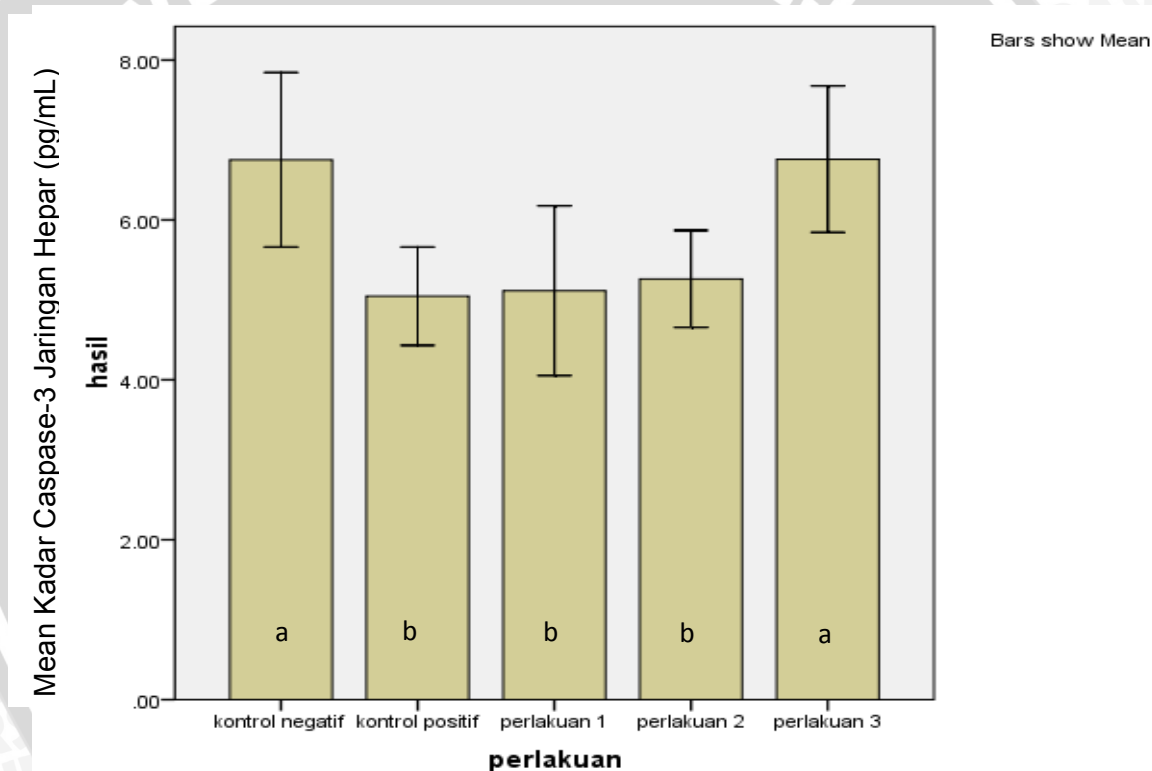
5.1 Hasil Penelitian

Pada penelitian ini didapatkan masing-masing data untuk masing-masing kelompok penelitian dari hasil pemeriksaan kadarcaspase-3 pada jaringan hepar tikus dengan metode ELISA. Pada penelitian ini terdapat lima macam perlakuan, yaitu kelompok pertama (kontrol negatif) adalah tikus yang diberi diet normal selama 104 hari, kelompok kedua (kontrol positif) adalah tikus yang diberi diet normal disertai induksi DMBA selama 44 hari, dan kelompok ketiga hingga kelima (perlakuan 1-3) adalah tikus yang diberi diet normal disertai induksi DMBA selama 44 hari dan ekstrak methanol selama 60 hari dengan dosis masing-masing kelompok 20, 40, 80 mg/ml/hari per oral dengan sonde sekali sehari.

Pengukuran caspase-3 dengan menggunakan *standart plate readeroptical density* (OD) pada 450 nm dilakukan terhadap semua kelompok dari jaringan hepar tikus. Data hasil pengukuran kadar caspase-3 tiap perlakuan ditampilkan pada tabel 5.1, sedangkan grafik rata-rata masing-masing perlakuan dapat dilihat pada gambar 5.1. Rata-rata pada masing-masing kelompok perlakuan dihitung dengan cara menjumlahkan semua kadar caspase-3 pada masing-masing kelompok perlakuan kemudian dibagi dengan jumlah sampel pada masing-masing kelompok perlakuan. Sampel dari tiap kelompok perlakuan diambil empat karena jumlah pengulangan yang dibutuhkan untuk tiap-tiap kelompok perlakuan dalam penelitian ini adalah empat.

Tabel 5.1 Data Hasil Pengukuran Kadar Caspase-3 Jaringan Hepar

Sampel	Mean caspase-3 (pg/mL)	Standar deviasi
Kontrol Negatif (K-)	6,7532	1,09155
Kontrol Positif (K+)	5,0475	0,61511
Perlakuan 1 (P 1)	5,1150	1,06174
Perlakuan 2 (P 2)	5,2625	0,60566
Perlakuan 3 (P 3)	6,7600	0,91626



Gambar 5.1 Grafik Hubungan Antara Kelompok Perlakuan dan Kadar Caspase-3 Jaringan Hepar

Keterangan: Kontrol negatif (diet normal selama 104 hari); Kontrol positif (diet normal + induksi DMBA selama 44 hari); Perlakuan 1 (diet normal + induksi DMBA selama 44 hari + kelor 20 mg/ml/hari); Perlakuan 2 (diet normal + induksi DMBA selama 44 hari + kelor 40 mg/ml/hari); Perlakuan 3 (diet normal + induksi DMBA selama 44 hari + kelor 80 mg/ml/hari).

5. 2 Analisis Data

Berdasarkan data tabel 5.1, didapatkan rata-rata kadar caspase-3 pada jaringan hepar tikus tiap perlakuan, yaitu kelompok kontrol negatif (diet normal selama 104 hari) adalah 6,7532; kelompok kontrol positif (diet normal + induksi DMBA selama 44 hari) adalah 5,0475; kelompok perlakuan 1 (diet normal + induksi DMBA selama 44 hari + kelor 20 mg/ml/hari) adalah 5,115; kelompok perlakuan 2 (diet normal + induksi DMBA selama 44 hari + kelor 40 mg/ml/hari) adalah 5,2625; dan kelompok perlakuan 3 (diet normal + induksi DMBA selama 44 hari + kelor 80 mg/ml/hari) adalah 6,76. Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan menggunakan program komputer SPSS 16 untuk Windows 7.

Data hasil rata-rata kadar caspase-3 menunjukkan bahwa kadar caspase-3 terendah terdapat pada kelompok kontrol positif (diet normal + induksi DMBA selama 44 hari), yaitu 5,0475. Sedangkan kadar caspase-3 tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan 3 (diet normal + induksi DMBA selama 44 hari + kelor 80 mg/ml/hari), yaitu 6,76. Rata-rata kadar caspase-3 yang terdapat pada tabel 5.1 menunjukkan bahwa pada kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 yang mendapat diet normal, DMBA, dan ekstrak methanol daun kelor memiliki kadar caspase-3 yang lebih tinggi daripada kelompok kontrol positif ($p=0,020$).

Hasil penelitian kemudian diuji dengan uji normalitas (lampiran 2) menggunakan Shapiro-Wilk. Distribusi data hasil penelitian ini adalah normal karena nilai $p > 0,05$ pada semua kelompok. Kemudian dilakukan uji homogenitas (lampiran 4) menggunakan *Levene test* dengan hasil tampak bahwa data berasal dari populasi-populasi yang memiliki varian sama ($p=0,858$). Oleh karena data hasil penelitian memiliki distribusi normal dan varian yang homogen, dapat dilakukan pengujian *One-way ANOVA*. Uji ANOVA (*Analysis of Variance*)

(lampiran5) dilakukan untuk menguji apakah kelima kelompok memiliki rata-rata (*mean*) yang sama. Berdasarkan hasil tes tersebut didapatkan bahwa rata-rata kadar caspase-3 dari kelima populasi memang berbeda ($p=0,020$). Dengan demikian terdapat minimal 2 kelompok yang berbeda signifikan.

Berdasarkan hasil *Post hoc test Least Significant Difference (LSD) test* (lampiran 6) didapatkan perbedaan kadar caspase-3 yang signifikan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif ($p=0,015$), perlakuan 1 (diet normal + induksi DMBA selama 44 hari + kelor 20 mg/ml/hari) ($p=0,019$), dan perlakuan 2 (diet normal + induksi DMBA selama 44 hari + kelor 40 mg/ml/hari) ($p=0,031$). Perbedaan kadar caspase-3 yang signifikan juga terdapat antara kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan 3 (diet normal + induksi DMBA selama 44 hari + kelor 80 mg/ml/hari) ($p=0,015$), serta antara kelompok perlakuan 3 (diet normal + induksi DMBA selama 44 hari + kelor 80 mg/ml/hari) dengan kelompok perlakuan 1 (diet normal + induksi DMBA selama 44 hari + kelor 20 mg/ml/hari) ($p=0,019$) dan perlakuan 2 (diet normal + induksi DMBA selama 44 hari + kelor 40 mg/ml/hari) ($p=0,030$).

Hasil analisis *LSD test* yang tidak signifikan ($p>0,05$) terdapat antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok perlakuan 3 (diet normal + induksi DMBA selama 44 hari + kelor 80 mg/ml/hari) ($p=0,992$), analisis antara kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan 1 (diet normal + induksi DMBA selama 44 hari + kelor 20 mg/ml/hari) ($p=0,915$) dan perlakuan 2 (diet normal + induksi DMBA selama 44 hari + kelor 40 mg/ml/hari) ($p=0,736$), serta analisis antara kelompok perlakuan 1 (diet normal + induksi DMBA selama 44 hari + kelor 20 mg/ml/hari) dengan perlakuan 2 (diet normal + induksi DMBA selama 44 hari + kelor 40 mg/ml/hari) ($p=0,817$).

Berdasarkan hasil-hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa DMBA dapat menurunkan kadar caspase-3 dan ekstrak methanol daun kelor dapat meningkatkan kadar caspase-3. Berdasarkan grafik, juga dapat dilihat peningkatan caspase-3 pada perlakuan 1, 2, dan 3, maka dosis respon ekstrak methanol daun kelor yang memiliki efek paling besar dalam meningkatkan kadar caspase-3 hingga mendekati normal adalah 80 mg/ml per hari.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB 6

PEMBAHASAN

Kanker hepar atau *hepatocellular carcinoma* (HCC) merupakan salah satu dari lima ranking teratas kanker yang menyebabkan kematian. Kanker hepar menyebabkan sekitar 700.000 kematian di dunia dengan *incidence rate* 10,8 dan *mortality rate* 9,9 per 100.000 penduduk (Globocan, 2008). Insiden kanker hepar (hepatoseluler karsinoma) di Asia Tenggara relatif tinggi pada laki-laki (18,35 per 100.000 penduduk) daripada wanita (5,70 per 100.000) penduduk (Poedjomartono dan Sudarmanto, 2008). Kanker hepar diduga terjadi karena berkaitan dengan fungsi hepar untuk detoksifikasi sehingga bisa menyebabkan *chemical injury* di hepar sehingga menginduksi DNA menjadi rusak. DNA yang rusak ini dapat menginduksi terjadinya mutasi atau translokasi sel yang dapat menyebabkan transformasi neoplastik (Kumar *et al.*, 2003). DMBA merupakan salah satu polutan yang merupakan produk degradasi dari *polycyclic aromatic hydrocarbons* (PAH). PAH merupakan kelompok polutan organik yang dikeluarkan dalam jumlah banyak ke dalam lingkungan. DMBA ini bersifat karsinogenik, sitotoksik, mutagenik, dan menekan sistem imun (Smith *et al.*, 1999; Spitsbergen *et al.*, 2000; Miyata *et al.*, 2001; Wijnhoven *et al.*, 2001; Lindhe *et al.*, 2002; Buters *et al.*, 2003). DMBA biasanya dihasilkan dari pembakaran atau pemasakan yang tidak sempurna dengan suhu tinggi. Terapi kanker hepar yang ada saat ini bisa dibagi jadi empat kategori intervensi, yaitu intervensi operasi (reseksi tumor dan transplantasi hepar), intervensi perkutaneus (injeksi

ethanol, ablasi dengan panas radiofrekuensi), intervensi trans-arterial (embolisasi atau kemoperfusi), dan intervensi obat-obatan termasuk terapi imun dan gen (Blum, 2005). Salah satu obat yang berpotensi untuk pencegahan penyakit kanker hepar adalah daun kelor (*Moringa oleifera*) (Fahey, 2005; Bharali et al., 2003). Daun Moringa telah dikenal sebagai antibiotik dan proteksi terhadap kanker (Rebecca et al., 2006). Daun Moringa memiliki kandungan flavonoid, yaitu kaempferol dan quercetin, yang merupakan antioksidan. Daun Moringa memiliki peran penting dalam meningkatkan kadar caspase-3 jaringan hepar sebagai upaya pencegahan kanker hepar karena kaempferol dan quercetin memiliki aktivitas anti-radikal yang lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa flavonol lainnya dan juga terbukti menginduksi apoptosis dengan meningkatkan aktivasi caspase-3 melalui peningkatan ekspresi sitokrom c (Bennett et al., 2003; Kang et al., 2010).

Pada penelitian eksperimental ini terdapat lima perlakuan dan didapatkan hubungan antara dosis ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan rata-rata kadar caspase-3. Pada kelompok kontrol positif yang diinduksi DMBA dan diberi diet normal didapatkan kadar caspase-3 yang lebih rendah dibanding kontrol negatif yang diberi diet normal namun tidak diinduksi DMBA, yaitu awalnya 6,7532 menjadi 5,0475. Penurunan kadar caspase-3 ini karena DMBA yang diinduksikan bersifat karsinogenik sehingga menyebabkan penghambatan apoptosis karena adanya mutasi gen. Pada penelitian ini DMBA memang belum menyebabkan kanker hepar. Namun, DMBA ini terbukti sebagai salah satu zat yang dapat memicu kanker atau bersifat karsinogenik karena telah terjadi gangguan apoptosis pada tikus kelompok kontrol positif, dimana terdapat penurunan kadar caspase-3 pada kelompok tersebut karena induksi DMBA.

Pada penelitian Oktaviana (2012) DMBA mampu meningkatkan jumlah NF- κ B dan menurunkan ekspresi TRAIL-R1 jaringan hepar pada penelitian Saputra(2012). Pada jaringan hepar ini terjadi disregulasi pada jalur-jalur sinyal yang normalnya mengontrol proliferasi sel dan apoptosis, sehingga gambaran ini merupakan karakteristik tahap promosi pada hepatokarsinogenesis (Guicciardi and Gores, 2005). Selanjutnya, pada tikus yang diberi ekstrak kelor dengan dosis 20, 40, dan 80 mg/ml/hari, terdapat peningkatan rata-rata kadar caspase-3, yaitu masing-masing 5,115; 5,2625; dan 6,76. Peningkatan rata-rata kadar caspase-3 ini karena daun kelor mengandung antioksidan yang dapat menginduksi apoptosis pada sel hepar tikus wistar. Dan dosis respon dalam penelitian ini adalah 80 mg/ml/hari, sebab pada pemberian dosis 80 mg/ml/hari rata-rata kadar caspase-3 jaringan hepar sudah dapat meningkat mendekati normal.

Moringa oleifera mengandung senyawa polifenolat, yakni quercetin dan kaempferol. Kedua zat tersebut merupakan flavonoid yang memiliki fungsi sebagai antioksidan. *Moringa oleifera* memiliki konsentrasi quercetin antara 1,62-0,066% dan kaempferol sekitar 0,673-0,054% (Coppin, 2008). Namun penelitian ini masih menggunakan ekstrak kasar dari daun kelor, belum dilakukan uji ekstrak murni dari daun kelor yang berupa quercetin dan kaempferol. Quercetin dan kaempferol dapat menurunkan protein anti apoptosis keluarga BCL-2 seperti Bcl-2 serta meningkatkan anggota pro-apoptosisnya seperti Bax (Granado-Serrano *et al.*, 2006; Marfeet *et al.*, 2009). Quercetin juga dapat menghambat aktivitas jalur Wnt/ β -catenin (Park *et al.*, 2005) dan juga menghambat aktivitas ROS (Priyadarsini and Nagini S, 2012). Protein anti-apoptosis Bcl-2 menghambat pengeluaran *cytochrome c* dari mitokondria serta menghambat permeabilisasi membran luar mitokondria dengan menghambat pro-apoptosis BCL-2 seperti

Bax(Liu *et al.*, 2003). Melalui pemberian daun kelor, maka akan meningkatkan protein pro-apoptosis sehingga menginduksi pelepasan *cytochrome c* dari mitokondria sehingga mengaktivasi Apaf-1 sebagai pro-caspase-9 membentuk apoptosome (Chinnaiyan, 1999; Hill *et al.*, 2004). Aktivasi pro-caspase-9 akan mengaktivasi caspase-9 yang nantinya akan mengaktivasi caspase-3. Quercetin juga dapat meningkatkan proses apoptosis melalui induksi TNF- α (Son YO *et al.*, 2006). Saat TNF- α berikatan dengan reseptor apoptosis, maka protein adaptornya, yaitu TRADD, juga berikatan dengan reseptor(Hsu *et al.*, 1995; Grimm *et al.*, 1996;Wajant, 2002). Protein adaptor intraselular tersebut akan berikatan dengan pro-caspase-8 dengan cara dimerisasi, kemudian terjadi aktivasi *autocatalytic* pro-caspase-8. Kemudian caspase-8 yang telah aktif akan mengaktivasi caspase-3 (Elmore, 2007). Aktivasi jalur intrinsik melalui caspase-9 dan jalur ekstrinsik melalui caspase-8 akan menginduksi aktivasi caspase-3 sebagai eksekutor apoptosis.

Dosis respon untuk meningkatkan caspase-3 mendekati normal pada penelitian ini yang tinggi, yaitu 80 mg/ml untuk meningkatkan caspase-3 sangat mungkin berhubungan dengan fungsi homeostasis sel. Pada penelitian Hilda (2012) dengan judul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Methanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Terhadap Aktivitas Caspase-8 Jaringan Hepar pada Tikus Wistar yang Diinduksi 7,12 *Dimethylbenz(a)Anthracene*(DMBA)” didapatkan pada dosis 20 mg/ml ekstrak methanoldaun kelor telah mampu meningkatkan kadar caspase-8. Pada penelitian Heidi (2012), dengan judul“Pengaruh Ekstrak Metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Terhadap Kadar Caspase-9 Jaringan Hepar pada Tikus Wistar yang Diinduksi 7,12 *Dimethylbenz(a)Anthracene*(DMBA)” dosis optimal daun kelor untuk

meningkatkan caspase-9 adalah 40 mg/ml. Pengaktifan caspase-3 sebagai eksekutor memerlukan induksi terlebih dahulu dari faktor ekstrinsik atau faktor intrinsik yang akan mengaktifkan caspase-8 atau caspase-9. Pada sel yang telah diinisiasi menjadi sel kanker lewat induksi DMBA juga memiliki fungsi homeostasis, dimana sel kanker tersebut akan mempertahankan kondisi konstan di dalam lingkungan sel. Maka pada dosis respon yang mampu untuk mengaktifkan caspase-8 atau caspase-9 pada sel kanker tersebut, belum bisa menjadi dosis respon untuk mengaktifkan caspase-3 karena adanya homeostasis dalam sel tersebut yang mempertahankan kondisi yang tidak mendukung terjadinya apoptosis pada dosis di bawah 80 mg/ml.

Pada penelitian ini belum bisa ditentukan dosis efektif, yaitu dosis obat terkecil yang diberikan dimana akan terjadi efek yang diharapkan, serta dosis optimal, yaitu dosis yang menghasilkan efek yang diinginkan tanpa efek samping, karena kurangnya variasi dosis yang digunakan serta belum melewati semua tujuh tahap riset untuk sebuah obat atau kandungan kimia dengan menggunakan sampel yang lebih banyak.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

1. Pemberian ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat meningkatkan jumlah kadar caspase-3 pada jaringan hepar tikus (*Rattus norvegicus*) wistar yang diinduksi 7,12 dimethylbenz(α)anthracene (DMBA).
2. Dosis respon dari ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) yang mempunyai efek paling besar dalam meningkatkan kadar caspase-3 hingga mendekati normal pada jaringan hepar tikus (*Rattus norvegicus*) wistar yang diinduksi 7,12 dimethylbenz(α)anthracene (DMBA) adalah 80 mg/ml/hari.

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui dosis efektif dan optimal dari ekstrak daun kelor dengan tujuh tahapan riset yang lengkap dan sampel yang lebih banyak agar keakuratan potensi daun kelor lebih baik.
2. Perlu penelitian yang menggunakan ekstrak murni daun kelor dengan kandungan quercetin dan kaempferol.
3. Perlu penelitian lebih lanjut mengenai efek daun kelor dengan menggunakan hewan yang lebih tinggi tingkatnya, seperti kera, agar efeknya lebih dekat pada manusia.

DAFTAR PUSTAKA

- Acehan, D, Jiang, X, Morgan, DG, Heuser, JE, Wang, X and Akey, CW. 2002. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 9(2): 423-32.
- Adami HO, Chow WH, Nyren O, Berne C, Linet MS, Ekbom A, Wolk A, McLaughlin JK, Fraumeni JF Jr. 1996. Excess Risk Of Primary Liver Cancer In Patients With Diabetes Mellitus. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1472-1477.
- Ahn J, Flamm SL. 2004. Hepatocellular Carcinoma. *Dis Mon* 2004; 50: 556-573.
- Al-Attar AM. 2004. The Influence of Dietary Grapeseed Oil on DMBA-Induced Liver Enzymes Disturbance in the Frog, *Rana ridibunda*. *Pakistan Journal of Nutrition* 3 (5): 304-309.
- Ali, Ahsan. 2008. Molecular Mechanisms of Apoptosis. Brief Review. *EurAsian Journal of BioMedicine* Vol. 1 No. 5: 19-23.
- American Cancer Society. 2011. *Liver Cancer*, (Online), (<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003114-pdf.pdf>, diakses 24 November 2011).
- American Society of Clinical Oncology. 2011. *Liver Cancer*, (Online), (<http://www.cancer.net/cancer-types/liver-cancer/risk-factors-and-prevention>, diakses 24 November 2011).
- Anonim. 2004. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*. Department of The Environment, Water, Heritage and Arts Australia. (Online), (www.environment.gov.au.au/index.html, diakses 12 Januari 2012).
- Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305–8.
- Ayinde BA, Onwukaeme DN, Omogbai EKI. 2007. Isolation and characterization of two phenolic compounds from the stem bark of *Musanga cecropioides* R. Brown (*Moraceae*). *Acta Pol. Pharm.* 64: 183-185.
- Barry, M., and Bleackley, R. C. 2002. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2, 401–9.
- Bennett R., Mellon F., Pratt J., Dupont M., Pernins L., dan Kroon P. 2003. Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive

tissues of multi-purpose trees *Moringa oleifera* L. (horseradish tree) and *Moringa stenopetal* L. *J. Agric. Food Chem*, 51: 3546-5553.

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

Bloom, Raquel Zorah. 2009. *Antioxidant and Anti-Proliferative Properties Of Selected Grape Seed Extracts*. Thesis. Faculty of the Graduate School of the University of Maryland, College Park.

Blum HE. 2005. Hepatocellular Carcinoma: Therapy and Prevention. *World J Gastroenterol* 2005;11(47):7391-7400.

Br  chot, C. 1998. Molecular mechanisms of hepatitis B and C related to liver carcinogenesis. *Hepatogastroenterology* 45 (Suppl 3), 1189–1196.

Bree RT, Stenson-Cox C, Grealy M, Byrnes L, Gorman AM, Samali A. 2002. *Cellular longevity: role of apoptosis and replicative senescence*. *Biogerontology*. 2002;3:195-206.

Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. 1991. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 1991; 350: 429-431.

Brunner, T., Wasem, C., Torgler, R., Cima, I., Jakob, S., and Corazza, N. 2003. Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology. *Semin Immunol* 15, 167–76.

Buters, J., L. Quintanilla-Martinez, W. Schober, V.J. Soballa, J. Hintermair, T. Wolff, F.J. Gonzalez and H. Greim, 2003. Cyp1b1 Determines Susceptibility To Low Doses Of 7,12-Dimethylbenz(A)Anthracene Induced Ovarian Cancers In Mice: Correlation Of Cyp1b1-Mediated DNA Adducts With Carcinogenicity. *Carcinogenesis*, 24: 327-334.

Cai, J., Yang, J. and Jones, D. P. 1998. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim. Biophys. Acta* 1366, 139-149.

Chicheportiche, Y., Bourdon, P. R., Xu, H., Hsu, Y. M., Scott, H., Hession, C., Garcia, I., and Browning, J. L. 1997. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem* 272, 32401–10.

Chinnaiyan, A. M. 1999. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* 1, 5–15.

Cohen, GM. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 (Pt 1), 1–16.

Coppin, Julia. 2008. *A Study of the Nutritional and Medicinal Values of Moringa oleifera Leaves from Sub-Saharan Africa: Ghana, Rwanda, Senegal and Zambia*. Thesis. Graduate School-New Brunswick Rutgers, The State University of New Jersey.

Cory, S., and Adams, J. M. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647–56.

Coultas L, Strasser A. 2003. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2003;13:115-123.

Cowan MM. 1999. Plant Products as antimicrobial agents. *Clinical Microbio. Reviews.* 12: 564-582.

Currier N, Solomon SE, Demicco EG, Chang DL, Farago M, Ying H, Dominguez I, Sonenshein GE, Cardiff RD, Xiao ZX, Sherr DH, Seldin DC. 2005. *Oncogenic Signaling Pathways Activated in DMBA-Induced Mouse Mammary Tumors*. *Toxicologic Pathology*, 33(6):726–737, 2005.

Dandekar, S., Sukumar, S., Zarbl, H., Young, L.J.T. and Cardiff, R.D. 1986. Specific activation of the cellular Harvey-ras oncogene in dimethylbenzanthracene-induced mouse mammary tumors. *Mol Cell Biol* 6:4104–4108.

Darwish MA, Raouf TA, Rushdy P, Constantine NT, Rao MR, Edelman R. 1993. Risk factors associated with a high seroprevalence of hepatitis C virus infection in Egyptian blood donors. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 49: 440-447.

Darwish NM, Abbas MO, Abdelfattah FM, Darwish MA. 1992. Hepatitis C virus infection in blood donors in Egypt. *J Egypt Public Health Assoc* 1992; 67: 223-236.

Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, McGlynn KA, El-Serag HB. 2005. Diabetes Increases The Risk Of Hepatocellular Carcinoma In The United States: A Population Based Case Control Study. *Gut* 2005; 54: 533-539.

Dawson S, Higashitsuji H, Wilkinson AJ, Fujita J, Mayer RJ. 2006. Gankyrin: a new oncoprotein and regulator of pRb and p53. *Trends in cell biology*; 16 (5) : 229-233.

Departemen Kesehatan. 2008. *Riset Kesehatan Dasar 2007*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan, Jakarta.

Dhawan V, Jain S. 2005. Garlic supplementation prevents oxidative DNA damage in essential hypertension. *Mol. Cell Biochem.* 275: 85-94.

Diao, J., Garces, R. & Richardson, C.D. 2001. X protein of Hepatitis B Virus Modulates Cytokine and Growth Factor Related Signal Transduction

Pathways During the Course Of Viral Infections And Hepatocarcinogenesis (Survey). *Cytokine Growth Factor Rev.* 12, 189–205.

Dorland, W. A. Newman. 2002. *Kamus Kedokteran Dorland*. Edisi 29,; Huriawati Hartanto dkk. (penerjemah). EGC, Jakarta.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome *c*-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33–42.

Ekert, P. G., and Vaux, D. L. 2005. The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders? *Curr Opin Cell Biol* 17, 626–630.

Elmore, Susan. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35:495–516.

El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L, Reddy KR. 2008. Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* Vol. 134 No.6 : 1752–1763.

El-Zayadi AR, Badran HM, Barakat EM, Attia Mel-D, Shawky S, Mohamed MK, Selim O, Saeid A. 2005. Hepatocellular carcinoma in Egypt: a Single Center Study Over A Decade. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5193–5198.

Engel, Tobias and Henshall, David C. 2009. Review Article: Apoptosis, Bcl-2 family proteins and caspases: the ABCs of seizure-damage and epileptogenesis?. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2009; 1(2): 97–115.

Erhart LM, Lankat-Buttgereit B, Schmidt H, Wenzel U, Daniel H, Göke R. 2005. *Flavone initiates a hierarchical activation of the caspase-cascade in colon cancer cells*. Department of Food and Nutrition, Molecular Nutrition Unit 10(3):611–617.

Ezzat S, Abdel-Hamid M, Eissa SA, Mokhtar N, Labib NA, El-Ghorory L, Mikhail NN, Abdel-Hamid A, Hifnawy T, Strickland GT, Loffredo CA. 2005. Associations of pesticides, HCV, HBV, and hepatocellular carcinoma in Egypt. *Int J Hyg Environ Health* 2005; 208: 329–339.

Fahey J. W, 2005. *Moringa oleifera: A Review of the Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophylactic Properties*. Part 1. Trees for Life Journal, 1:5.

Fan, Z., Beresford, P. J., Oh, D. Y., Zhang, D., and Lieberman, J. 2003. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* 112, 659–72.

Farazi PA, DePinho RA. 2006. Hepatocellular Carcinoma Pathogenesis: From Genes to Environment. *Nature Reviews Cancer* 6:674-687.

Farazi PA, DePinho RA. 2006. The Genetic and Environmental Basis Of Hepatocellular Carcinoma. *Discov Med*. 2006 Oct;6(35):182-186.

Farazi PA, Glickman J, Jiang S, Yu A, Rudolph KL, DePinho RA. 2003. Differential Impact of Telomere Dysfunction on Initiation And Progression of Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research* 63:5021-5027.

Fitriani, 2008. *Apoptosis*. (Online), (<http://repository/bitstream/123456789/2061/1/09E01457.pdf>, diakses pada tanggal 14 Desember 2011).

Foidl N, Makkar H, Becker K. 2001. In The Miracle Tree: The Multiple Uses of *Moringa oleifera* For Agricultural and Industrial Uses. October 20th - November 2nd 2001. Dar Es Salaam. *Moringa* (Ed, J, F.) Wageningen, Netherlands. pp. 45-76.

Fu XY, Wang HY, Tan L, Liu SQ, Cao HF, Wu MC. 2002. Overexpression of p28/gankyrin in human hepatocellular carcinoma and its clinical significance. *World journal of gastroenterology* : WJG; 8 (4) : 638-643.

Fuglie LJ. 1999. The Miracle Tree: *Moringa oleifera*: Natural Nutrition for the Tropics. Church World Service, Dakar. 68 pp.; revised in 2001 and published as The Miracle Tree: The Multiple Attributes of Moringa, 172 pp.

Fukuda K, Shibata A, Hirohata I, Tanikawa K, Yamaguchi G, Ishii M. 1993. A Hospital-Based Case-Control Study On Hepatocellular Carcinoma In Fukuoka And Saga Prefectures, Northern Kyushu, Japan. *Jpn J Cancer Res* 1993; 84: 708-714.

Fulda S, Debatin KM. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006;25:4798-4811.

Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C., and Kroemer, G. 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 13,1423-1433.

Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. 2005. Targeting Apoptosis Pathways In Cancer. *CA Cancer J Clin*. 2005;55:178-194.

Globocan. 2008. *Section of Cancer Information*, (Online), (<http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>, diakses 20 November 2011).

Gomaa AI, Khan SA, Toledano MB, Waked I, Taylor-Robinson SD. 2008. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, risk factors and Pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2008 July 21; 14(27): 4300-4308.

Goping, I. S., Barry, M., Liston, P., Sawchuk, T., Constantinescu, G., Michalak, K. M., Shostak, I., Roberts, D. L., Hunter, A. M., Korneluk, R., and Bleackley, R. C. 2003. Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition. *Immunity* 18, 355–365.

Granado-Serrano AB, Martín MA, Bravo L, Goya L, Ramos S. 2006. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *J Nutr.* 2006 Nov;136(11):2715-21.

Grimm, S, Bauer, MK, Baeuerle, PA and Schulze-Osthoff, K .1996. Bcl-2 down-regulates the activity of transcription factor NF-kappaB induced upon apoptosis. *JCell Biol* 134(1): 13-23.

Grisham, J.W. 2001. Molecular Genetic Alterations In Primary Hepatocellular Neoplasms: Hepatocellular Adenoma, Hepatocellular carcinoma, and Hepatoblastoma in *the Molecular basis of human cancer* (eds Coleman, W.B. & Tsongalis, G.J.) 269–346 (Humana Press, Totowa, New Jersey, 2001).

Guicciardi ME, Gores GJ. 2005. Apoptosis: a Mechanism of Acute and Chronic Liver Injury. *Gut* 54: 1024-1033.

Guyton AC and Hall JE. 2006. *Buku Ajar Fisiologi kedokteran*, Edisi 11, Irawati dkk (penerjemah), 2007, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, Indonesia, hal. 41.

Haschek WM, Rousseaux CG. 1991. *Handbook of Toxicology Pathology*. London. Academic Press Inc.

Hassan MM, Zaghloul AS, El-Serag HB, Soliman O, Patt YZ, Chappell CL, Beasley RP, Hwang LY. 2001. The role of hepatitis C in hepatocellular carcinoma: a case control study among Egyptian patients. *J Clin Gastroenterol* 2001; 33: 123-126.

Hausteen BH. 2005. The Biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol.therapeutics J.* 96:67-202.

Heidi, Elisabet. 2012. *Pengaruh Ekstrak Metanol Daun Kelor (Moringa Oleifera) terhadap Kadar Caspase-9 Jaringan Hepar pada Tikus Wistar yang Diinduksi 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Hermawan A, Murwanti R, Artanti N, Meiyanto E. 2011. Effect of The Water Extract of *Macrosolen cochinchinensis* (lour.) Tiegh. Leaves on 7,12dimethylbenz (α) anthracene Induced Female Mice Liver Carcinogenesis. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences* 20 (2011) 627–632.

Hilda, Maria. 2012. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Methanol Daun Kelor (Moringa oleifera) terhadap Aktivitas Caspase-8 Jaringan Hepar pada Tikus Wistar yang Diinduksi DMBA (7,12-Dimethylbenz(a)anthracene)*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Hill, M. M., Adrain, C., Duriez, P. J., Creagh, E. M., and Martin, S. J. 2004. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo J* 23, 2134–45.

Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D. V. 1995. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81,495–504.

Hsu, Rebecca; Midcap, Sharon; Arbainsyah; De Witte, Lucienne. 2006. *Moringa oleifera*, Medicinal and Socio-Economic Uses. International Course on Economic Botany, September 2006. National Herbarium Leiden, the Netherlands.

Igney, F. H., dan Krammer, P. H. 2002. Death and Anti-Death: Tumour Resistance to Apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2, 277–88.

Indra MR, Hernowati TE, Satuman. 2011. *Pengaruh Ekstrak Daun Kelor (Moringa Oleifera) Terhadap Efek Karsinogenik Polutan 7,12 Dimethyl Benz(a)Nthracene (DMBA) Pada Tikus Wistar Melalui Penghambatan Aktifitas Telomerase dan Induksi Apoptosis*. Universitas Brawijaya, Malang.

Integrated Taxonomic Information System. 2000. *Integrated Taxonomic Information System*, (Online), (http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=503874), diakses 27 November 2011).

Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., Sasaki, T., Elia, A. J., Cheng, H. Y., Ravagnan, L., Ferri, K. F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y. Y., Mak, T. W., Zuniga-Pflucker, J. C., Kroemer, G., and Penninger, J. M. 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410, 549–54.

Kamel MA, Ghaffar YA, Wasef MA, Wright M, Clark LC, Miller FD. 1992. High HCV prevalence in Egyptian blood donors. *Lancet* 1992; 340: 427.

Kang JW, Kim JH, Song K, Kim SH, Yoon JH,. 2010. Kaempferol and Quercetin, Components of Ginkgo biloba Extract (EGb 761), Induce Caspase-3-Dependent Apoptosis in Oral Cavity Cancer Cells. *Phytother Res*. 2010 Jan;24 Suppl 1:S77-82.

Kasolo, JN., Gabriel SB., Lonzy O., Joseph O., dan Jasper WO. 2010. Phytochemicals and uses of *Moringa oleifera* leaves in Ugandan rural communities. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4 No. 9: 753-757.

Kawakita, N. *et al.* 1992. Analysis Of Proliferating Hepatocytes Using A Monoclonal Antibody Against Proliferating Cell Nuclear Antigen/Cyclin In Embedded Tissues From Various Liver Diseases Fixed In Formaldehyde. *Am. J. Pathol.* 140, 513–520.

Kubatka P, Ahlersova E, Ahlers I, Bojkova B, Kalicka K, Adamkova E, Markova M, Chamilio M, Cermakova M. 2002. *Variability of mammary carcinogenesis induction in female Sprague Dawley and Wistar Han rats; The Effect of Season and Age.* *Physiol Res* 51(1): 633-640.

Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L. 2003. *Buku Ajar Patologi Edisi 7, Vol. 1.* Prasetyo A, Pendit BU, Priliono T (penerjemah). 2007. Penerbit Buku Kedokteran ECG, Jakarta, Indonesia.

Kurozawa Y, Ogimoto I, Shibata A, Nose T, Yoshimura T, Suzuki H, Sakata R, Fujita Y, Ichikawa S, Iwai N, Fukuda K, Tamakoshi A. 2004. Dietary Habits and Risk of Death due to Hepatocellular Carcinoma in a Large Scale Cohort Study in Japan. Univariate analysis of JACC study data. *Kurume Med J* 2004; 51: 141-149.

Lessene G, Czabotar PE, Colman PM. 2008. BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7:989-1000.

Letai A. 2005. Pharmacological manipulation of BCL-2 family members to control cell death. *J Clin Invest.* 2005;115:2648-2655.

Li Y, Martin II RCG. 2010. Herbal Medicine and Hepatocellular Carcinoma: Applications and Challenges. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Volume 2011, 1-14.

Li, L. Y., Luo, X., and Wang, X. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95–9.

Liew CT, Li HM, Lo KW, Leow CK, Chan JY, Hin LY, Lau WY, Lai PB, Lim BK, Huang J, Leung WT, Wu S, Lee JC. 1999. High frequency of p16INK4A gene alterations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1999; 18: 789–95.

Lindhe, R., L. Granberg and I. Brandt,. 2002. Target Cells For Cytochrome P450-Catalysed Irreversible Binding Of 7,12-Dimethylbenz(a)Anthracene (Dmba) in Rodent Adrenal Glands. *Arch. Toxicol.*, 76: 460-466.

Liu, F. T., Newland, A. C., and Jia, L. 2003. Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. *Biochem Biophys Res Commun* 310, 956–62.

Li-Weber M. 2009. New Therapeutic aspects of flavones: the anticancer properties of Scutellaria and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Bacalin. *Cancer Treat Rev.* 35: 57-68.

Loo, G.V., Saelens, X., Gulp, M.V., MacFarlane, M., Martin, S.J., and Vandenabeele, P. 2002. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Different* 9: 1031–1042.

Lukitaningsih E, Noegrohati S. 2000. Studi Pemisahan senyawa hidrokarbon poliaromatik secara kromatografi gas kolom kapiler. *MFI* 11(1): 31-38.

Manoharan S, Balakrishnan S, Menon VP, Alias LM, Reena AR.2009. Chemopreventive efficacy of curcumin and piperine during 7,12-dimethylbenz(α)anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Singapore Med. J.* 2009 Feb; 50(2): 139-146.

Marfe, G.; Tafani, M.; Indelicato, M.; Sinibaldi-Salimei, P.; Reali, V.; Pucci, B.; Fini, M.; Russo, M.A. 2009. Kaempferol induces apoptosis in two different cell lines via Akt inactivation, Bax and SIRT3 activation, and mitochondrial dysfunction. *J. Cell Biochem.*, 2009, 106, 643-50.

Martinvalet, D., Zhu, P., and Lieberman, J. 2005. Granzyme A induces caspase independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 22, 355–70.

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

Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000 Dec; 52(4): 673-751.

Miyata, M., Furukawa, K., Takahashi, F.J. Gonzales and Y. Yamazoe. 2001. Mechanism Of 7,12-Dimethylbenz(α)Anthracene-Induced Immunotoxicity: Role Of Metabolic Activation At The Target Organ. *Jpn. J. Pharmacol.*, 86: 302-309.

Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N. 2002. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* 2002; 296: 1644–6.

Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. 2004. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 691–701.

Morton, J.F. 1991. The Horseradish Tree, *Moringa pterygosperma* (Moringaceae) - A Boon to Arid Lands. *Economic Botany* 45, 318-333.

Mun'im A, Andrajati, Susilowati H. 2006. Uji hambatan tumorigenesis sari buah merah (*Pandanus conoideus lam*) terhadap tikus putih betina yang diinduksi 7, 12 dimetilbenz (a) antrasen (DMBA). *MIK* III(3): 153 – 161.

Nandakumar V, Singh T, Katuiyar S. 2008. Mult-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. *Cancer Lett.* 269: 378-387.

Nangia-Makker P, Hogan V, Honjo Y, Baccarini S, Tait L, Bresalier R, Raz A. 2002. Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin. *J. Nat. Inst.* 94: 1854-1862.

National Cancer Institute. 2009. What You Need to Know about Liver Cancer, (Online), (<http://cancer.gov/cancertopics/wyntk/liver.pdf>, diakses 24 November 2011).

Nurulita NA. 2011. Kaempferol dapat Menginduksi Apoptosis melalui Mitochondrial Pathway dan ER Stress Pathway pada Osteosarkoma, (Online), (<http://www.ccrc.farmasi.ugm.ac.id/?p=2191> diakses 23 Januari 2012).

Oktaviana, Katarina, Tri. 2012. *Pengaruh ekstrak metanol Daun Kelor (Moringa oleifera) terhadap pengahambatan aktivasi NF- κ B pada hepar tikus wistar model Hepatocellular carcinoma (HCC) yang diinduksi DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene)*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Paliwal R, Sharma V, Pracheta, Sharma S, Yadav S, Sharma SH. 2011. Antinephrotoxic Effect Of Administration Of *Moringa oleifera* Lam In Amelioration Of Dmba-Induced Renal Carcinogenesis In Swiss Albino Mice. *Biology and Medicine*, 3 (2) Special Issue: 27-35.

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

Park CH, Chang JY, Hahm ER, Park S, Kim HK, Yang CH. 2005. Quercetin, a potent inhibitor against beta-catenin/Tcf signaling in SW480 colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Mar 4;328(1):227-234.

Parvathy M, Umamaheswari A. 2007. *Cytotoxic Effect of Moringa oleifera Leaf Extracts on Human Multiple Myeloma Cell Lines*, (Online) <http://scialert.net/qredirect.php?doi=tmr.2007.44.50&linkid=pdf>, diakses 18 Januari 2012.

Peter, M. E., and Krammer, P. H. 1998. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-Mediated Apoptosis. *Curr Opin Immunol* 10, 545-51.

Poedjomartono B, Sudarmanto. 2009. Kemoembolisasi Transarterial (TACE) pada Karsinoma Hepatoselular (KHS). Vol *Indonesian Journal of Cancer*. III, No. 3 Juli - September 2009, 117-121.

Priyadarsini RV, Nagini S. 2012. Quercetin suppresses cytochrome P450 mediated ROS generation and NF κ B 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.

Rai, N. K., Tripathi, K., Sharma, D., and Shukla, V. K. 2005. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds* 4, 138–44.

Raju J, Patlolla J, Swamy M Rao C. 2004. Diosgenin, a steroid of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek), inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in F344 rats and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 13:1392-1398.

Rakesh S, Singh VJ. 2010. *In Vivo* Antioxidant Activity of *Moringa oleifera* Leaf and Pod Extracts Against Carbon Tetra Chloride Induced Liver Damage in Albino Mice. *J. Chem. Pharm. Res.*, 2010, 2(6):275-283.

Rakitsky VN, Koblyakov VA, Turusov VS. 2000. Nongenotoxic (epigenetic) carcinogens: pesticides as an example. A critical review. *Teratog Carcinog Mutagen* 2000; 20: 229-240.

Rebecca, H.S.U., Sharon, M., Arbainsyah, A. and Lucienne, D. 2006. *Moringa oleifera*: Medicinal and Socio-Economic Uses. International Course on Economic Botany. National Herbarium Leiden, Netherlands. Pp.2 – 6.

Roloff A, Weisgerber H, Lang U, Stimm B. 2009. *Moringa oleifera*. *Enzyklopädie der Holzgewächse, Handbuch und Atlas der Dendrologie* 40. Erg.Lfg. 6/05: 1-8.

Rowinsky EK. 2005. Targeted Induction Of Apoptosis In Cancer Management: The Emerging Role Of Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor Activating Agents. *J Clin Oncol.* 2005;23:9394-9407.

Rowlands, J. C., Ling He, Hakkak, R., Ronis, M. J. J., and Badger, T. M. 2001. Soy and Whey Proteins Downregulate DMBA-Induced Liver and Mammary Gland CYP1 Expression in Female Rats. *Journal of Nutrition*, 131, 3281-3287.

Royds JA, Iacopetta B. 2006. p53 and disease: when the guardian angel fails. *Cell Death Differ.* 2006;13:1017–1026.

Rubio-Moscardo, F., Blesa, D., Mestre, C., Siebert, R., Balasas, T., Benito, A., Rosenwald, A., Climent, J., Martinez, J. I., Schilhabel, M., Karran, E. L., Gesk, S., Esteller, M., deLeeuw, R., Staudt, L. M., Fernandez-Luna, J. L., Pinkel, D., Dyer, M. J., and Martinez-Climent, J. A. 2005. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood* 106, 3214–22.

Russell, J. H., and Ley, T. J. 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 20, 323–70.

Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gorp, M., van Loo, G., and Vandenabeele, P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23, 2861–74.

Saffroy R, Lemoine A, Debuire B .2006. Mechanisms of Hepatocarcinogenesis. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. September 2006. (Online), (<http://AtlasGeneticsOncology.org/Deep/HepatocarcinogenesisID20055.html>), diakses 5 November 2011).

Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96–9.

Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandell DW, Rapaport JM, Dryja TP. 1991. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 880–8.

Saputra, Hendra. 2012. Efek Pemberian Ekstrak Methanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Ekspresi TRAIL R1 (*Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor 1*) Jaringan Hepar Tikus Wistar Model Kanker Hepar yang Diinduksi DMBA (7,12-Dimethylbenz(a)anthracene). Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Schimmer, A. D. 2004. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res* 64, 7183–90.

Serrano M, Hannon GJ, Beach D. 1993. A New Regulatory Motif In Cell-Cycle Control Causing Specific Inhibition Of Cyclin D/Cdk4. *Nature* 1993; 366: 704–707.

Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, et al. 1999. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5522–7.

Sigmaaldrich. 2010. 7,12-dimethylbenz(α)anthracene. (Online), (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/216267?lang=en®ion=MY>), diakses tanggal 2 Desember 2011).

Slee, E. A., Adrain, C., and Martin, S. J. 2001. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 276, 7320–6.

Smela, M.E., Currier, S.S., Bailey, E.A. & Essigmann, J.M. 2001. The Chemistry And Biology Of Aflatoxin B1: From Mutational Spectrometry To Carcinogenesis. *Carcinogenesis* 22, 535–545.

Smith, D.A., G.G. Schuring, S.A. Smith and S.D. Holladay. 1999. Inhibited Cytotoxic Leukocyte Activity in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Following Exposure to Immunotoxic Chemicals. *Int. J. Toxicol.*,18: 167-172.

Solimun. 2001. *Diklat Metodologi Penelitian LKIP dan PKM Kelompok Agrokompleks*. Universitas Brawijaya, Malang.

Son YO , Sung-Ho SH Kook, Ki-Choon KC Choi, Yong-Suk YS Jang, Young-Mi YM Jeon, Jong-Ghee JG Kim, Kyung-Yeol KY Lee, Ju J Kim, Mi-Sun MS Chung, Gook-Hyun GH Chung, Jeong-Chae JC Lee. 2006. Quercetin, a bioflavonoid, accelerates TNF- α -induced growth inhibition and apoptosis in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Eur J Pharmacol*529(1-3):9.

Spitsbergen, J.M., H.W. Tsai, A. Reddy, T. Miller, D Arbogast, J.D. Hendricks and G.S. Bailey. 2000. Neoplasia In Zebrafish (*Danio Rerio*) Treated With 7,12-Dimethylbenz(α)Anthracene By Two Exposure Routes At Different Developmental Stages. *Toxicol.Pathol.*,28: 705-715.

Suliman, A., Lam, A., Datta, R., and Srivastava, R. K. 2001. Intracellular mechanisms of TRAIL: Apoptosis Through Mitochondrial-Dependent and -Independent Pathways. *Oncogene* 20, 2122–33.

Suruki RY, Mueller N, Hayashi K, Harn D, DeGruttola V, Raker CA, Tsubouchi H, Stuver SO. 2006. Host Immune Status And Incidence Of Hepatocellular Carcinoma Among Subjects Infected With Hepatitis C Virus: A Nested Case-Control Study In Japan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 2521-2525.

Susilowati. 2010. *Efek kemopreventif ekstrak methanol kulit kayu nangka (Artocarpus heterophylla Lmk.) pada karsinogenesis kanker payudara tikus betina yang diinduksi dengan DMBA*. Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Tetsu O, McCormick F. 1999. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999; 398: 422–6.

Thorgeirsson SS, Grisham JW. 2002. Molecular Pathogenesis of Human Hepatocellular Carcinoma. *Nature Genetic*, volume 31: 339-346.

Thornberry NA, Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science*. 1998 Aug 28;281 (5381):1312-1316.

Trapani, J. A., and Smyth, M. J. 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2, 735–47.

Tsaknis J, S Lalas, V Gergis, V Douroglou, and V Spiliotis. 1999. Characterization of *Moringa oleifera* variety Mbololo seed oil of Kenya. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4495-4499.

Ueno M, Inano H, Onado M, Murase H, Ikota N, Kagiya T Anzai K. 2009. Modification of mortality and tumorigenesis by tocopherolmono-glucoside (TMG) administered after Xirradiatino in mice and rats. *Radiant Res.* 172: 519-524.

van Loo, G., van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S. M., Rodriguez, I., Alnemri, E. S., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W., and Vandenabeele, P. 2002. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* 9, 20–6.

Wajant, H. 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296, 1635–6.

Wang, X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15(22): 2922-2933.

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

Wideroff L, Gridley G, Mellemkjaer L, Chow WH, Linet M, Keehn S, Borch-Johnsen K, Olsen JH. 1997. Cancer incidence in a population-based cohort of patients hospitalized with Diabetes mellitus in denmark. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1360-1365.

Widiastuti P. 2009. Polifenol sebagai antioksidan penangkal radikal bebas. *Cermin Kedokteran* 6:21-26.

Wijnhoven, S.W.P., H.J.M. Kool, L.H.F. Mullenders, R. Slater, A.A. Van Zeeland and H. Vrieling. 2001. DMBA-induced Toxic And Mutagenic Response Vary Dramatically Between NER-deficient *Xpa*, *Xpc* and *Csb* Mice. *Carcinogenesis*, 22: 1099-1106.

Wilkens L, Bredt M, Flemming P, Becker T, Klempnauer J, Kreipe HH. 2001. Differentiation of liver cell adenomas from well-differentiated hepatocellular carcinomas by comparative genomic hybridization. *J Pathol* 2001; 193: 476–82.

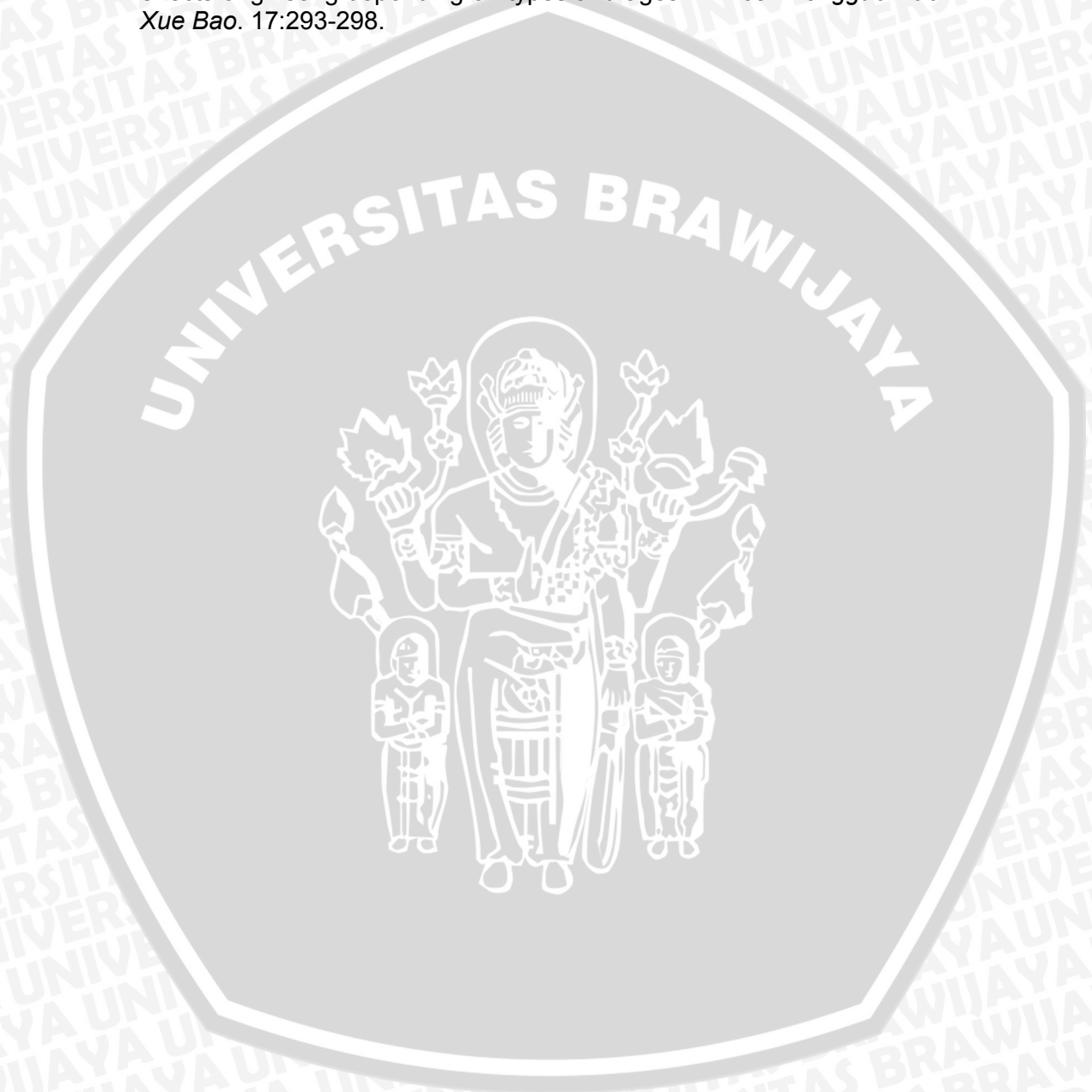
Wong C-M and Ng IOL. 2007. Molecular Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma. *Liver International*, 160-174.

World Health Organization. 2011. *Cancer*, (Online), (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>, diakses 20 November 2011).

Yu SZ, Huang XE, Koide T, Cheng G, Chen GC, Harada K, Ueno Y, Sueoka E, Oda H, Tashiro F, Mizokami M, Ohno T, Xiang J, Tokudome S. 2002.

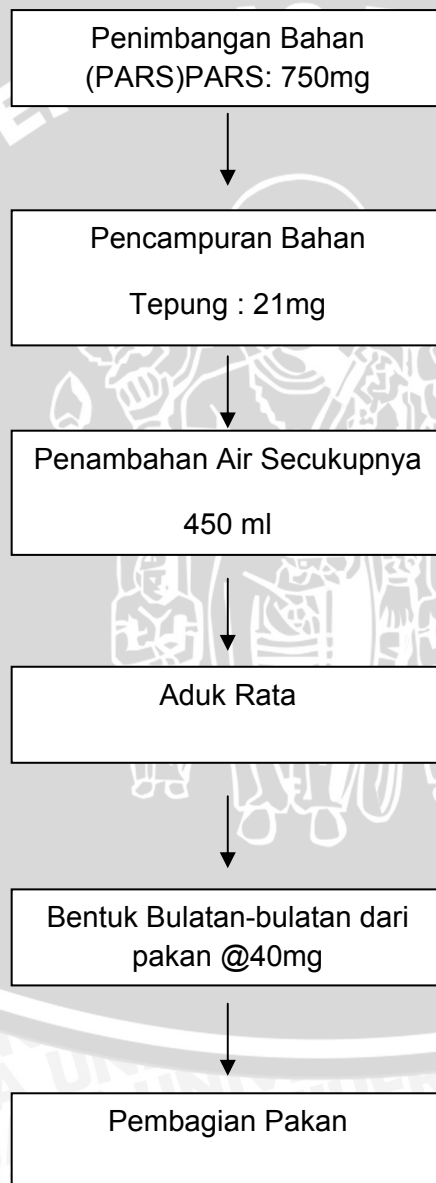
Hepatitis B And C Viruses Infection, Lifestyle And Genetic Polymorphisms As Risk Factors For Hepatocellular Carcinoma In Haimen, China. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 1287-1292.

Yun K, Lee Y, Kwon H Choi K. 1996. Saponin contents and antcarcinogenic effects of ginseng depending on types and ages in mice. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 17:293-298.



LAMPIRAN

Lampiran 1: Diagram Alur Pembuatan Diet Normal



Lampiran 2: Tabel *Test of Normality* (Uji Normalitas Data)

Tests of Normality							
perlakuan		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
hasil	kontrol negatif	.250	4	.	.951	4	.722
	kontrol positif	.269	4	.	.901	4	.438
	perlakuan 1	.199	4	.	.986	4	.938
	perlakuan 2	.301	4	.	.924	4	.560
	perlakuan 3	.311	4	.	.839	4	.192

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 3: Tabel *Groups Statistic*

Report		
hasil		
perlakuan	Mean	Std. Deviation
kontrol negatif	6.7532	1.09155
kontrol positif	5.0475	.61511
perlakuan 1	5.1150	1.06174
perlakuan 2	5.2625	.60566
perlakuan 3	6.7600	.91626
Total	5.7876	1.13151

Lampiran 4: Tabel *Homogeneity of Variances Test*

Test of Homogeneity of Variances			
hasil			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.324	4	15	.858

Lampiran 5: Tabel Uji ANOVA

ANOVA					
hasil					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12.616	4	3.154	4.040	.020
Within Groups	11.711	15	.781		
Total	24.326	19			

Lampiran 6: Tabel *LSD* test

Multiple Comparisons						
hasil						
LSD						
(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol negatif	kontrol positif	1.70575 [*]	.62478	.015	.3741	3.0374
	perlakuan 1	1.63825 [*]	.62478	.019	.3066	2.9699
	perlakuan 2	1.49075 [*]	.62478	.031	.1591	2.8224
	perlakuan 3	-.00675	.62478	.992	-1.3384	1.3249
kontrol positif	kontrol negatif	-1.70575 [*]	.62478	.015	-3.0374	-.3741
	perlakuan 1	-.06750	.62478	.915	-1.3992	1.2642
	perlakuan 2	-.21500	.62478	.736	-1.5467	1.1167
	perlakuan 3	-1.71250 [*]	.62478	.015	-3.0442	-.3808
perlakuan 1	kontrol negatif	-1.63825 [*]	.62478	.019	-2.9699	-.3066
	kontrol positif	.06750	.62478	.915	-1.2642	1.3992
	perlakuan 2	-.14750	.62478	.817	-1.4792	1.1842
	perlakuan 3	-1.64500 [*]	.62478	.019	-2.9767	-.3133
perlakuan 2	kontrol negatif	-1.49075 [*]	.62478	.031	-2.8224	-.1591
	kontrol positif	.21500	.62478	.736	-1.1167	1.5467
	perlakuan 1	.14750	.62478	.817	-1.1842	1.4792
	perlakuan 3	-1.49750 [*]	.62478	.030	-2.8292	-.1658

perlakuan 3	kontrol negatif	.00675	.62478	.992	-1.3249	1.3384
	kontrol positif	1.71250*	.62478	.015	.3808	3.0442
	perlakuan 1	1.64500*	.62478	.019	.3133	2.9767
	perlakuan 2	1.49750*	.62478	.030	.1658	2.8292

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

Lampiran 7: Tabel *Homogenous Subset*

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		a	b
kontrol negatif	4	6.7525	
kontrol positif	4		5.0475
perlakuan 1	4		5.115
perlakuan 2	4		5.2625
Perlakuan 3	4	6.76	

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Lilycia Elisabeth L.

NIM : 0910710090

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, 12 Februari 2013

Yang membuat pernyataan,

Lilycia Elisabeth L.

NIM. 0910710090