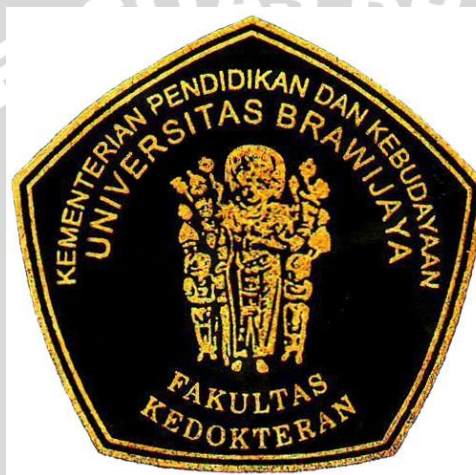


**PENGARUH EKSTRAK METANOL DAUN KELOR (*Moringa oleifera*) TERHADAP
EKSPRESI HSP25 PADA KARSINOGENESIS KOLON TIKUS WISTAR YANG
DIINDUKSI 7,12-DIMETHYLBENZ[A]ANTHRACENE (DMBA)**

TUGAS AKHIR

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



Oleh:

Riza Rahmawati

NIM: 0910710112

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2013

KATA PENGANTAR

Terimakasih kepada Allah SWT yang telah mengkaruniakan kesehatan, kemudahan, keluarga tempat untuk berlindung, guru tempat untuk bertanya, dan teman-teman yang pengertian hingga dapat diselesaikannya tugas akhir ini dengan judul Pengaruh Ekstrak Metanol Daun Kelor (*Moringa Oleifera*) terhadap Ekspresi HSP25 pada Karsinogenesis Kolon Tikus Wistar yang Diinduksi DMBA.

Insiden kanker kolon saat ini telah bergeser dari daerah barat ke daerah timur termasuk Asia yang sebelumnya memiliki insiden rendah. Hal ini dipengaruhi oleh pola makan masyarakat yang sering mengonsumsi makanan rendah serat serta sedikit sayur dan buah. Apalagi dengan banyaknya restoran cepat saji yang tumbuh di Indonesia. Oleh karena itu usaha pencegahan yang efektif dan kembali ke alam sangat diperlukan, selain untuk mencari solusi yang lebih mudah didapat juga untuk mengalihkan gaya hidup masyarakat yang kurang sehat menjadi lebih baik dengan membuka wawasan bahwa Allah SWT, *Ar-Rahman Ar-Rahim* telah memberikan semuanya yang dibutuhkan manusia dan manusia itu sendirilah yang perlu menggali dan memanfaatkannya dengan baik.

Dengan selesainya Tugas akhir ini, penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Dr. dr. Karyono M, SpPA, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS selaku pembimbing pertama dalam Tugas Akhir ini yang atas bimbingan beliau dari awal hingga akhir sehingga Tugas Akhir ini dapat diselesaikan.

3. dr. Bogi Pratomo, SpPD-KEH selaku pembimbing kedua atas semangat dan bimbingan beliau hingga tugas Akhir ini dapat diselesaikan.
4. Dr. dr. Tinny Endang H.,SpPK(K) sebagai penguji dan masukan-masukan yang bermanfaat.
5. dr. Sarwo Bkti, SpPA atas bimbingan beliau
6. Segenap Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB.
7. Para analis laboratorium Fisiologi dan PA FKUB atas petunjuk dan kerjasamanya.
8. Dan teman-teman yang penulis sayangi.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu diharapkan pada generasi selanjutnya untuk saling melengkapi dan saling membangun demi didapatkannya ilmu yang bermanfaat. Akhirnya, semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan

Malang, 13 Januari 2013

Penulis

ABSTRAK

Rahmawati, Riza, 2013. *Pengaruh Ekstrak Metanol Daun Kelor (Moringa Oleifera) Terhadap Ekspresi HSP25 pada Karsinogenesis Kolon Tikus Wistar yang Diinduksi 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)*. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Pembimbing: (1) Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS (2) dr. Bogi Pratomo, SpPD – KGEH

Kanker kolon adalah salah satu penyakit yang menarik perhatian dunia karena insiden dan tingkat kematiannya yang semakin meningkat. Sel kanker ditandai dengan menurunnya sensitifitas sel terhadap mekanisme apoptosis. Salah satu protein antiapoptosis yang berperan adalah *heat shock protein 25 kDalton* (HSP25). Pada penelitian ini ekspresi HSP25 dicoba untuk dihambat dengan memberikan ekstrak methanol daun *Moringa oleifera*. *Moringa oleifera* telah dikenal sebagai sumber antioksidan, memiliki efek antiinflamasi, antimikroba, dan antikanker. Ekstrak diberikan dalam tiga dosis berbeda (20, 40, dan 80 mg/kg/hari) kepada tikus karsinogenesis kolon yang diinduksi DMBA. Ekspresi HSP25 dievaluasi dengan cara menghitung jumlah sel yang memberikan hasil positif pada pengecatan imunohistokimia. Jumlah sel yang mengekspresikan HSP25 menurun secara signifikan ($p = 0,000$) yang dimulai dari dosis 20 mg/kg/hari dan lebih sedikit lagi pada dosis 40 mg/kg/hari dibandingkan dengan kelompok kontrol, namun HSP25 mengalami peningkatan pada dosis 80 mg/kg/hari. Maka kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* dapat menurunkan ekspresi HSP25 jaringan kolon pada dosis 40 mg/kg/hari pada tikus yang diinduksi DMBA.

Kata kunci: HSP25, karsinogenesis kolon, *Moringa oleifera*

ABSTRACT

Rahmawati, Riza, 2013. *The Effect of Methanol Extract of Moringa oleifer Leaves on The Expression of HSP25 on Wistar Rat's Colon Carcinogenesis that was Induced by 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)*. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS (2) dr. Bogi Pratomo, SpPD – KGEH

Colon cancer is a disease which attracts a lot of attention because of the increase in incident and mortality. Cancer tissue is characterized by its low sensitivity to apoptosis mechanism. One of these anti-apoptotic proteins is heat shock protein 25 kDalton (HSP25). In this study, we tried to inhibit the expression of HSP25 by administrating methanol extract of *Moringa oleifera* leaves. *Moringa oleifera* is known by its anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-microbe, and anti-cancer properties. We administrated three different doses (20, 40, and 80 mg/kg/day) of *Moringa oleifera* extract on DMBA-induced colon carcinogenicity rat. HSP25 was evaluated by counting the cell that gave positive result in immunohistochemistry staining. The amount of cells that expressed HSP25 was significantly reduced ($p = 0,000$) which started at dose 20 mg/kg and much fewer at dose 40 mg/kg compared to the control group, however, HSP25 was increased at dose 80 mg/kg. We conclude that methanol extract of *Moringa oleifera* leaves decrease HSP25 expression of colon tissue of rat induced-DMBA model at 40 mg/kg/day.

Keywords: HSP25, colon carcinogenesis, *Moringa oleifera*

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul	i
Halaman Persetujuan	ii
Halaman Pengesahan	iii
Kata Pengantar	iv
Abstrak	vi
Abstract	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Tabel	xi
Daftar Gambar	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Manfaat Akademik	5
1.4.2 Manfaat Praktis	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Kanker Kolon	6
2.1.1 Etiologi dan Faktor Resiko Kanker Kolon	6
2.1.1.1 DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene)	7
2.1.2 Patogenesis Kanker Kolon	9
2.1.2.1 Apoptosis	11

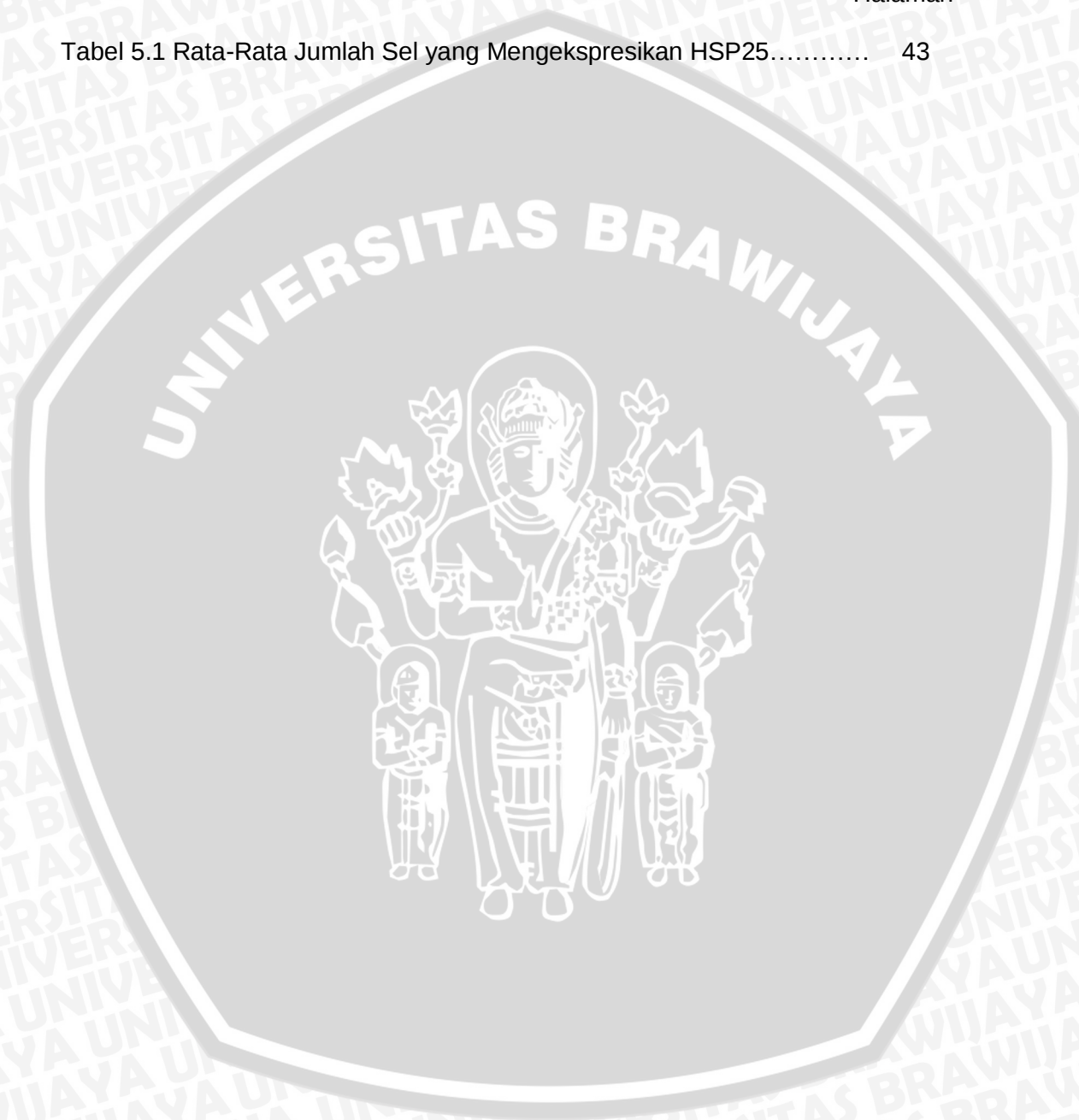
2.1.2.1.1 Perubahan Morfologi	12
2.1.2.1.2 Perubahan Biokimia	12
2.1.2.1.3 Mekanisme Apoptosis	13
2.1.2.1.3.1 Jalur Ekstrinsik	13
2.1.2.1.3.2 Jalur Intrinsik	14
2.1.2.1.4 HSP25/27	14
2.1.2.1.4.1 HSP25/27 Menghambat Apoptosis Jalur Ekstrinsik	15
2.1.2.1.4.2 HSP25/27 Menghambat Apoptosis Jalur Intrinsik ...	16
2.1.2.1.4.3 Sintesis HSP25/27	18
2.1.2.1.5 HSP dan Apoptosis	19
2.1.3 Terapi dan Pencegahan Kanker Kolon	20
2.1.3.1 Terapi Kanker Kolon	20
2.1.3.1.1 Kelor (<i>Moringa oleifera</i>)	21
2.1.3.1.1.1 Klasifikasi dan Morfologi	21
2.1.3.1.1.2 Kandungan Gizi dan Manfaat Daun Kelor	22
2.1.3.1.1.2.1 Quercetin	24
2.1.3.2 Pencegahan Kanker Kolon	24
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	26
3.1 Kerangka Konsep	26
3.2 Hipotesis Penelitian	28
BAB IV METODE PENELITIAN	29
4.1 Rancangan Penelitian	29
4.2 Hewan Coba	29
4.2.1 Hewan Coba, Objek, dan Teknik Randomisasi	20
4.2.2 Estimasi Jumlah Pengulangan	30

4.2.3 Kriteria Inklusi	31
4.2.4 Kriteria Eksklusi	31
4.3 Variabel Penelitian	31
4.4 Lokasi dan waktu Penelitian	32
4.5 Alat dan Bahan Penelitian	32
4.5.1 Alat Penelitian	32
4.5.2 Bahan Penelitian	33
4.6 Definisi Operasional	34
4.7 Prosedur Penelitian	34
4.7.1 Aklimatisasi	35
4.7.2 Induksi 7,12 dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)	36
4.7.3 Perlakuan	36
4.7.3.1 Pemeliharaan	36
4.7.3.2 Pembedahan	36
4.7.3.3 Pengukuran Ekspresi HSP25	37
4.8 Pengolahan dan Analisis Data	38
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	39
5.1 Hasil Penelitian	39
5.2 Analisis Data	44
BAB VI PEMBAHASAN	47
BAB VII PENUTUP.....	54
7.1 Kesimpulan	54
7.2 Saran	54
DAFTAR PUSTAKA	56
LAMPIRAN	62

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 5.1 Rata-Rata Jumlah Sel yang Mengekspresikan HSP25..... 43



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Metabolisme DMBA	8
Gambar 2.2 Redox Cycling	9
Gambar 2.3 Peran Antiapoptosis HSP25/27	17
Gambar 2.4 Sintesis HSP	18
Gambar 2.5 Peran Antiapoptosis HSP	20
Gambar 4.1 Alur Penelitian	35
Gambar 5.1 Histologi Kolon <i>Post</i> DMBA 45 Hari	40
Gambar 5.2 Kontrol Negatif (K(-))	41
Gambar 5.3 Kontrol Positif (K(+))	41
Gambar 5.4 Perlakuan 1 (P1)	42
Gambar 5.5 Perlakuan 2 (P2)	42
Gambar 5.6 Perlakuan 3 (P3)	43
Gambar 5.7 Rata-Rata Jumlah Sel yang Mengekspresikan HSP25 Tiap Kelompok Perlakuan	44

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan salah satu penyakit yang ditakuti karena tingkat kematiannya yang tinggi. Menurut data statistik WHO tahun 2008, kanker menyumbang 13% total kematian dunia, sementara di Indonesia 245 tiap 100.000 orang meninggal karena kanker. Kanker kolorektal termasuk dalam salah satu jenis kanker yang mendapat perhatian di dunia karena tingkat kematian dan insidennya yang semakin meningkat. Menurut data statistik GLOBOCAN 2008, kejadian kanker kolorektal menurun pada negara-negara yang sebelumnya memiliki insiden tinggi seperti Amerika Serikat, Australia, Selandia Baru, negara-negara Eropa, dan Amerika Utara, namun tingkat kejadian kanker kolorektal malah meningkat pada daerah yang sebelumnya memiliki insiden kecil seperti negara-negara Asia dan Afrika. Faktor resiko kanker kolon meliputi faktor keturunan, diet kurang serat, banyak makan daging merah, kurang vitamin D dan B6, kalsium, kurang olahraga, konsumsi alkohol, merokok, dan paparan zat berbahaya lainnya.

Zat berbahaya yang banyak terdapat di lingkungan diantaranya adalah *polycyclic aromatic hydrocarbon* (PAH). PAH berasal dari pembakaran tidak sempurna bahan-bahan yang mengandung karbon, seperti batu bara, minyak, kayu, dan sampah. Hasil pembakaran ini kemudian menyebar bersama udara bergabung dengan abu dan sebagian lagi larut dalam air serta bercampur

dengan tanah. 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) termasuk dalam golongan PAH yang diketahui mempunyai efek karsinogenik, mutagenik, serta immunosupresor. Mutasi DNA tertentu akan menyebabkan sel terus berproliferasi, kurang terdiferensiasi dan resisten terhadap mekanisme apoptosis.

Apoptosis adalah mekanisme kematian sel terprogram yang berfungsi mengeliminasi sel-sel yang sudah rusak atau sel ganas yang berpotensi menjadi kanker. Sel yang telah mendapat sinyal untuk bunuh diri kemudian mengaktifkan molekul-molekul proapoptosis seperti *caspase* yang menghancurkan komponen kunci selular yang dibutuhkan pada fungsi sel normal termasuk struktur protein pada sitoskeleton dan protein nuklear seperti enzim perbaikan DNA. *Caspase* juga dapat mengaktifasi enzim degradatif lainnya seperti DNase yang menghancurkan DNA dalam nukleus (Dash). Namun, pada sel kanker terjadi penurunan aktifitas apoptosis karena sel kanker dapat menghindar dari mekanisme tersebut dengan beberapa cara, yaitu: mengganggu keseimbangan antara protein proapoptosis dan protein antiapoptosis, menurunkan fungsi *caspase*, dan melemahkan sinyal reseptor apoptosis (Wong, 2011).

Salah satu agen antiapoptosis yang berperan dalam imortalitas sel kanker adalah *heat shock protein 25 kDa* (HSP25). HSP25 pada tikus adalah homolog HSP 27 pada manusia. Konsentrasi HSP25 pada tikus terbanyak terdapat di lensa mata dan jumlah yang signifikan juga ditemukan di sel jantung, kolon, kandung kemih, dan paru (Klemenz, 1993). HSP25 adalah molekular *chaperon* yang berfungsi menjaga stabilitas dan fungsi protein, serta membantu pelipatan protein. Pada keadaan nonpatologis, HSP25 menjaga kelangsungan hidup sel dari pengaruh fisiologis dan lingkungan sekitar sel dengan menghambat jalur proapoptosis. Namun, pada sel kanker ekspresi HSP25

secara abnormal sangat tinggi. Hal ini meningkatkan resistensi kanker terhadap kemoterapi dan meningkatkan sifat onkogenitasnya (Garrido *et al.*, 2006). Oleh sebab itu, aktivitas HSP25 perlu dihambat agar proses apoptosis dapat berjalan dengan baik.

Kanker kolon merupakan kanker dengan gejala tidak khas dan kadang asimtomatik. Gejala yang dapat ditemui adalah perubahan *bowel habit*, nyeri abdominal, penurunan berat badan, perdarahan rektal dan anemia. Kanker kolon dapat bermetastase ke hepar dan paru, sementara kanker rektal lebih sering bermetastase ke paru dan tulang.

Terapi kanker kolon sampai saat ini meliputi pembedahan, kemoterapi, dan radiasi. Pembedahan dilakukan berdasarkan ukuran, stadium kanker, dan kondisi kesehatan pasien. Terapi ini cukup efektif untuk menyembuhkan kanker kolon stadium awal yang masih belum menyebar luas, tapi tidak dapat dilakukan pada kanker metastase. Untuk melawan kanker metastase, mencegah kambuhnya kanker, mengecilkan ukuran kanker sebelum pembedahan, dan membunuh sisa-sisa sel kanker setelah pembedahan dilakukan kemoterapi atau radiasi (Brotzman dan Robertson, 2008). Namun, kemoterapi hanya dapat menurunkan tingkat kambuhnya kanker sebesar 17% dan mengurangi kematian sebesar 13,5%, hal ini masih kurang memuaskan jika dibandingkan dengan efek sampingnya, meliputi diare, stomatitis, dermatitis, kelelahan dan *alopecia* (kebotakan) ringan. Oleh karena itu dibutuhkan terapi baru dan usaha pencegahan yang lebih efektif, mudah didapat, dan terjangkau semua kalangan.

Indonesia sebagai negara tropis yang kaya akan berbagai jenis tumbuh-tumbuhan memiliki potensi besar untuk mengembangkan obat herbal. Salah satu kandidat yang baik adalah tanaman kelor. Kelor telah digunakan secara luas

pada pengobatan tradisional untuk mengobati hipertensi, diabetes, infeksi cacing, asma, luka bakar, flu, bahkan gejala HIV/AIDS (Kasolo *et al*, 2010). Kelor mengandung banyak asam amino, flavonoid seperti quercetin, kaempferol, beta-sitosterol, asam caffeoyquinic dan zeatin, serta sejumlah vitamin dan mineral dalam jumlah banyak. Quercetin telah diketahui dapat menghambat pertumbuhan sel kanker melalui beberapa mekanisme salah satunya adalah dengan menghambat sintesis HSP (Lamson dan Brignall, 2000) dengan menghambat fosforilasi *c-Jun NH(2)-terminal protein kinase* (JNK) (Shih *et al*, 2004) dan *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II* (CaMKII) (Junga *et al*, 2010) yang merupakan protein kinase yang memfosforilasi *heat shock factor 1* (HSF1) (Stephanou dan Latchman, 2010; Whitesell dan Lindquist, 2009). Fosforilasi terhadap HSF1 oleh protein-protein kinase tersebut akan mengaktifasi HSF1 dan selanjutnya akan memodulasi sintesis HSP (Stephanou dan Latchman, 2010; Whitesell dan Lindquist, 2009; Tomanek, 2002). Oleh karena itu, diharapkan daun kelor dapat menurunkan ekspresi HSP25 pada tikus Wistar yang diinduksi DMBA melalui kandungan flavonoidnya terutama quercetin, sehingga daun *Moringa oleifera* ini dapat digunakan sebagai usaha preventif dan kuratif terhadap kanker kolon atau terhadap kanker pada umumnya.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan ekspresi HSP25 pada jaringan kolon tikus Wistar yang diinduksi DMBA?

1.3 Tujuan Penelitian

Memastikan efektifitas ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap penurunan ekspresi HSP25 pada jaringan kolon tikus Wistar yang diinduksi DMBA.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

- Menambahkan konsep tentang peran ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dalam proses apoptosis yang berhubungan dengan HSP25 dalam karsinogenesis kolon.

1.4.2 Manfaat Praktis

- Mengembangkan potensi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) sebagai tanaman herbal untuk pencegahan dan pengobatan kanker kolon.
- Mengembangkan obat herbal untuk pencegahan dan pengobatan kanker secara luas yang efektif, efisien, dan terjangkau.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker Kolon

2.1.1 Etiologi dan Faktor Resiko Kanker Kolon

Kanker kolon sebagian besar berasal dari koloni polip adenomatosa yang berasal dari kelenjar mukosa yang melapisi lumen usus. Tibulnya polip ini dipengaruhi oleh faktor genetik dan lingkungan. Pasien yang keluarganya didiagnosis memiliki polip adenoma sebelum usia 60 tahun memiliki kemungkinan 2,59 kali untuk menderita kanker kolorektal. Sementara pada pasien yang diketahui memiliki *familial adenomatous polyposis* (FAP), 50%-70% dapat berkembang menjadi kanker kolorektal sebelum usia 35 tahun jika kolonektomi tidak dilakukan (Brotzman dan Robertson, 2008). FAP ditandai dengan penutupan hampir sebagian besar permukaan lumen usus dengan polip.

Diet tinggi lemak meningkatkan waktu transit makanan di usus dan juga meningkatkan paparan mukosa kolon terhadap asam empedu yang diketahui memiliki efek karsinogenik. Merokok dan konsumsi alkohol terutama *bir* juga dapat meningkatkan resiko terjadinya kanker kolon. Pasien penyakit inflamasi kronik seperti *ulceratif colotis*, 25% diantaranya akan berkembang menjadi kanker kolon 25 tahun kemudian dan juga paparan terhadap bahan-bahan lain yang masuk bersama makanan, seperti *polycyclic aromatic hydrocarbon* (PAH) yang dapat ditemukan pada daging yang dimasak (dibakar atau diasap) juga dapat memicu terjadinya kanker dan salah satu anggota PAH yang berpotensi

menyebabkan kanker serta sering digunakan dalam penelitian adalah 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA).

2.1.1.1 DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene)

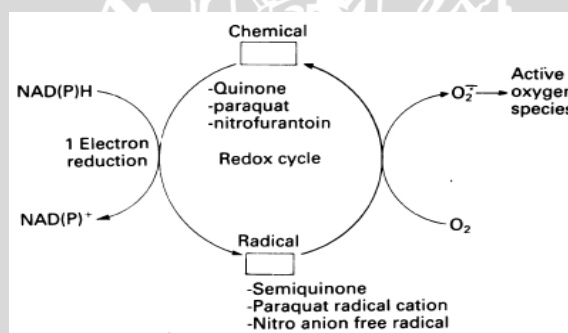
DMBA adalah salah satu anggota PAH yang bersifat karsinogenik, mutagenik, dan immunosupresor. *Polycyclic aromatic hydrocarbon* (PAH) berasal dari hasil pembakaran tidak sempurna bahan-bahan yang mengandung karbon seperti minyak, kayu, batu bara, dan daging (Wisconsin Department of Health and Family Services, 2000). Selain itu PAH juga secara alami dihasilkan dari kebakaran hutan, gunung berapi, tanaman berklorofil, jamur dan bakteri (Lah, 2011). PAH dapat masuk ke dalam tubuh melalui inhalasi asap rokok, asap perapian, emisi kendaraan bermotor, peroral melalui makanan dan air yang tercemar, serta daging (Lah, 2011; Wisconsin Department of Health and Family Services, 2000).

PAH dapat muncul pada daging yang dimasak dengan suhu tinggi atau daging yang langsung terbakar oleh api. PAH dapat terbentuk saat minyak daging menyentuh api, api merambat, menyentuh daging kemudian menyebarkan PAH ke permukaan daging. PAH juga dapat terbentuk pada daging yang diasap (Lah, 2011). Paparan kronis PAH dapat menimbulkan katarak, menurunnya daya tahan tubuh, kerusakan ginjal dan hepar, abnormalitas paru, dan kemerahan pada kulit, serta kanker tergantung dari jalur paparan PAH.

Beberapa jenis PAH diketahui memiliki efek karsinogenik dan mutagenik, seperti benzo[a]pyrene, benzo[e]pyrene, benz[ghi]perylene, chrysene, coronene, cyclopenta[def]phenanthrene, phenanthrene, benzo[a]anthracene, dan DMBA (foodforbreastcancer.com, 2010). DMBA menyebabkan mutasi DNA diawali

protein menjadi tidak fungsional atau berubah fungsi dan berpotensi menjadi tumoregenik (Poirier, 2004).

Selain dengan membentuk *DNA adduct*, metabolit DMBA juga dapat meningkatkan pembentukan ROS melalui metabolisme *dihydrodiols* oleh dihydrodiol dehydrogenase menjadi quinones (Tsai-Turton, 2007). Benzo[a]pyrene quinones (BPQ) tersebut kemudian mengalami proses *redox cycling* yang dapat meningkatkan produksi ROS (Cohen dan Doherty, 1987). ROS yang terlalu banyak akan melampaui kemampuan sel untuk menetralsirnya kemudian sel akan mengalami stres oksidatif yang dapat merusak berbagai macam zat dalam sel seperti lipid, protein dan juga DNA (Gambar 2.2).



Gambar 2.2 Redox Cycling (Cohen dan Doherty, 1987)

2.1.2 Patogenesis Kanker Kolon

Polip kolon merupakan faktor predisposisi terjadinya kanker kolon. Polip dapat terjadi akibat paparan bahan-bahan tumorigenik yang menyebabkan mukosa kolon berproliferasi dengan cepat, sedikit terdiferensiasi, terjadi displasia sel, lalu tumbuh menjadi polip namun perkembangannya belum sampai menjadi kanker. Polip kolon itu sendiri dibagi dalam 3 kelompok, yaitu polip hiperplasia, adenoma, dan sindrom poliposis. Polip hiperplasia merupakan 90% dari seluruh jumlah polip kolon dan bersifat jinak. Jarang sekali dilaporkan kanker kolon yang

berasal dari polip jenis ini. Adenoma menempati hampir 10% dari jumlah polip kolon, 90% diantaranya berdiameter kurang dari 1 cm, 10% sisanya berdiameter lebih dari 1 cm dan berpotensi menjadi kanker. Sindrom poliposis adalah keadaan yang diturunkan yang meliputi *familial adenomatous polyposis* (FAP), *hereditary nonpolyposis colorectal cancer* (HNPCC), *Gardner syndrome*, dan beberapa yang lainnya (Enders, 2011).

Mutasi DNA adalah yang pertama terjadi pada karsinogenesis. Mutasi DNA pada kanker kolon terutama pada kanker jenis adenokarsinoma menyebabkan peningkatan progresifitas adenoma (pre malignan) menjadi adenokarsinoma. Mutasi yang terjadi pertama kali pada adenokarsinoma adalah mutasi pada gen *adenomatous polyposis coli* (APC). Mutasi gen ini tidak hanya didapatkan pada pasien dengan FAP yang mendapatkan mutasi tersebut secara herediter, tapi juga ditemukan pada penderita kanker kolon yang lain tanpa FAP. APC adalah protein yang berfungsi mengatur pembelahan sel. Supresi terhadap gen ini menyebabkan sel membelah secara tidak terkendali, membentuk polip, kemudian ditambah dengan aktivasi onkogen dan dengan beberapa mutasi lainnya termasuk K-ras dan p53, sel dapat berubah menjadi *malignan* yang ditandai oleh peningkatan proliferasi sel, kurang terdiferensiasi, serta tidak rentan lagi terhadap mekanisme kematian sel (Dragovich, 2013; cancerquest.org).

Adenokarsinoma adalah jenis kanker terbanyak pada kolon hingga mencapai 95%. Adenokarsinoma berasal dari sel yang menyusun membran mukosa, yaitu sel goblet yang berfungsi untuk mensekresikan *mucus*. Selain adenokarsinoma juga terdapat beberapa jenis kanker lain yang dapat berkembang pada kolon dengan angka kejadian sangat kecil jika dibandingkan dengan adenokarsinoma, antara lain *gastrointestinal carcinoid tumor* yang

berasal dari sel neuroendokrin, *primary colorectal lymphomas* yang berasal dari sel limfosit, *gastrointestinal stromal tumors* yang berasal dari *interstitial cell of Cajal* yaitu sel yang berperan dalam kontraksi otot polos dengan mengeluarkan *slow wave potential*, *leiomyosarcoma* berasal dari sel otot polos kolon, dan *melanoma* yang jarang terjadi langsung pada kolon melainkan lebih sering karena proses metastase dari kulit (cancercenter.com).

2.1.2.1 Apoptosis

Apoptosis atau kematian sel yang terprogram adalah mekanisme normal yang dibutuhkan untuk perkembangan dan kesehatan organisme multiseluler. Kematian sel yang terprogram inilah yang menyebabkan apoptosis berbeda dari kematian sel lainnya seperti pada nekrosis yang kematian selnya melibatkan enzim degradatif dan terjadi karena dipengaruhi oleh cedera lokal seperti kekurangan suplai darah, terpapar bahan korosif, terbakar, atau lesi lokal karena penyakit (Merriam-Webster, 2007; Dash). Sedangkan dalam apoptosis, sel ikut berperan aktif dalam kematiannya sendiri setelah menerima stimuli tertentu. sehingga sering disebut sebagai bunuh diri sel.

Pada sel normal, apoptosis terjadi karena kurangnya stimuli untuk bertahan hidup, seperti hormon, neutrofin, sitokin ataupun aktifitas listrik, sesuai dengan jenis selnya. Namun pada sel kanker, sinyal-sinyal tersebut sudah tidak berpengaruh lagi, sehingga ada atau tidaknya stimuli, tidak berpengaruh pada kelangsungan hidup sel (Dash).

2.1.2.1.1 Perubahan Morfologi

Perubahan morfologi pada apoptosis meliputi perubahan pada nukleus dan sitoplasma. Di dalam nukleus terjadi kondensasi kromatin dan fragmentasi nuklear, yang diikuti oleh pembulatan sel, reduksi volume sel (piknosis) dan retraksi pseudopodi. Kondensasi kromatin dimulai dari membran nukleus perifer, membentuk struktur seperti bulan sabit. Kemudian kromatin terus mengalami kondensasi sampai hancur membentuk granula-granula tidak beraturan di dalam sel yang membrannya masih intak, proses ini disebut karioheksis (medical-dictionary.thefreedictionary.com; Wong, 2011). Pada tahap selanjutnya terjadi pelipatan membran plasma, zeiosis (penampakan seperti mendidih pada membrane plasma), *budding* fragmen sel (badan apoptotik), perubahan ultrastruktur organela-organela yang berada di sitoplasma, dan hilangnya integritas membran (Bredesen *et al*, 2004). Lalu pada akhirnya sel tersebut difagosit oleh makrofag, namun biasanya sel sudah akan difagosit sebelum terbentuk badan apoptotik. Sementara, sel yang tidak terfagosit akan mengalami degradasi seperti pada nekrosis.

2.1.2.1.2 Perubahan Biokimia

Secara garis besar terdapat tiga hal yang terjadi pada sel apoptosis, yaitu: aktivasi *caspase*, rusaknya DNA dan protein, serta perubahan membran sel dan pengenalan oleh sel fagosit. Pada fase awal apoptosis, terdapat ekspresi fosfatidilserin, di permukaan sel yang berasal dari lapisan membran dalam. Fosfatidilserin inilah yang menjadi penanda bagi makrofag untuk memfagosit sel tersebut. Hal spesifik lainnya yang terjadi pada apoptosis adalah aktivasi

caspase. Aktivasi *caspase* menyebabkan rusaknya protein-protein penting sel, struktur nukleus dan sitoskeleton (Wong,2011).

2.1.2.1.3 Mekanisme Apoptosis

Terdapat tiga jalur apoptosis yang telah diketahui, yaitu jalur intrinsik atau jalur mitokondrial, jalur ekstrinsik, dan yang ketiga adalah jalur endoplasma retikulum intrinsik yang masih belum dipahami dengan jelas mekanismenya (Wong, 2011).

2.1.2.1.3.1 Jalur Ekstrinsik

Jalur ekstrinsik memanfaatkan stimuli dari luar seperti ikatan antara ligan penginduksi apoptosis dengan reseptor apoptosis pada permukaan sel, antara lain antara Fas ligan dengan reseptornya serta antara TNF dengan reseptor TNF tipe 1. Begitu teraktivasi, reseptor-reseptor tersebut berikatan dengan protein spesifik masing-masing dan terjadi *cascade*. Reseptor TNF berhubungan dengan *TNF-receptor associated death domain* (TRADD) dan reseptor Fas berhubungan dengan *Fas-associated death domain* (FAPD), hal ini berlanjut pada penggabungan *death-induced signaling complex* (DISC), kemudian DISC mengaktifasi *procaspase* 8 menjadi *caspase* 8 yang akan memotong BID (*BH3 interacting domain death agonist*) menjadi tBID (*truncated BID*/ BID yang terpotong). tBID akan berikatan dengan membran mitokondria, lalu menghilangkan inhibisi pada Bax sehingga Bax dapat masuk ke dalam mitokondria dan melanjutkan proses apoptosis jalur intrinsik (Dash). Selain dengan mengaktifkan BID, *caspase* 8 juga juga dapat berikatan secara langsung

dengan *procaspase* 3 dan 7 kemudian merubahnya menjadi bentuk aktif dan mengeksekusi proses apoptosis (Ghavami *et al*, 2009)

2.1.2.1.3.2 Jalur Intrinsik

Jalur intrinsik dapat dipicu oleh stres sel, seperti kerusakan DNA, kerusakan siklus sel, hipoksia, hilangnya sinyal bertahan hidup sel, stres oksidatif, dan stres sel berat lainnya. Hal tersebut menyebabkan aktivasi protein golongan Bcl-2 yang proapoptosis, Bax dan Bak. Bax dan Bak masuk ke dalam membran mitokondria dan menyebabkan pelepasan sitokrom c dari ruang antarmembran ke sitosol. Sitokrom c kemudian berikatan dengan APAF1 (*apoptotic protease activating factor 1*), *procaspase* 9, dan ATP membentuk apoptosom. Kompleks ini kemudian mengaktifkan *caspase* 9, *caspase* 9 mengaktifkan *caspase* 3 dan *caspase* 7 yang merupakan eksekutor apoptosis. Selain sitokrom c, mitokondria juga melepaskan AIF (*apoptotic induced factor*), endoneklease G (Smac/DIABLO), dan HtrA2/Omi. Smac/DIABLO dan HtrA2/Omi berperan sebagai aktivator *caspase* dengan menetralkan efek IAP (*inhibitor of apoptosis protein*), sedangkan AIF dan endoneklease G menyebabkan kerusakan dan kondensasi DNA (Wong, 2011; Ghavami *et al*, 2009).

2.1.2.1.4 HSP25/27

Sebagai respon terhadap berbagai macam stres, yaitu biologik (infeksi, inflamasi), fisik (hipoksia, radiasi, panas), kimia (stres oksidatif, paparan terhadap bahan toksik, alkohol, metal, pH), sel memproduksi protein-protein yang mencegah kematian sel. Protein tersebut dikenal dengan nama *heat shock proteins* (HSPs). Disebut demikian karena pertama kali protein-protein ini

ditemukan saat percobaan menggunakan *E.coli* yang diberi rangsang panas pada suhu 46°C setelah sebelumnya diberi rangsang nonletal sebesar 42°C, namun *E.coli* tetap hidup pada suhu 46°C tersebut. Kemudian ditemukan bahwa *E.coli* memproduksi protein tertentu dalam jumlah besar sebagai respon terhadap panas. Protein itulah yang disebut dengan *heat shock protein* (HSP)

Kebanyakan HSP adalah molekular chaperon yang berfungsi memfasilitasi pelipatan protein (*folding*), mencegah agregasi protein, memfasilitasi *re-folding* protein yang terdenaturasi atau mendegradasi protein yang tidak dapat di *re-folding*, memodulasi penggabungan atau penguraian kompleks protein, dan mentransport protein melewati membran seluler (Powers *et al*, 2009). Protein yang tidak terlipat akan terdenaturasi, menjadi inaktif dan biasanya bersifat toksik.

HSP25 pada tikus adalah homolog HSP27 pada manusia adalah salah satu anggota dari *small heat shock protein* (sHSP) yang beranggotakan protein-protein dengan berat molekul antara 15-30 kDa (Garrido, 2006). HSP25/27 merupakan molekular chaperon yang banyak ditemukan pada sel eukariot dan mempunyai sifat sitoprotektif kuat dengan menghambat jalur apoptosis baik intrinsik maupun ekstrinsik (Gambar 2.3). Pada sel normal yang tidak dalam kondisi stres, ekspresi HSP25/27 dapat sangat sedikit atau tidak terdeteksi sama sekali (Li *et al*, 2007).

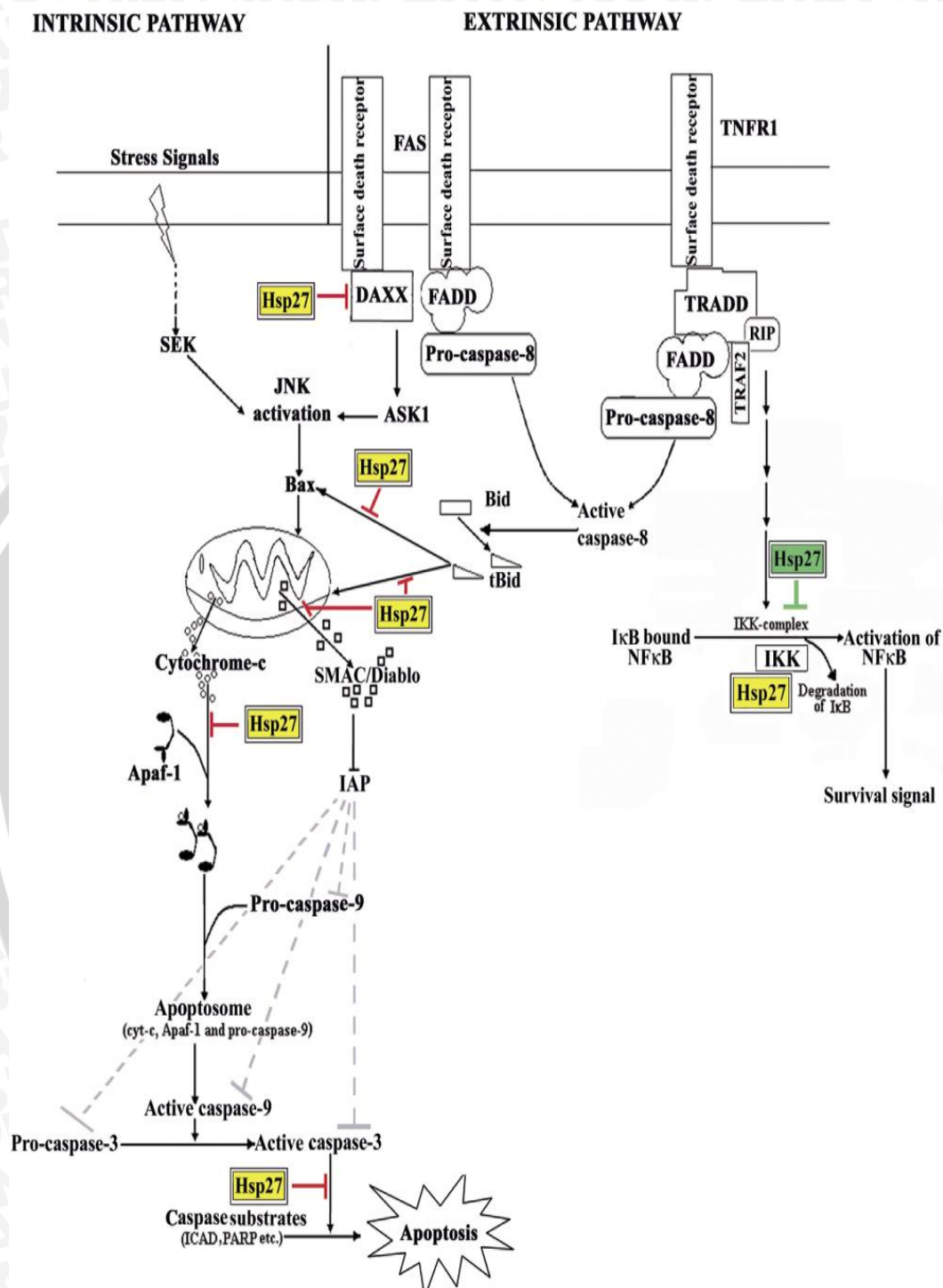
2.1.2.1.4.1 HSP25/27 Menghambat Apoptosis Jalur Ekstrinsik

HSP25/27 menghambat apoptosis jalur ekstrinsik dengan berikatan dengan DAXX (*death-associated protein*) yang termasuk *domain* reseptor Fas, sehingga DAXX tidak dapat mengaktifkan ASK1 (*apoptosis signal regulated*

kinase-1). ASK1 yang tidak aktif tidak dapat mengaktifkan jalur apoptosis JNK (*c-Jun-N-terminal kinase*) (Benn dan Woolf, 2004; Arya et al, 2007). JNK yang aktif seharusnya dapat mengaktifkan Bax (anggota Bcl-2) yang kemudian masuk ke dalam mitokondria dan merangsang mitokondria untuk melepaskan protein-protein proapoptosis. Selain itu, HSP25/27 juga dapat berinteraksi langsung dengan *caspase 3* dalam menghambat proses apoptosis (Arya et al, 2007)

2.1.2.1.4.2 HSP25/27 Menghambat Apoptosis Jalur Intrinsik

HSP25/27 menghambat jalur intrinsik dengan menstabilkan tBID, sehingga tBID tidak dapat berikatan dengan membran mitokondria dan Bax tidak dapat masuk ke dalam mitokondria yang berakibat pada tidak dilepaskannya sitokrom c, AIF, dan zat proapoptotik lainnya. Selain itu, HSP25/27 juga berikatan dengan sitokrom c, mencegahnya bergabung dengan APAF1, sehingga apoptosom tidak terbentuk dan yang pada akhirnya *procaspase 3* tidak dapat menjadi *caspase 3*. *Caspase 3* yang telah terktifikasi dihambat lagi oleh HSP25/27, sehingga apoptosis tidak terjadi (Benn dan Woolf, 2004; Arya et al, 2007).



Keterangan:



mengaktifkan

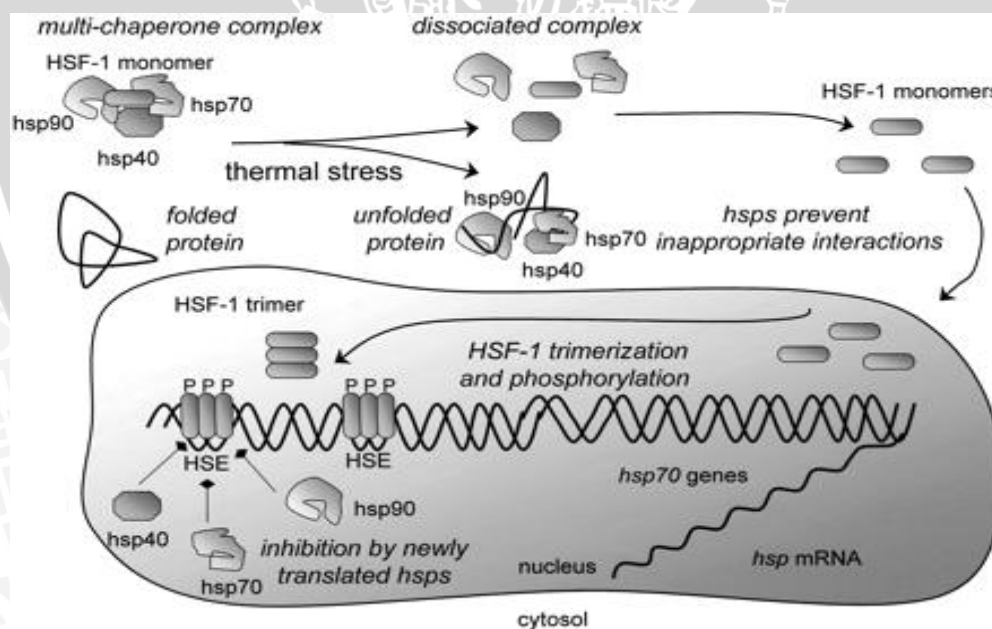


menghambat

Gambar 2.3 Peran Antiapoptosis HSP25/27 (Arya et al, 2007)

2.1.2.1.4.3 Sintesis HSP25/27

Dalam keadaan normal, *heat shock factor 1* (HSF1) berikatan dengan HSP40, HSP70, dan HSP90 membentuk *multi-chaperon complex*. Pada kondisi stres, jumlah protein yang terdenaturasi meningkat tajam. Hal ini merangsang HSP untuk melepaskan ikatannya dengan HSF1 untuk berikatan dengan protein-protein tersebut. HSF1 monomer yang berada di sitoplasma masuk ke dalam nukleus kemudian membentuk HSF1 trimer dan terfosforilasi. HSF1 trimer yang telah terfosforilasi tersebut kemudian berikatan dengan *heat shock element* (HSE) pada DNA dan memediasi transkripsi HSP25/27 dan beberapa jenis HSP lainnya. Aktivitas HSF trimer dapat dihambat oleh interaksi antara HSP40, HSP70, dan HSP90 dengan HSF membentuk lagi *multi-chaperon complex* (Tomanek, 2002).

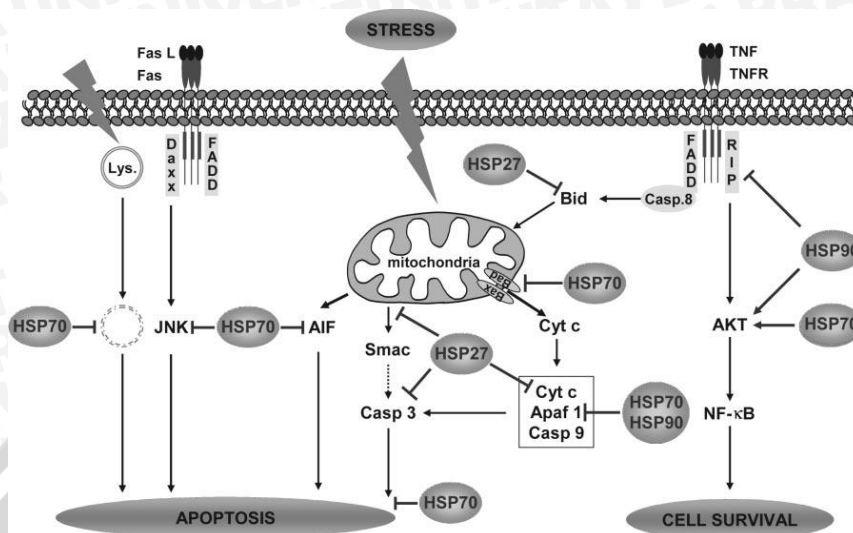


Gambar 2.4 Sintesis HSP (Tomanek, 2002)

2.1.2.1.5 HSP dan Apoptosis

Selain HSP25/27 terdapat pula HSP lain yang terlibat dalam proses apoptosis. Bersama dengan HSP25/27, HSP-HSP tersebut menghambat proses apoptosis dengan berikatan pada protein-protein kunci apoptosis baik pada jalur ekstrinsik maupun intrinsik. HSP70 mencegah Bax masuk ke dalam mitokondria sehingga menghambat mitokondria untuk melepaskan protein-protein proapoptosis (sitokrom c). Pada tahap *post* mitokondria, HSP70 dan HSP90 berikatan dengan APAF1, yang merupakan protein penyusun apoptosom sehingga mencegah terbentuknya apoptosom dan menghambat aktivasi *caspase*. HSP70 juga dapat berikatan dengan JNK1 yang berakibat pada terhambatnya proses apoptosis yang melibatkan BID (*BID-dependent cell death*) dengan mekanisme yang masih belum diketahui (Schmitt *et al*, 2007; Arya *et al*, 2007).

HSP90 berikatan dengan APAF1 dan menghambat secara langsung ikatan antara APAF1 dan *procaspase* 9. HSP90 juga diketahui berinteraksi dengan serine/threonine kinase (Akt/PKB) yaitu protein yang memediasi *survival signal* yang merespon pada stimulasi faktor pertumbuhan. Selain dengan Akt, HSP90 juga berinteraksi dengan *receptor interacting protein* (RIP-1). RIP-1 adalah salah satu *protein cascade* yang berinteraksi dengan *TNF-receptor 1* (TNFR-1). Dengan berikatannya HSP90 dengan RIP-1 maka jalur NF- κ B yang merupakan jalur proapoptosis akan terhambat dan proses apoptosis akan terganggu (Gambar 2.5) (Schmitt *et al*, 2007; Arya *et al*, 2007).



Gambar 2.5 Peran Antiapoptosis HSP (Schmitt *et al*, 2007)

2.1.3 Terapi dan Pencegahan Kanker Kolon

2.1.3.1 Terapi Kanker Kolon

Terapi terhadap kanker kolon meliputi pembedahan, radiasi dan kemoterapi. Pembedahan adalah yang paling sering dilakukan pada setiap stadium kanker kolon, dan pelaksanaannya tergantung pada stadium, ukuran tumor, dan kondisi kesehatan pasien. Pada pembedahan dilakukan pengangkatan tumor itu sendiri, daerah sehat disekitarnya, serta nodul limfatik untuk mencegah kekambuhan. Terapi radiasi menggunakan X-ray atau gelombang lain dengan energi tinggi berguna dalam membunuh sel kanker dan mengecilkan tumor. Radioterapi dapat dilaksanakan sebelum atau sesudah pembedahan untuk mengecilkan tumor sehingga hanya dibutuhkan pembedahan minimal atau untuk membunuh sel-sel tumor yang masih tersisa dari pembedahan. Kemoterapi dapat digunakan sebagai terapi tambahan atau terapi utama. Kemoterapi yang dilaksanakan setelah pembedahan fungsinya sama dengan radioterapi yaitu untuk membunuh sisa sel kanker dan mencegah

kekambuhan. Kemoterapi dapat digunakan sebagai terapi utama saat pembedahan tidak mungkin dilakukan karena pertumbuhan kanker telah sangat meluas atau pada kanker yang telah bermetastase ke organ lain.

Terapi herbal yang sekarang sedang banyak dikembangkan memanfaatkan kandungan alam seperti flavonoid, likofen, beta-karotin, serta beberapa senyawa lain dalam sayuran dan buah sebagai antioksidan untuk menetralkan radikal bebas (Hartono, 2010). Selain itu, flavonoid quercetin dapat bekerja sebagai supresor terhadap proliferasi sel kanker. Alkaloid vinka yang terdapat dalam tapak dara (*Catharanthus roseus*) juga bermanfaat dalam menghambat proliferasi dan penyebaran sel kanker. Tanaman meniran dan kunyit putih dapat meningkatkan jumlah sel limfosit dan sel NK (*natural killer*) yang berperan dalam eliminasi sel kanker serta jamur maitake yang juga dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh dan membuat sel kanker lebih sensitif terhadap obat-obat kemoterapi dan radiasi. Selain itu, juga ada kelor (*Moringa oleifera*) yang telah banyak digunakan pada berbagai jenis penyakit karena kandungan gizinya yang berlimpah.

2.1.3.1.1 Kelor (*Moringa oleifera*)

2.1.3.1.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Kelor termasuk dalam tumbuhan yang berpembuluh, berbunga, dan menghasilkan biji berkeping dua. Adapun klasifikasinya adalah:

- Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
- Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
- Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
- Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)

Kelas : Magnoliopsida (Dikotil)

Sub Kelas : Dilleniidae

Ordo : Capparales

Famili : Moringaceae

Genus : Moringa

Spesies : *Moringa oleifera* Lam

Kelor merupakan tanaman tropis yang aslinya berasal dari India, Pakistan, Bangladesh, dan Afganistan, berbentuk pohon dengan tinggi 7-12 m. Berbatang kayu berwarna putih kotor berbintik hitam. Daun majemuk bertangkai panjang, lebar daun sekitar 1-2 cm. Bunga majemuk, tumbuh di ketiak daun, berwarna putih dan menyebar aroma khas. Tumbuh liar di ladang yang cukup air dan mendapat sinar matahari penuh, tetap hijau di akhir musim kemarau, dan dapat hidup di dataran rendah maupun dataran tinggi hingga ketinggian ± 1000 m dpl. Perbanyakkan dapat secara generatif dengan menanam bijinya maupun vegetatif menggunakan stek sehingga mudah dibiakkan.

2.1.3.1.1.2 Kandungan Gizi dan Manfaat Daun Kelor

Daun kelor kaya akan vitamin, mineral, polifenol, flavonoid, alkaloid, dan protein (Coppin, 2008). Daun kelor memiliki kandungan vitamin A lebih banyak daripada wortel, lebih banyak vitamin C daripada jeruk, lebih banyak kalsium daripada susu, lebih banyak zat besi daripada bayam, dan kandungan proteinnya setara dengan susu dan telur (Fahey, 2005). Daunnya banyak mengandung kalsium, fosfor, selenium, asam amino tinggi yang sebanding dengan putih telur, serta alfa-linolenat. Kandungan nutrisi yang banyak itu menyebabkan daun kelor memiliki banyak khasiat antara lain dapat digunakan untuk mengatasi malnutrisi

pada ibu dan bayi, melawan hipertensi, menurunkan gula darah, asma, proteksi terhadap radiasi, menghambat pertumbuhan tumor, serta melawan penyakit inflamasi kronik (Fahey, 2005; Kasolo, 2010).

Flavonoid merupakan zat yang banyak ditemukan pada tumbuh-tumbuhan. Hingga sekarang telah ditemukan 4000 jenis flavonoid. Banyak diantaranya memiliki tingkat toksisitas rendah pada mamalia dan beberapa digunakan pada terapi medis. Flavonoid juga diketahui memiliki efek antimutagenik, antikarsinogenik, antiinflamasi, antioksidan, antihepatotoksik, serta antimikroba. Beberapa diantaranya juga dapat mencegah mortalitas karena penyakit kardiovaskular (Narayana *et al*, 2001).

Daun *Moringa oleifera* mengandung 12 flavonoid dengan yang terbanyak adalah quercetin glikosida, kaemferol glikosida, dan glikosida malonat dengan yang terbanyak adalah quercetin (Coppin, 2008). Flavonoid aglikan lebih mudah diserap oleh tubuh karena bersifat lipofilik, sementara flavonoid glikosida membutuhkan enzim β -glukosidase untuk melepas ikatan antara glukosa dengan flavonoid (Nemeth *et al*, 2003). Kandungan quercetin glikosida dalam daun kelor mencapai 232,5 mg/kg (Miean dan Mohamed, 2000) dan quercetin aglikan sebanyak 89,8 mg/100g (Yang *et al*, 2008). Sementara flavonoid lain dalam bentuk glikosida tidak ditemukan pada penelitian Yang *et al* (2008). Kaemferol aglikan dan isorhamnetin aglikan diketahui terdapat dalam jumlah yang lebih sedikit daripada quercetin aglikan yaitu masing-masing sebesar 36,3 mg/100g dan 2,9 mg/100g (Miean dan Mohamed, 2000).

2.1.3.1.1.2.1 Quercetin

Quercetin adalah salah satu anggota flavonoid yang banyak diteliti efek antikarsinogeniknya. Dalam mencegah kanker, quercetin berpengaruh dalam regulasi siklus sel, berinteraksi dengan reseptor estrogen tipe 2, menghambat tirosin kinase, dan menyupresi ekspresi HSP (Lamson dan Brignal, 2000).

Quercetin menyebabkan berhentinya siklus sel dengan menghambat ekspresi protein p53 mutan, dan menyupresi ekspresi gen *heat shock protein* (HSP). Hal ini menyebabkan perpanjangan fase G1 sel. Inhibisi tirosin kinase menyebabkan terhambatnya jalan sinyal pertumbuhan sel ke nukleus. Quercetin mengurangi ekspresi HSP dengan menghambat ikatan antara HSF dengan HSE pada DNA, dengan mengubah struktur HSF dan menurunkan aktivasi transkripsi DNA melalui penghambatan forforilasi HSF (Hosokawa, 1992), sehingga HSP tidak terbentuk.

2.1.3.2 Pencegahan Kanker Kolon

Usaha pencegahan terhadap kanker kolon antara lain:

a) Modifikasi gaya hidup

Memperbanyak makan serat karena serat mempercepat waktu transit fases dalam usus, dengan demikian mempersingkat waktu paparan mukosa kolon terhadap bahan karsinogen. Mengurangi makan daging merah dan daging yang diproses, seperti diasap, dipanggang, dan dibakar karena dapat menjadi sumber PAH. Mengonsumsi bawang merah dan turmeric terbukti dapat mengurangi jumlah dan ukuran polip. Mengurangi konsumsi alkohol, merokok dan sering berolahraga dapat meningkatkan daya tahan tubuh.

b) Kemopreventif dengan NSAID

NSAID dapat mengurangi proliferasi sel, menghambat pertumbuhan tumor, memperlambat siklus sel, dan menstimulasi apoptosis dengan menghambat kerja enzim *cyclooxygenase* (COX) (Cappel, 2005).

c) Polipektomi

Koloni polip yang berdiameter kurang dari 0,8 cm biasanya dilakukan *hot biopsy*, terutama yang berbentuk *sessile*, sementara polip yang berdiameter lebih dari 0,8 cm dilakukan *snare polypectomy*, terutama polip bertangkai (Cappel, 2005).

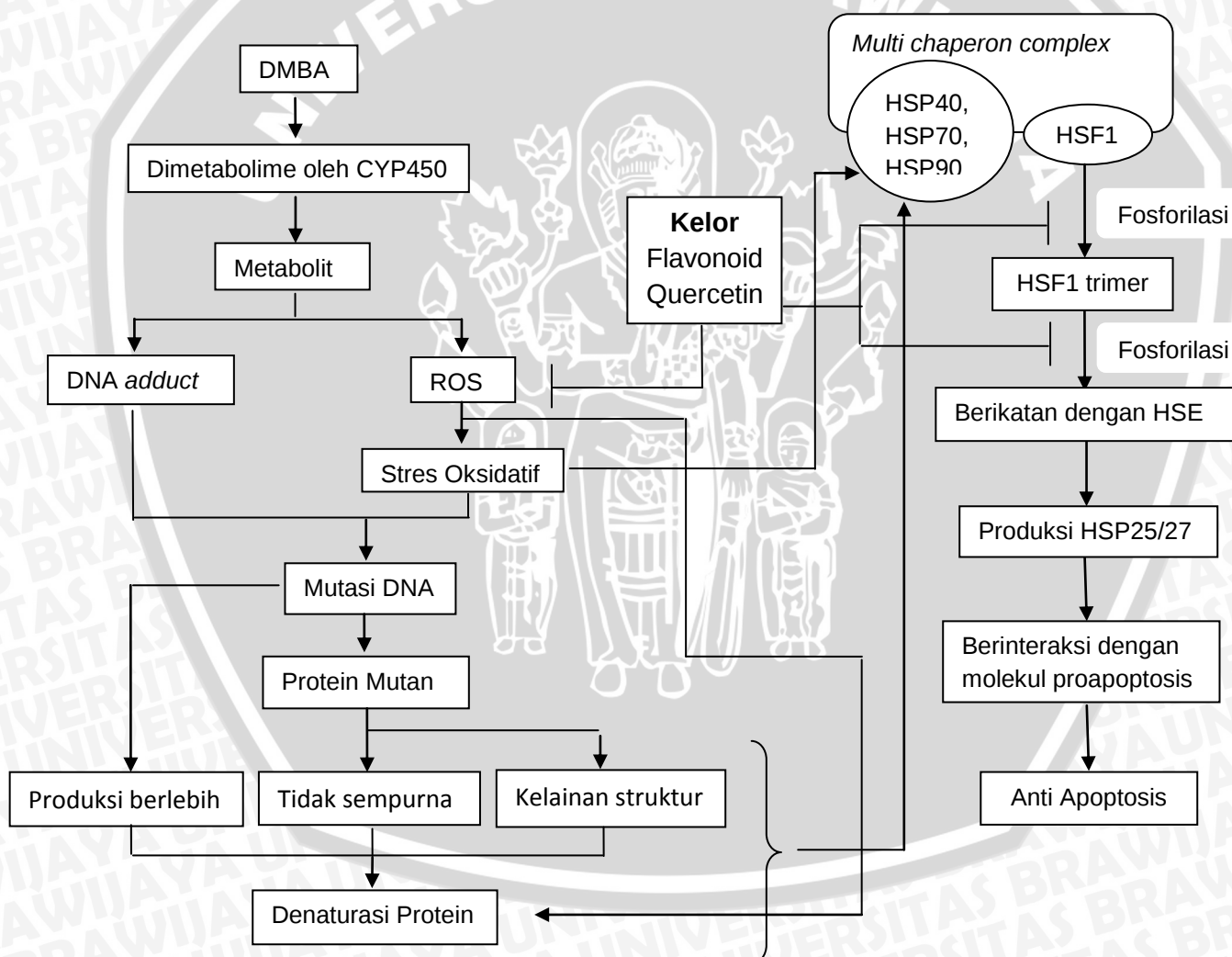


BAB III

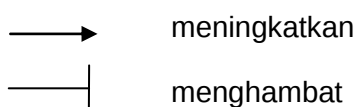
KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep

Adapun alur pemikiran penelitian ini adalah sebagai berikut:



Keterangan:



Keterangan

DMBA menyebabkan mutasi DNA diawali dengan metabolisme DMBA oleh anggota dari sitokrom P450 (cytochrome P450/ CYP), yaitu CYP1A1 dan CYP1B1, sitokrom P450 merupakan kelompok besar enzim yang bertugas mengkatalis proses oksidasi bahan-bahan organik termasuk DMBA. Hasil metabolit akhirnya berupa 7,12-DMBA-3,4-diol-1,2- epoxide (*highly reactive diol epoxides*) dapat menyisip di antara basa DNA (*DNA adduct*) dan berpotensi menyebabkan mutasi DNA. Selain itu, metabolit intermediat DMBA, yaitu 7,12-DMBA-3,4-diol (*dihydrodiols*) yang dimetabolisme oleh dihydrodiol dehydrogenase menjadi quinones akan mengalami proses *redox cycling* dan dapat meningkatkan pembentukan ROS. ROS yang berlebih akan mengakibatkan stres oksidatif pada sel yang dapat merusak berbagai macam zat dalam sel seperti lipid, protein (denaturasi protein) dan juga DNA sehingga berpotensi menghasilkan DNA mutan. DNA yang mutan dapat menyebabkan kelainan dalam pembentukan protein. Protein yang diproduksi dapat melebihi jumlah normalnya, atau akan menjadi protein mutan yang mengalami perubahan struktur, selanjutnya mempengaruhi kemampuan protein dalam berikatan dengan molekul lain dan menyebabkan protein menjadi tidak fungsional atau berubah fungsi dan berpotensi menjadi tumoregenik (Poirier, 2004).

Dalam produksi maupun kelangsungan hidupnya, protein memerlukan asistensi HSP dalam menjaga protein agar tidak mudah terdenaturasi. Produksi protein berlebih, pembentukan protein yang tidak fungsional, kelainan pada struktur protein yang menyebabkannya susah untuk dilipat (*folding*), atau denaturasi protein langsung oleh ROS akan memicu pelepasan HSP dari *multi-chaperon complex* yang berada di dalam sitoplasma. HSF1 monomer yang

terlepas dari *multi-chaperon complex* tersebut kemudian akan terfosforilasi dan masuk ke dalam nukleus. Di dalam nukleus ini, HSF1 tersebut akan terfosforilasi kembali lalu membentuk HSF1 trimer yang kemudian berikatan dengan HSE (*heat shock element*) pada promotor gen dan memodulasi transkripsi HSP25/27 dan beberapa jenis HSP lain. HSP25/27 kemudian berinteraksi dengan beberapa protein kunci proapoptosis pada jalur intrinsik maupun ekstrinsik, sehingga proses apoptosis terganggu.

Ekstrak daun kelor melalui quercetin dapat menghambat produksi HSP25/27 dengan menghambat fosforilasi HSF1 monomer dan mengganggu ikatan antara HSF1 trimer dengan HSE, sehingga tidak terbentuk mRNA yang memodulasi produksi HSP25/27. Selain menghambat produksi HSP25/27 secara langsung, ekstrak daun kelor juga diharapkan dapat meminimalisir jumlah protein yang terdenaturasi melalui kandungan flavonoidnya dalam menurunkan terbentuknya ROS sebagai donor atom hidrogen. Dengan menurunnya jumlah protein yang denaturasi maka stimulasi terhadap HSF1 akan berkurang yang pada akhirnya akan menurunkan produksi HSP25/27. Oleh karena itu, ekstrak metanol daun kelor diharapkan dapat menurunkan ekspresi HSP25/27 dengan kedua mekanisme tersebut di atas sehingga proses apoptosis dapat berjalan dengan baik karena tidak ada hambatan pada protein-protein proapoptosis.

3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan ekspresi HSP25 pada jaringan kolon tikus Wistar yang diinduksi oleh DMBA.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Rancangan eksperimental yang digunakan adalah rancangan eksperimen sederhana (*post test control group design*) dimana subyek dibagi menjadi 5 kelompok (I sampai dengan V) secara random. Tiap kelompok terdiri dari 6 tikus, kecuali kelompok II yang terdiri dari 9 tikus dengan beberapa tikus sebagai cadangan. Kelompok pertama adalah tikus yang tidak diberi diet mengandung DMBA (kontrol negatif/ K(-)), kelompok kedua adalah tikus yang diberi diet mengandung DMBA saja (kontrol positif/ K(+)), sedangkan tiga kelompok sisanya sebagai kelompok Perlakuan diberi diet DMBA dengan ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dalam beberapa dosis berbeda, yaitu 20 mg/kg/hari untuk kelompok Perlakuan 1 (P1), 40 mg/kg/hari untuk kelompok Perlakuan 2 (P2), dan 80 mg/kg/hari untuk kelompok Perlakuan 3 (P3).

4.2 Hewan Coba

4.2.1 Hewan 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 pada masing-masing kelompok, kecuali kelompok II yang memiliki 5 cadangan. Jadi untuk 5 kelompok dibutuhkan sebanyak 33 tikus.

4.2.3 Kriteria Inklusi

Adapun kriteria inklusi yang dipakai dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Strain wistar
2. Umur 2 bulan
3. Berat badan $\pm$ 200 gr
4. Jenis kelamin jantan
5. Dalam keadaan sehat selama penelitian

4.2.4 Kriteria Eksklusi

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

4.3 Variabel Penelitian

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

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah ekspresi HSP25 dalam jaringan kolon. 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. Strain wistar
2. Umur 2 bulan
3. Berat badan $\pm$ 200 gr

4. Jenis kelamin jantan
5. Dalam keadaan sehat selama penelitian
6. Pemberian diet DMBA
7. Kondisi lingkungan kandang
8. Pemberian per oral ekstrak metanol daun kelor dengan sonde

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

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

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang dipergunakan adalah:

1. Alat Pemeliharaan Binatang Coba
Kandang dari kotak plastik, tutup kandang dari anyaman kawat, botol air, rak tempat menaruh kandang
2. Alat Pembuat Makanan Binatang Coba
Baskom plastik, timbangan, sarung tangan, gelas ukur
3. Alat Pengambilan Sampel
Seperangkat alat bedah, spuit 5 ml, seperangkat tabung reaksi, kapas
4. Alat pemeriksaan HSP25 pada jaringan kolon adalah *Immunohistochemistry kit*, mikroskop.

4.5.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang dipakai dalam penelitian ini adalah:

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

2. DMBA

3. Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*)

Ekstrak daun kelor didapatkan dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol karena ekstrak metanol daun kelor memiliki kandungan fenol total, flavonoid total, dan efek antiradikal bebas yang lebih baik daripada menggunakan pelarut lain (Jonathan *et al*, 2012). Prinsip dari metode maserasi ini adalah mengekstrak senyawa dalam daun kelor tanpa menyebabkan kerusakan pada senyawa tersebut karena metode ini tidak menggunakan pemanasan dan dikerjakan dalam suhu ruangan.

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

4. Bahan Pemeriksaan Immunohistokimia

Jaringan kolon tikus, HSP25 dalam jaringan kolon, IHK *kit unit*.

4.6 Definisi Operasional

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

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

2. Tikus karsinogenesis kolon

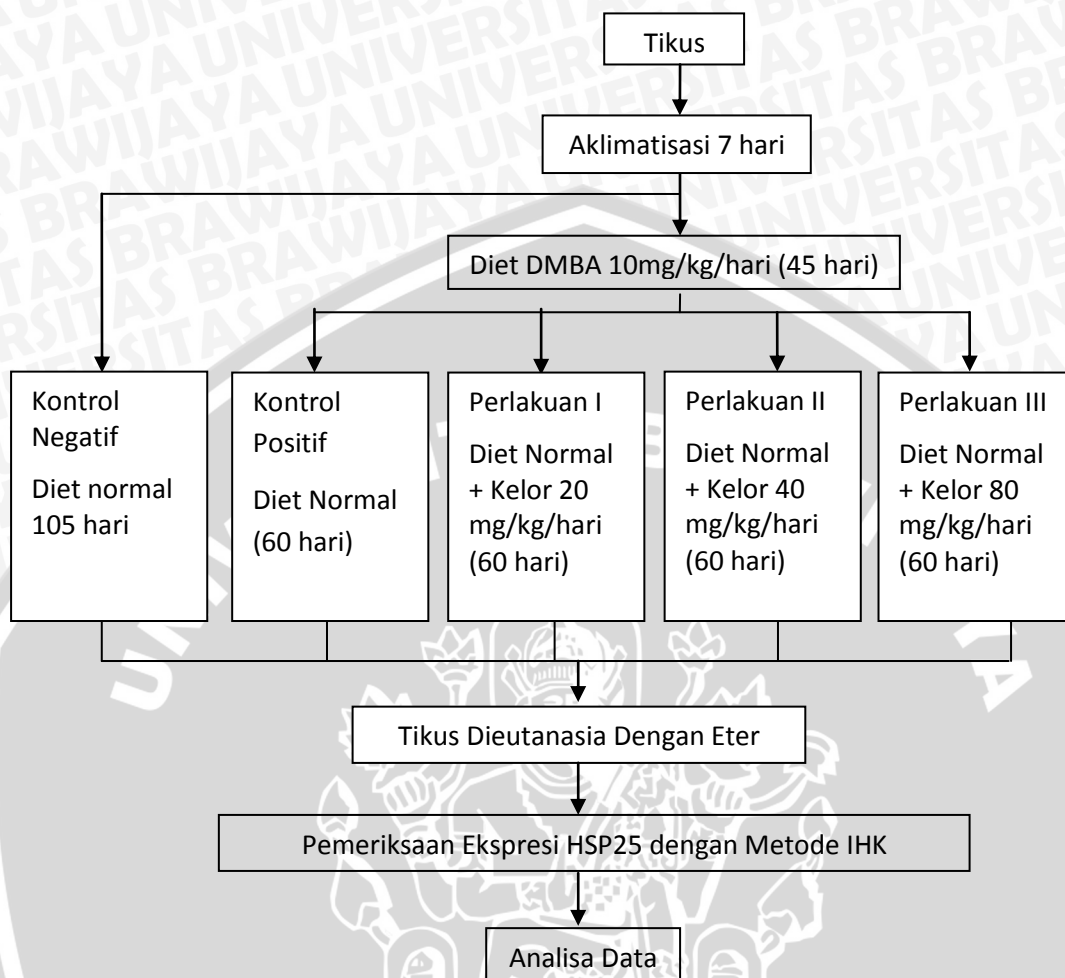
Tikus wistar diberi 10 mg/kg/hari 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) per oral (sonde) selama 45 hari (Li *et al*, 2002).

3. Ekspresi HSP25 pada jaringan kolon

Ekspresi HSP25 pada jaringan kolon tikus adalah HSP25 yang diukur dengan metode IHK pada setiap kelompok tikus. Ekspresi HSP25 diukur dengan menghitung banyaknya sel yang mengekspresikan HSP25 yang ditandai dengan warna coklat dengan perbesaran mikroskop 400x sebanyak 10 lapangan pandang pada setiap tikus (Suarsana dkk, 2010).

4.7 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh pengetahuan mengenai efek ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap ekspresi HSP25 pada jaringan kolon tikus (*Rattus norvegicus*) wistar dengan diet DMBA. Alur penelitian dapat dijelaskan melalui bagan berikut:



Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.7.1 Aklimatisasi

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

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

Tikus wistar diberi 10 mg/hari 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) per oral (sonde). Pemberian DMBA dilakukan selama 45 hari. Setelah 45 hari, 1 ekor tikus yang diberi DMBA tanpa ekstrak *Moringa oleifera* dibedah untuk melihat adanya perkembangan karsinogenesis pada jaringan kolon.

4.7.3 Perlakuan

4.7.3.1 Pemeliharaan

Dalam masa ini, kelima kelompok tikus mendapat perlakuan yang berbeda. Untuk kelompok I (K(-)), tikus hanya diberi pakan normal (standar) saja selama 105 hari. Kelompok perlakuan II hingga V diberi diet DMBA sebanyak 10 mg/kg/hari dengan sonde selama 45 hari pertama. Kemudian kelompok II (K(+)) diberi diet normal tanpa pemberian ekstrak metanol daun kelor, kelompok III (P1) diberi ekstrak metanol daun kelor per oral dengan dosis 20 mg/kg/hari dengan sonde + diet normal, kelompok IV (P2) diberi ekstrak metanol daun kelor per oral dengan dosis 40 mg/kg/hari + diet normal, dan kelompok V (P3) diberi ekstrak metanol daun kelor per oral dengan dosis 80 mg/kg/hari + diet normal. Ekstrak metanol daun kelor tersebut diberikan masing-masing selama 60 hari (Indra *et al*, 2011).

4.7.3.2 Pembedahan

Pemeriksaan ekspresi HSP25 pada eksperimen ini memerlukan jaringan kolon tikus. Penelitian ini merupakan penelitian payung, yang meneliti efek ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar yang diinduksi 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) dengan

parameter yang berbeda-beda, antara lain: TNF- α , IL-6, CD68, caspase 3, dan lain-lain. Karena itu, setelah 60 hari pemberian per oral daun kelor kedua puluh lima tikus dibunuh dengan cara pembiusan eter. Kemudian abdomen dibuka, sebagian jaringan kolon diambil untuk dilakukan pemeriksaan jumlah ekspresi HSP25.

4.7.3.3 Pengukuran Ekspresi HSP25

Ekspresi HSP25 diukur dengan metode imunohistokimia, adapun tahap-tahapnya sebagai berikut (Laboratorium Patologi Anatomi FKUB; Laboratorium Fisiologi FKUB):

1. Persiapan jaringan.

a. Proses pemotongan jaringan makros

- Jaringan karsinogenesis kolon dipotong $\pm$ 2-3mm
- Dimasukkan ke dalam *tissue cassette* sesuai dengan kode gross
- Jaringan dimasukkan ke dalam formalin 10% (fiksasi)
- Diproses menggunakan Tissue Tex Processor selama 2 jam

b. Proses pengeblokan dan pemotongan jaringan

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

2. Deparafinisasi dan rehidrasi menggunakan:

- Setelah dipotong sesuai dengan ketebalan, jaringan diletakkan dalam oven selama 15 menit dengan suhu $\pm$ 70°C

- Dimasukkan ke dalam larutan xylol1 dan xylol2 masing-masing 15 menit dengan temperatur 70°C.
 - Dichelupkan ke dalam 4 tabung alkohol 96% masing-masing 3 menit
 - Dibilas dalam air mengalir selama 10 menit
3. *Blocking* dengan BSA 1% selama 30 menit untuk mencegah bereaksinya bahan endogen dengan proses pewarnaan selanjutnya dibilas dengan PBS 3 kali masing-masing 5 menit.
 4. Pemberian antibodi primer HSP25 pada suhu 37°C selama 60 menit, lalu bilas dengan PBS 3 kali masing-masing selama 5 menit.
 5. Pemberian antibodi sekunder selama 60 menit lalu dibilas lagi dengan PBS 2 kali selama masing-masing 5 menit.
 6. SA-HRP 60 menit, bilas dengan PBS 2 kali masing-masing 5 menit
 7. DAB $\pm$ 20%, lalu dicuci dengan aquades 5 menit
 8. *Control staining* dengan mayer hematoxylen 10 detik, lalu dicuci dengan aquades sampai bersih dan dikeringkan dengan tisu.
 9. *Mounting* dengan etelan

4.8 Pengolahan dan Analisis Data

Penelitian ini menggunakan pengujian hipotesis komparatif dan korelatif, adapun langka-langkahnya sebagai berikut:

1. Pengujian normalitas persebaran data.
2. Pengujian homogenitas varian
3. Pengujian *One-way* ANOVA
4. Pengujian *Post Hoc test* (uji Tuckey HSD)
5. Pengujian *Homogenous Subsets*

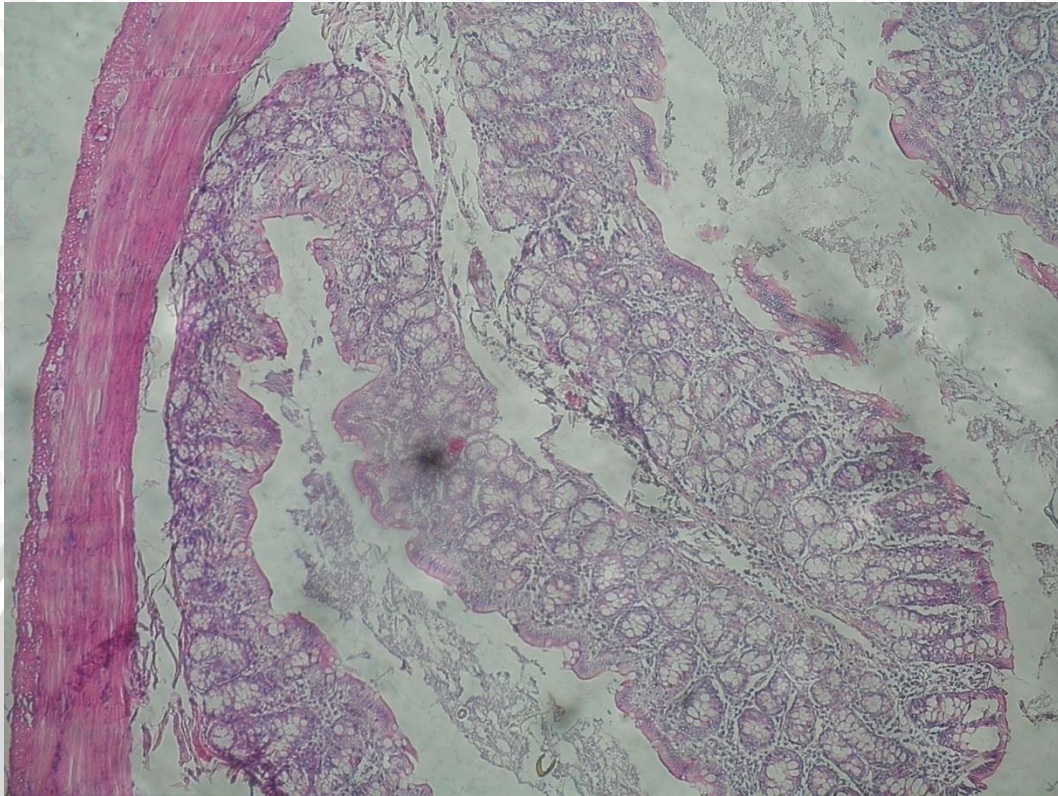
BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

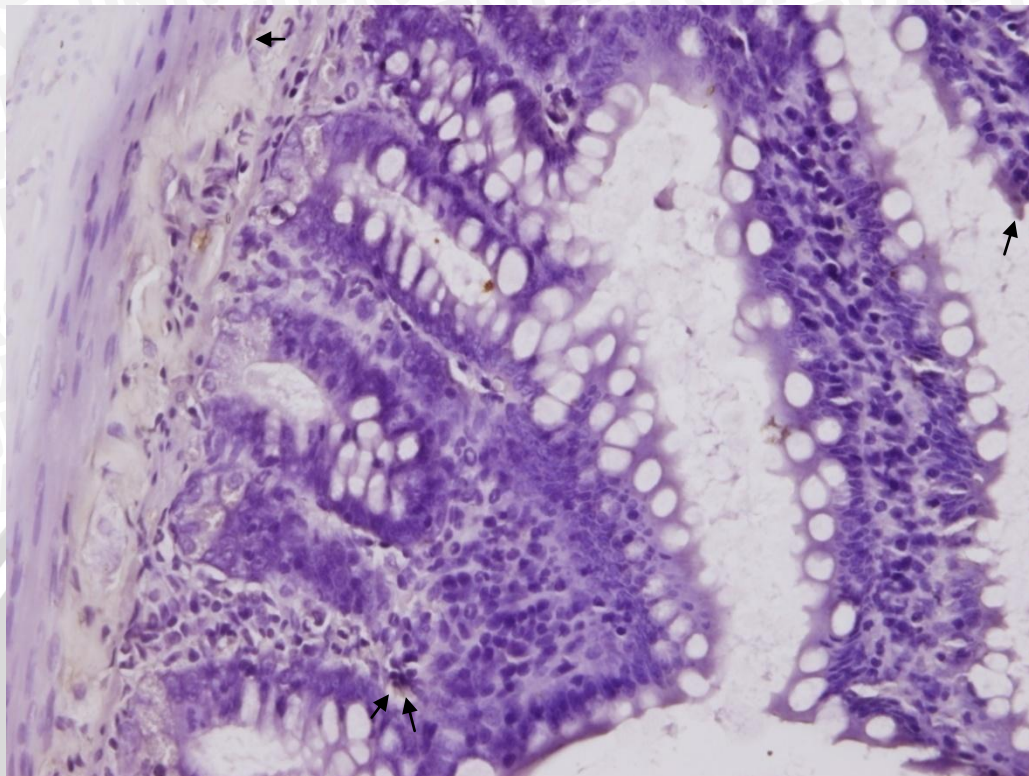
Penelitian ini dilakukan dengan membentuk lima kelompok perlakuan. Kelompok pertama sebagai Kontrol Negatif (K(-)) yang hanya diberi pakan normal tanpa DMBA maupun ekstrak metanol daun kelor. Kelompok kedua sebagai Kontrol Positif (K(+)) yang diberi pakan normal dan DMBA saja selama 45 hari. Sedangkan tiga kelompok sisanya sebagai kelompok perlakuan yang diberi pakan normal, DMBA selama 45 hari kemudian diberi ekstrak metanol daun kelor per oral dengan sonde selama 60 hari dengan tiga dosis berbeda, yaitu 20mg/kg/hari untuk kelompok Perlakuan 1 (P1), 40mg/kg/hari untuk kelompok Perlakuan 2 (P2), dan 80mg/kg/hari untuk kelompok Perlakuan 3 (P3).

Setelah 45 hari diberi DMBA, salah satu tikus dari K(+) dieutanasia dan jaringan kolonnya diambil untuk melihat perkembangan karsinogenesis (Gambar 5.1). Setelah berkomunikasi dengan dr. Sarwo Bakti, SpPA, diketahui bahwa jaringan kolon tikus tersebut telah mengalami hiperplasia yang ditandai oleh peningkatan proliferasi sel epitel kolon dengan morfologi sel masih normal.

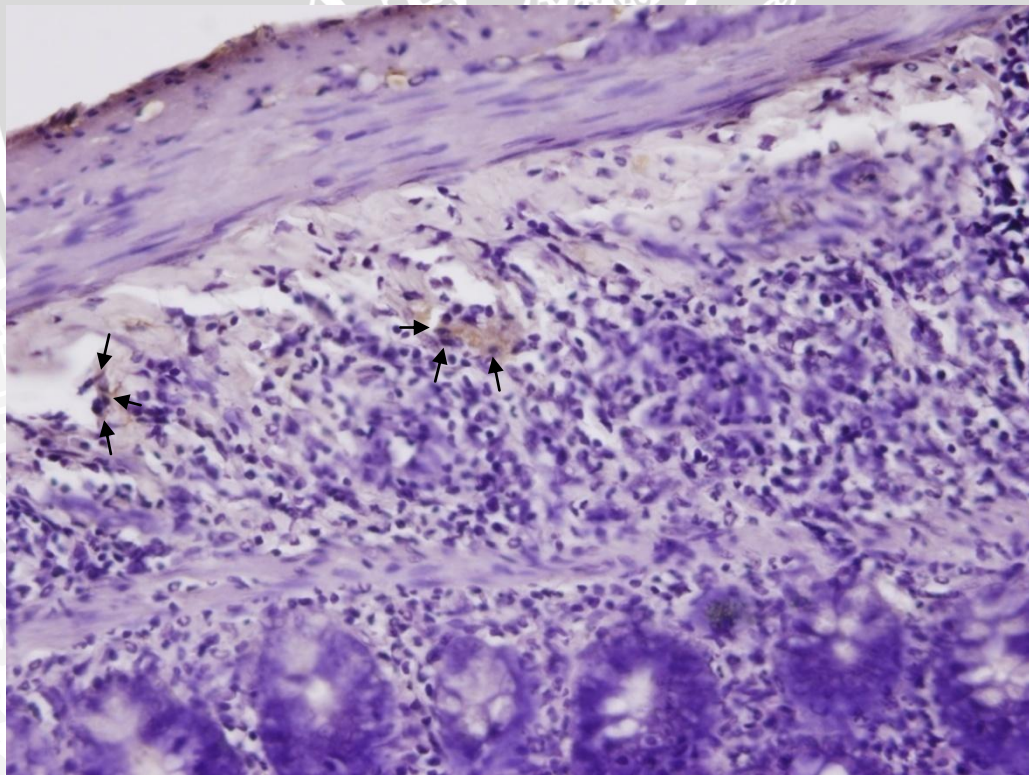


Gambar 5.1 Histologi kolon post DMBA 45 hari, tampak bahwa mukosa kolon mengalami hiperplasia (pengecatan HE, perbesaran 100x).

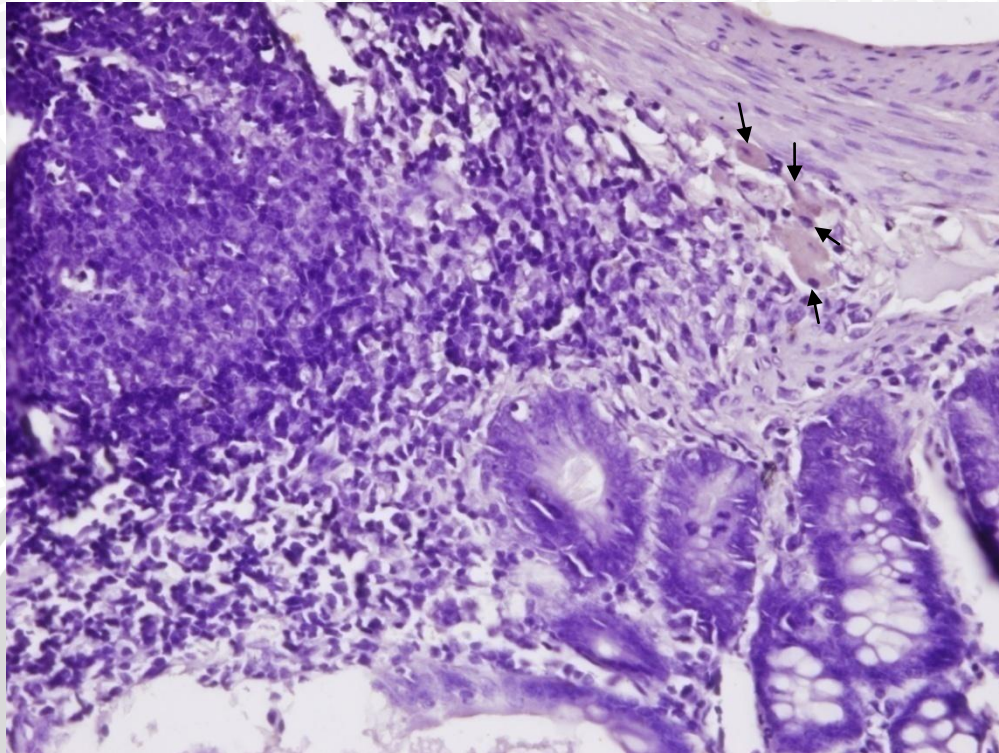
Setelah 60 hari diberi ekstrak metanol daun kelor, kelima kelompok tikus dibedah dan jaringan kolonnya diambil kemudian dicat dengan pengecatan imunohistokimia. Ekspresi HSP25 dievaluasi dengan cara menghitung jumlah sel yang memberikan hasil positif (warna coklat) dalam sepuluh lapang pandang dibawah mikroskop dengan pembesaran 400x. Hasil penghitungan dari setiap lapang pandang dijumlahkan kemudian dirata-ratakan dengan hasil penghitungan pada sampel lain yang berada dalam perlakuan yang sama, sehingga didapatkan rata-rata setiap kelompok seperti pada tabel 5.1.



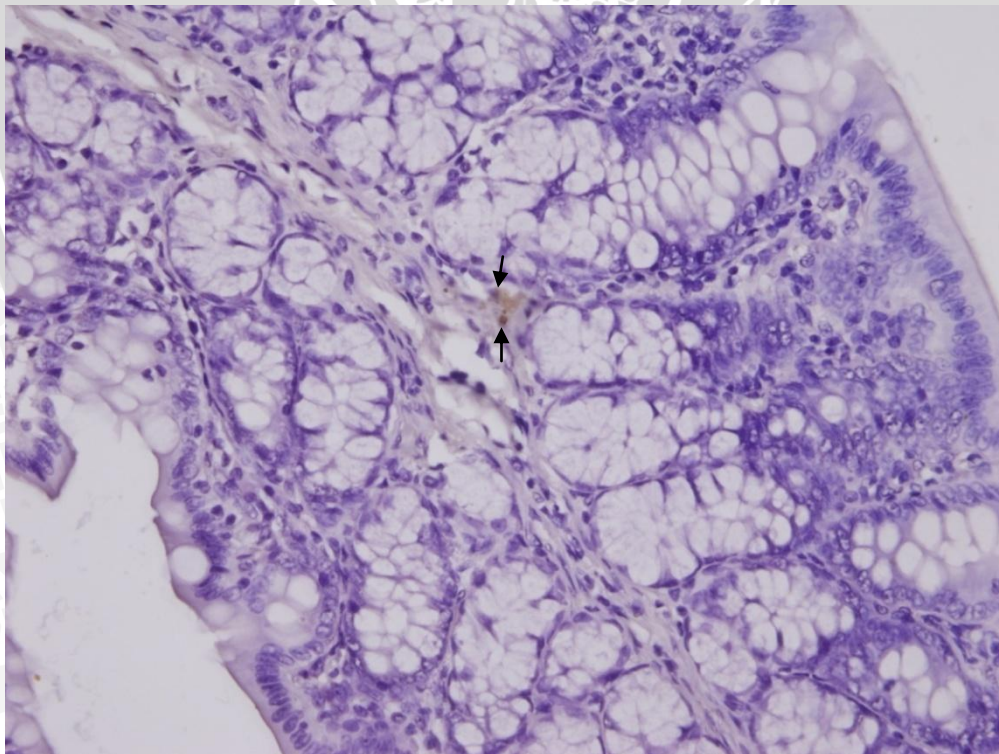
Gambar 5.2 Kontrol Negatif (K-), jaringan kolon tikus Wistar dengan diet normal, sel yang mengekspresikan HSP25 ditunjukkan dengan panah



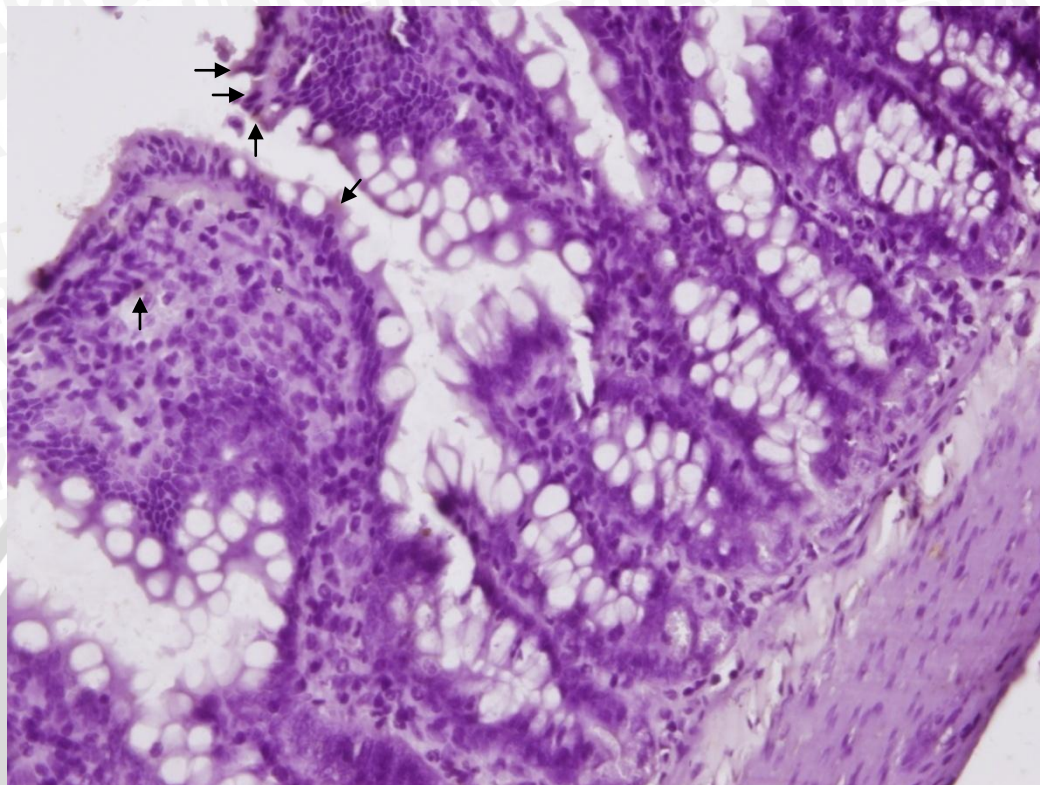
Gambar 5.3 Kontrol Positif (K+), jaringan kolon tikus Wistar yang diberi DMBA selama 45 hari tanpa diberi ekstrak metanol daun kelor, sel yang mengekspresikan HSP25 ditunjukkan dengan panah



Gambar 5.4 Perlakuan 1 (P1), jaringan kolon tikus Wistar yang diberi DMBA selama 45 hari kemudian diberi ekstrak metanol daun kelor dengan dosis 20 mg/kg/hari selama 60 hari, sel yang mengekspresikan HSP25 ditunjukkan dengan panah



Gambar 5.5 Perlakuan 2 (P2), jaringan kolon tikus Wistar yang diberi DMBA selama 45 hari kemudian diberi ekstrak metanol daun kelor dengan dosis 40 mg/kg/hari selama 60 hari, sel yang mengekspresikan HSP25 ditunjukkan dengan panah

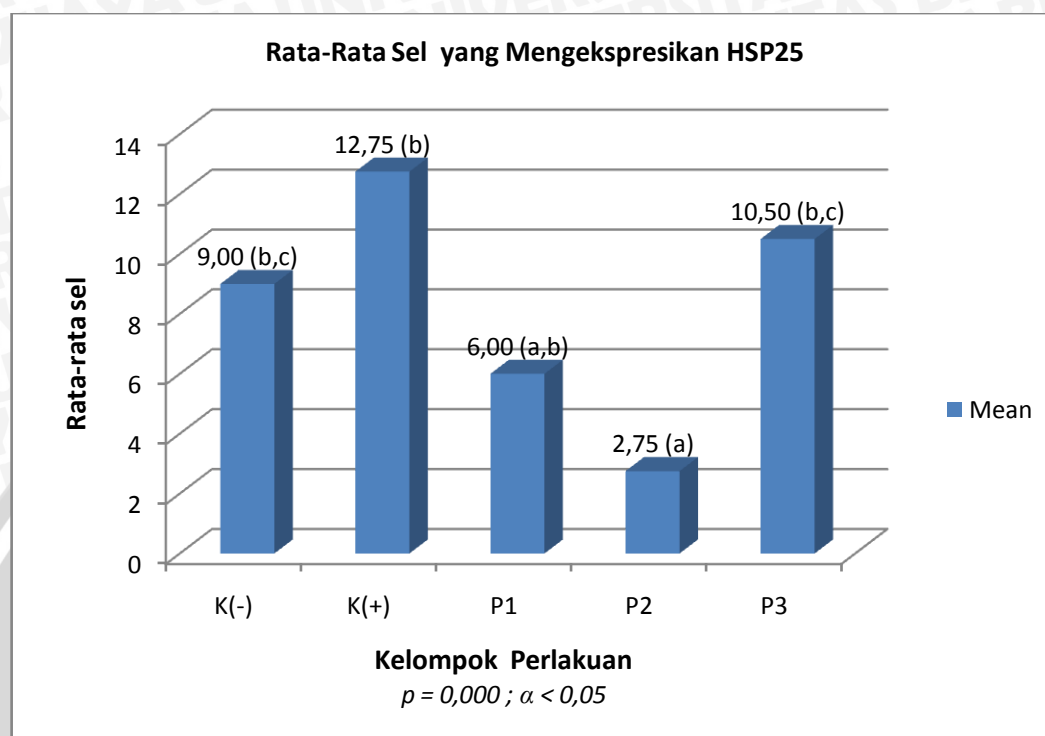


Gambar 5.6 Perlakuan 3 (P3), jaringan kolon tikus Wistar yang diberi DMBA selama 45 hari kemudian diberi ekstrak metanol daun kelor dengan dosis 80 mg/kg/hari selama 60 hari, sel yang mengekspresikan HSP25 ditunjukkan dengan panah

Table 5.1 Rata-Rata Jumlah Sel yang Mengekspresikan HSP25

Kelompok	Mean	Std. Deviation
K(-)	9,00	2,82
K(+)	12,75	1,26
P1	6,00	2,45
P2	2,75	0,96
P3	10,50	3,79

5.2 Analisis Data



Gambar 5.7 Rata-Rata Jumlah Sel Jaringan Kolon yang Mengekspresikan HSP25 Tiap Kelompok Perlakuan.

Data yang telah dikumpulkan dianalisis menggunakan program SPSS 18 untuk Windows dengan uji statistik *One Way ANOVA*. Agar dapat dilakukan pengujian *One Way ANOVA*, kumpulan data tersebut harus bersifat normal dan homogen. Oleh karena itu, data-data tersebut diuji kenormalitasannya dan kehomogenan variannya terlebih dahulu. Dari hasil uji normalitas dengan metode *Kolmogorov-Smirnov* didapatkan $p = 0,824$ ($p > 0,05$) yang dapat diartikan bahwa data penelitian ini terdistribusi normal mengikuti hakikat naturalistik yaitu data tersebar mengikuti pola natural tertentu (Matondang). Pada uji homogenitas varian dengan metode *Levene test* didapatkan $p = 0,198$ ($p > 0,05$) yang berarti bahwa data berasal dari varian yang sama atau homogen. Kemudian dilakukan uji *One Way ANOVA* untuk menguji apakah tiap kelompok perlakuan memiliki

rata-rata yang sama. Dari hasil tes tersebut didapatkan rata-rata jumlah sel yang mengekspresikan HSP25 dari kelima kelompok perlakuan memang berbeda ($p = 0,000$). Dengan demikian terdapat minimal dua kelompok (*subset*) yang berbeda secara signifikan. Rangkuman dari hasil analisis tersebut dapat dilihat pada gambar diatas, sementara selengkapnya terdapat pada Lampiran 1.

Dari gambar 5.7 terlihat bahwa kelompok Kontrol Positif (K(+)) memiliki jumlah rata-rata tertinggi, yaitu 12,75 sel, dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang lain. Perlakuan 3 (P3) menempati posisi kedua terbanyak dengan rata-rata 10,50 sel, kemudian disusul oleh Kontrol Negatif 3 (K(-)) dengan rata-rata 9,00 sel, Perlakuan 1 (P1) dengan 6,00 sel, dan yang memiliki rata-rata terkecil adalah Perlakuan 2 (P2) dengan 2,75 sel saja.

Dari grafik tersebut terlihat pula bahwa ekspresi HSP25 semakin berkurang dengan pemberian ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* tetapi dengan dosis 80 mg/kg/hari, ekspresi HSP25 kembali meningkat dan berada di antara Kontrol Negatif (K(-)) dan Kontrol Positif (K(+)) dan ketiganya berada pada subset yang sama berdasarkan uji *Homogenous Subsets* (Lampiran 1). Pada perbandingan antara K(+) dengan P1 dan P2 terlihat perbedaan yang signifikan. Hal ini tampak pada hasil *Post hoc test (Least Significant Difference)* dengan metode *Tukey HSD* (Lampiran 1) yang menunjukkan bahwa tingkat signifikansi antara K(+) dengan P1 sebesar 0,012 ($< 0,05$) dan antara K(+) dengan P2 sebesar 0,000 ($< 0,05$). Selain dari hasil uji *Post Hoc*, perbedaan yang signifikan antara K(+) dengan P1 dan P2 juga tampak pada hasil *Homogenous subsets* yang tidak mengelompokkan K(+), P1, dan P2 dalam subset yang sama.

Berdasarkan hasil uji statistik tersebut maka dapat dikatakan bahwa pemberian DMBA selama 45 hari diikuti dengan pendiaman tanpa diberi

perlakuan apapun selama 60 hari (K(+)) tidak memberikan hasil yang signifikan secara statistik jika dibandingkan dengan kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan sejak awal (K(-)). Sehingga perlu dilakukan pengukuran HSP25 *post* DMBA untuk memastikan apakah DMBA dapat meningkatkan ekspresi HSP25 secara signifikan.

Namun ekstrak metanol daun kelor terbukti dapat menurunkan ekspresi HSP25 dengan signifikan dimulai dari dosis terkecil (20 mg/kg/hari) hingga dosis 40 mg/kg/hari (P2). Pada dosis 40 mg/kg/hari inilah rata-rata jumlah sel yang mengekspresikan HSP25 tampak sangat kecil (2,75 sel) dan berbeda secara signifikan terhadap K(-). Ekstrak metanol daun kelor pada dosis yang lebih tinggi menyebabkan peningkatan ekspresi HSP25 dan tidak berbeda secara nyata terhadap K(-). Sehingga dosis optimum ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* untuk menurunkan ekspresi HSP25 pada penelitian ini terletak pada P1, yaitu sebesar 20 mg/kg/hari, dimana hasilnya signifikan terhadap kelompok Kontrol Positif (K(+)) dan tidak signifikan terhadap kelompok Kontrol Negatif (K(-)).

BAB VI

PEMBAHASAN

Kanker kolon merupakan salah satu jenis kanker yang mendapat perhatian dunia karena tingkat mortalitas dan insidennya yang semakin meningkat. Kanker ditandai dengan meningkatnya proliferasi sel secara abnormal, menurunnya tingkat diferensiasi sel, serta resisten terhadap mekanisme apoptosis. Apoptosis adalah suatu mekanisme kematian sel terprogram sebagai respon terhadap kerusakan sel atau pertumbuhan sel abnormal yang mengarah pada keganasan (Wong, 2011).

Dalam proses apoptosis dikenal beberapa macam jalur. Dari jalur-jalur tersebut yang mekanismenya telah banyak diketahui adalah jalur intrinsik dan jalur ekstrinsik, sedangkan jalur retikulum endoplasma intrinsik masih belum banyak dimengerti dan sedang diteliti lebih lanjut (Wong, 2011). Ketiga mekanisme tersebut melibatkan peran *caspase* sebagai inisiator dan eksekutor pada proses apoptosis. Jalur ekstrinsik dimulai dari aktivasi reseptor kematian sel pada membran sel, seperti reseptor Fas dan reseptor TNF tipe1, kemudian terjadi *cascade* yang berujung langsung pada aktivasi *caspase* 3 atau dapat pula mengaktifkan jalur intrinsik yang dimulai dari induksi pelepasan sitokrom c dari mitokondria oleh Bax. Kemudian pada jalur intrinsik terbentuklah apoptosom yang terdiri dari sitokrom c, APAF1 (*apoptotic protease activating factor 1*), *procaspase* 9, dan ATP. Apoptosom ini kemudian mengaktifkan *caspase* 3 yang merupakan eksekutor proses apoptosis.

Pada proses apoptosis dikenal beberapa macam protein yang dapat bersifat sebagai proapoptosis dan antiapoptosis. Telah banyak protein yang diketahui dapat meningkatkan tingkat ketahanan sel terhadap proses apoptosis, salah satunya adalah HSP25/27. HSP25/27 menghambat proses apoptosis dengan berikatan pada molekul cascade reseptor Fas, menghambat masuknya Bax ke dalam mitokondria dengan berikatan dengan tBID yang akhirnya menghambat pengeluaran sitokrom c, berikatan dengan sitokrom c yang mencegah terbentuknya apoptosom, dan yang terakhir berikatan dengan caspase 3 sehingga membuatnya menjadi inaktif (Arya *et al*, 2007).

Sebagian besar HSP25/27 dalam sel diregulasi oleh HSF1. Hal ini terbukti pada percobaan yang dilakukan oleh Venkatakrishnan *et al* (2008) yang menyatakan bahwa level HSP27 pada tikus yang telah mengalami *knockout* gen HSF1 lebih rendah daripada tikus yang masih memiliki gen HSF1. Pada kondisi stres atau pada saat banyak protein yang terdenaturasi, HSP90, HSP70, dan HSP40 yang membentuk *multi-chaperon complex* bersama dengan HSF1 terlepas dan merangsang HSF1 monomer tersebut menjadi aktif membentuk trimer di dalam nukleus. Kemudian mengalami hiperfosforilasi dan berikatan dengan HSE pada DNA yang memediasi transkripsi beberapa jenis HSP antara lain HSP90, HSP70, HSP40, dan HSP25/27 (Tomanek, 2002).

Aktifasi HSF1 ini secara kimia dapat dihambat oleh quercetin, genistein dan benziliden laktam sintetik, KNK437 (de Thonel *et al*, 2011). Quercetin diketahui dapat menghambat hiperfosforilasi HSF1, proses pengikatan HSF1 trimer pada HSE, dan menghambat proses transkripsi (Nagai *et al*, 1995). Kaemferol dan miricetin diketahui juga dapat menurunkan ekspresi gen HSP27

(mRNA) secara *in vitro* (Rusak *et al*, 2002), namun pengaruhnya terhadap aktivasi HSF1 masih belum banyak dimengerti.

Daun kelor (*Moringa oleifera*) memiliki peran penting dalam menurunkan level HSP25/27. Hal ini berkaitan dengan kandungan flavonoid dalam ekstrak daun kelor yang cukup besar dengan komponen terbesarnya adalah quercetin, baik dalam bentuk glikosida (232,5 mg/kg) (Miean dan Mohamed, 2000) maupun aglikan (89,8 mg/100g) (Yang *et al*, 2008), serta kaemferol glikosida dan aglikan dalam kadar yang lebih sedikit dari quercetin (Coppin, 2008), dan sedikit isorhamnetin aglikan (Yang *et al*, 2008). Quercetin dan kaemferol selain dapat menurunkan ekspresi HSP25/27, sebagai flavonoid pada umumnya, juga dapat menghambat pembentukan radikal bebas dengan menjadi donor atom hidrogen.

Hasil metabolisme DMBA oleh sitokrom P450 dapat menyebabkan terbentuknya radikal bebas yang salah satunya adalah spesies oksigen reaktif (ROS). Oksidan yang terlalu banyak akan melampaui kapasitas normal sel untuk menetralsirnya sehingga akan memicu stres oksidatif. Kondisi stres oksidatif ini akan menyebabkan kerusakan komponen-komponen sel, antara lain lipid, protein, dan DNA. Selain menyebabkan terbentuknya oksidan, DMBA juga menyumbang kerusakan DNA dengan menyisip pada rantai basa DNA (DNA adduct). Kerusakan DNA akan memicu produksi protein mutan yang mengalami perubahan struktur yang menyebabkannya sulit untuk dilipat (*folding*) yang selanjutnya menyebabkan protein menjadi tidak fungsional atau berubah fungsi dan berpotensi menjadi tumoregenik, produksi protein berlebih (Poirierr. 2004), dan ditambah dengan banyaknya protein yang terdenaturasi akibat ROS, maka hal tersebut akan menginduksi aktivasi HSF1. Oleh karena itu ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) diharapkan dapat menurunkan ekspresi HSP25/27 melalui

kandungan flavonoid sebagai antioksidan dan flavonoid tertentu seperti quercetin sebagai inhibitor aktivasi HSF1.

Flavonoid yang dikenal sebagai antioksidan dilaporkan dapat memiliki efek ganda. Flavonoid dapat berubah menjadi prooksidan tergantung pada struktur dan dosisnya (kamusilmiah.com). Secara *in vitro*, quercetin dengan konsentrasi tinggi ($>40\mu\text{mol/L}$) dilaporkan memiliki efek sitotoksik dengan menginduksi terbentuknya ROS yang menyebabkan stres oksidatif sehingga menurunkan viabilitas sel, sementara pada dosis rendah ($1\text{--}40\mu\text{mol/L}$) quercetin dapat digunakan sebagai pencegahan terhadap keganasan melalui efek antioksidannya (Vargas dan Burg, 2010).

Seperti yang telah dibahas sebelumnya, bahwa aktivasi HSF1 dipengaruhi oleh adanya stres oksidatif dan hiperfosforilasi HSF1 trimer. Fosforilasi HSF1 oleh protein kinase tertentu pada asam amino tertentu akan menyebabkan aktivasi HSF1, sementara fosforilasi pada asam amino yang lain dapat menurunkan aktivasi HSF1. Protein kinase yang mengaktifkan HSF1 antara lain *c-Jun NH(2)-terminal protein kinase* (JNK) (Stephanou dan Latchman, 2010), *polo-like kinase 1* (PLK1), dan *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II* (CaMKII) (Whitesell dan Lindquist, 2009). Sedangkan aktivasi HSF1 dihambat oleh *glycogen synthase kinase 3 beta* (GSK-3 β), *extracellular signal-regulated kinase* (ERK1), dan isoform protein kinase C (PKC) (Whitesell dan Lindquist, 2009).

Quercetin berperan dalam menghambat pertumbuhan kanker dengan menghambat bermacam-macam protein kinase (Boly *et al*, 2011). Namun efek inhibisi tersebut sangat bervariasi tergantung pada konsentrasinya. Menurut Shih *et al* (2004), quercetin konsentrasi $\leq 50\mu\text{mol/L}$ dapat menurunkan tingkat JNK

yang terfosforilasi dan pada konsentrasi yang lebih tinggi yaitu $\geq 100\mu\text{mol/L}$ quercetin menyebabkan peningkatan fosforilasi JNK. Quercetin juga meningkatkan kembali level CaMKII yang terfosforilasi pada dosis 40 mg/kg yang sebelumnya mengalami penurunan hingga dosis 20 mg/kg yang diberikan kepada mencit peroral (Junga *et al*, 2010). Sementara itu, quercetin dilaporkan dapat menurunkan tingkat PLK1 yang terfosforilasi hingga 1,56 kali lebih rendah daripada kelompok kontrol pada konsentrasi tinggi ($100\mu\text{mol/L}$) (Murtaza *et al*, 2006). Penurunan ERK1 secara bertahap juga tampak pada pemberian quercetin dengan konsentrasi yang semakin meningkat (Granado-Serrano *et al*, 2006). Quercetin juga dilaporkan dapat menurunkan PKC sitosol secara bermakna hingga konsentrasi tinggi ($120\mu\text{mol/L}$), namun tidak memberikan pengaruh yang signifikan pada PKC membran (Kang dan Liang, 1997). Akan tetapi, quercetin tidak menyebabkan perubahan yang bermakna hingga konsentrasi $30\mu\text{mol/L}$ terhadap GSK-3 β yang terfosforilasi (Gelebart *et al*, 2008), sedangkan pengaruh quercetin pada konsentrasi yang lebih tinggi belum banyak dieksplorasi.

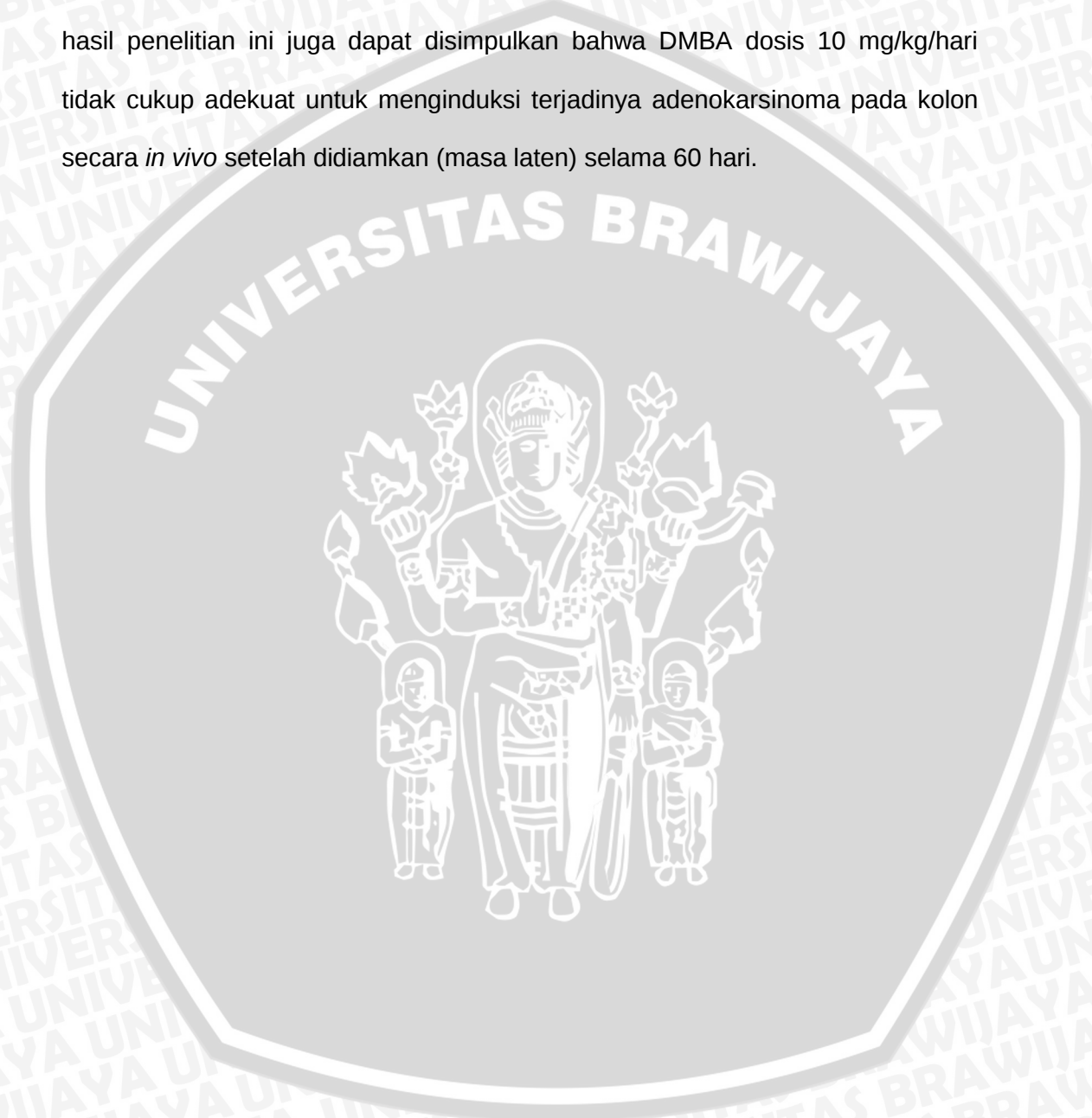
Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa quercetin pada konsentrasi yang relatif tinggi dapat meningkatkan aktifitas protein kinase yang mengaktifasi HSF1 seperti JNK dan CaMKII, kecuali PLK1 yang makin menurun. Namun seberapa besar pengaruh PLK1 terhadap aktifasi HSF1 jika dibandingkan dengan protein kinase yang lainnya masih belum banyak diketahui. Sementara itu, peningkatan konsentrasi quercetin secara bertahap dapat menurunkan aktifitas ERK1 dan *isoform* PKC yang merupakan protein kinase yang menghambat aktifasi HSF1. Oleh karena ekstrak metanol daun kelor mengandung banyak flavonoid yang sebagian besar adalah quercetin, maka dapat dikatakan bahwa penurunan ekspresi HSP25/27 akan mengalami titik

terendah maksimal pada pemberian ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* dosis tertentu dan akan mengalami peningkatan pada dosis yang lebih tinggi. Pada penelitian ini dosis maksimal penurunan HSP25/27 tersebut adalah sebesar 40 mg/kg/hari dan mengalami peningkatan pada dosis 80 mg/kg/hari.

Namun penelitian ini tidak memastikan seberapa besarkah konsentrasi quercetin dalam jaringan kolon tikus. Penelitian ini hanya terbatas pada pengaruh dosis ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* terhadap ekspresi HSP25/27 tanpa mengevaluasi berapa banyak konsentrasi flavonoid total terutama quercetin dan flavonoid lainnya seperti kaemferol dan hasil metabolit dari flavonoid dalam jaringan kolon tikus yang mungkin juga berpengaruh terhadap ekspresi HSP25/27. Sehingga penelitian lebih lanjut untuk memastikan hal tersebut di atas apakah adekuat atau tidak untuk menimbulkan efek seperti pada teori yang telah disebutkan sebelumnya sangat diperlukan.

Seperti yang telah dipaparkan sebelumnya pada Bab V bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok yang diberi DMBA dan yang tidak diberi DMBA dalam jumlah sel yang mengekspresikan HSP25 pada akhir penelitian. Hal ini mungkin dapat disebabkan oleh pendiaman (masa laten) selama 60 hari *post* DMBA yang terlalu lama sehingga jaringan kolon yang sebelumnya mungkin telah mengekspresikan HSP25 dalam jumlah besar, telah mengalami regenerasi sehingga sel-sel tersebut telah tergantikan oleh sel yang lebih sehat karena sel epitel mukosa kolon diketahui memiliki tingkat regenerasi yang cepat (Junqueira, 2007), yaitu sekitar 3 sampai 6 hari (Bowen, 2001). Hal ini juga didukung oleh banyaknya sel yang mengekspresikan HSP25 ditemukan bukan pada sel epitel yang melapisi mukosa kolon, melainkan pada sel yang menyusun lapisan sub mukosa. Oleh karena itu, penghitungan sel yang

mengekspresikan HSP25 *post* DMBA 45 hari sangat diperlukan untuk memastikan apakah DMBA dengan dosis 10 mg/kg/hari dapat meningkatkan ekspresi HSP25 pada sel mukosa kolon dan jaringan kolon pada umumnya. Dari hasil penelitian ini juga dapat disimpulkan bahwa DMBA dosis 10 mg/kg/hari tidak cukup adekuat untuk menginduksi terjadinya adenokarsinoma pada kolon secara *in vivo* setelah didiamkan (masa laten) selama 60 hari.



BAB VII

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini maka dapat disimpulkan bahwa:

- Ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) mampu menurunkan jumlah sel yang mengekspresikan HSP25 pada jaringan kolon tikus Wistar yang diinduksi DMBA.

7.2 Saran

Dari penelitian ini, saran yang dapat diajukan adalah:

- Perlu dilakukan pengukuran HSP25 *post* DMBA 45 hari agar dapat membandingkan perkembangan karsinogenesis kolon dan HSP25/27 pada fase akut.
- Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai berapa banyak konsentrasi quercetin dan flavonoid lainnya dalam jaringan kolon tikus Wistar yang diinduksi DMBA pada pemberian ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dalam beberapa dosis.
- Perlu dilakukan penelitian mengenai hubungan antara jumlah HSF1 yang teraktivasi dengan ekspresi HSP25 pada jaringan kolon tikus Wistar yang diinduksi DMBA.
- Penelitian kuantitatif perlu dilakukan untuk mengukur protein-protein kinase yang berperan dalam mengaktivasi HSF1, yaitu *c-Jun NH(2)-*

terminal protein kinase (JNK), polo-like kinase 1 (PLK1), dan calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII), serta protein-protein kinase yang menghambat aktivasi HSF1, seperti glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3 β), extracellular signal-regulated kinase (ERK1), dan isoform protein kinase C (PKC).

- Penelitian mengenai seberapa kuat hubungan protein-protein kinase tersebut dengan tingkat aktivasi HSF1 dan ekspresi HSP25 dan pada jaringan kolon tikus Wistar yang diberi diet DMBA perlu dilakukan.
- Penelitian serupa dengan menggunakan dosis ekstrak metanol daun kelor yang lebih bervariasi, yaitu dosis dibawah 20 mg/kg/hari dan diatas 80 mg/kg/hari perlu dilakukan.



DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous, Antioksidan dan Peranannya Bagi Kesehatan, (Online). (<http://www.kamusilmiah.com/pangan/antioksidan-dan-peranannya-bagi-kesehatan/>). accessed 20 November 2012).
- Anonymous. Cancer Mortality and Morbidity, (Online), (http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer_text/en/index.html), accessed 08 December 2011).
- Anonymous. Colon and Rectal Cancer: Tumor Biology, (Online). (<http://www.cancerquest.org/colon-rectal-cancer-molecular-biology.html>), accessed 12 February 2013)
- Anonymous. Karyorrhexis, (Online). (<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/karyorrhexis>), accessed 12 February 2013)
- Anonymous, Types of Colorectal Cancer, (Online). (<http://www.cancercenter.com/colorectal-cancer/colorectal-cancer-types.cfm>). accessed 16 February 2013).
- Anonymous. 2000. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), (Online), (<http://www.dhs.wisconsin.gov/eh/chemfs/fs/pah.htm>), accessed 08 December 2011).
- Anonymous, 2009. What is Liver Cancer? What Cause Liver Cancer?, (Online). (<http://www.medicalnewstoday.com/articles/172408.php>), accessed 15 December 2011)
- Anonymous, 2010. Computational Modeling of The Eukaryotic Heat Shock Response, (Online). (http://combio.abo.fi/projects/heat_shock/index.php), accessed 09 December 2001).
- Anonymous, 2010. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Increase Breast Cancer Risk Partly Through p53 Mutation, (Online). (<http://foodforbreastcancer.com/news/polycyclic-aromatic-hydrocarbons-increase-breast-cancer-risk-partly-through-p53-mutations>), accessed 02 January 2012).
- Arya R, Mallik M and Lakhota S.C, 2007. Heat Shock Genes – Integrating Cell Survival and Death. *J. Biosci*, 2007, 32: 595–610.
- Benn SC and Woolf CJ, 2004. Adult Neuron Survival Strategies--slamming on The Brakes. *Nat Rev Neurosci*, 2004, 5 (9): 686-700.
- Boly RR, et al, 2011. Quercetin Inhibits A Large Panel of Kinases Implicated in Cancer Cell Biology. (Abstract). *Int J Oncol* , 2011, 38(3):833-42.

- Bowen, R, 2001. The Gastrointestinal Barrier, (Online). (<http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/stomach/gibARRIER.html>), accessed 9 March 2013)
- Bredesen DE, Mehlen P, and Rabizadeh S, 2004. Apoptosis and Dependence Receptors: A Molecular Basis for Cellular Addiction. *Physiol Rev*, 2004, 84: 411-430
- Brotzman GL and Robertson RG, 2008. Colorectal Cancer, (Online). (<http://www.health.am/cr/colorectal-cancer/>), accessed 27 December 2011).
- Cappel MS, 2005. The Pathophysiology, Clinical Presentation, and Diagnosis of Colon Cancer and Adenomatous Polyps. *Med Clin N Am* 89, 2005: 1-42.
- Cohen GM and Doherty M d'Arcy, 1987. Free Radical Mediated Cell Toxicity by Redox Cycling Chemicals. *Br. J. Cancer*, 1987, 55, Suppl. VIII: 46-52
- Coppin, Julia, 2008. *A Study of The Nutritional and Medicinal Values of Moringa oleifera Leaves from Sub-Saharan Africa: Ghana, Rwanda, Senegal, and Zambia*. The State University of New Jersey, New Jersey.
- Dash, Phil. Apoptosis. Basic Medical Sciences, St. George's, University of London
- de Thonel A, Mezger V, and Garrido C, 2011. Implication of Heat Shock Factors in Tumorigenesis: Therapeutical Potential. *Cancers*, 2011, 3: 1158-1181.
- Dragovich, Tomislav. 2013. Colon Adenocarcinoma, (Online). (<http://emedicine.medscape.com/article/277496-overview#aw2aab6b2b3aa>), accessed 10 February 2013)
- Enders GH, 2011. Colonic Polyps, (Online). (<http://emedicine.medscape.com/article/172674-overview#a0104>), accessed 27 December 2011)
- Fahey, Jed W, 2010. *Moringa oleifera*: A Review of the Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophylactic Properties. Part 1. *Trees for Life Journal*, 2005, 1: 5.
- Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, and Kroemer G, 2006. Heat Shock Proteins 27 and 70 ,Anti-Apoptotic Proteins with Tumorigenic Properties. *Cell Cycle* 5, 2006, 22: 2592-2601.
- Gelebart P et al, 2008. Constitutive Activation of The Wnt Canonical Pathway in Mantle Cell Lymphoma. *Blood* First Edition paper, September 11, 2008.
- Ghavami S et al, 2009. Apoptosis and Cancer: Mutation within Caspase Genes. *J Med Genet*, 2009, 46: 497-510.
- Granado-Serrano , Bele'n A, Marti'n MA, Bravo L, Goya L, and Ramos S, 2008. 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). *The Journal of Nutrition Biochemical, Molecular, and Genetic Mechanisms, J. Nutr*, 2006, 136: 2715–2721.

Hartono, Andry. Terapi Nutrisi dan Herbal Untuk Kanker, (Online). (http://www.bioactiva.co.id/index.php?option=com_latestnews&newsid=56, accessed 20 December 2011)

Hosokawa N et al, 1992. Inhibition of the Activation of Heat Shock Factor in vivo and in vitro by Flavonoids. *Mol. Cell. Bio*, 1992, 12(8):3490.

Indra MR, Hernowati TE, and Satuman, 2011. Pengaruh Ekstrak Daun Kelor (*Moringa Oleifera*) terhadap Efek Karsinogenik Polutan 7,12 Dimethyl Benz(a)anthracene (DMBA) pada Tikus Wistar Melalui Penghambatan Aktivitas Telomerase dan Induksi Apoptosis. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Igawa Y, Keating AF, Rajapaksa KS, Sipes IG, and Hoyer PB, 2009. Evaluation of Ovotoxicity Induced by 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene and Its 3,4-diol Metabolite Utilizing A Rat *in vitro* Ovarian Culture System. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009, 234 (3): 361-369.

Junga WY, Parka SJ, Parka DH, Kima JM, Kima DH, Ryua JH, 2010. Quercetin Impairs Learning and Memory in Normal Mice via Suppression of Hippocampal Phosphorylated cyclic AMP Response Element-Binding Protein Expression. (Abstract). *Toxicology Letters*, 2010, 197 (2): 97–105.

Junqueira, Luiz Carlos, 2007. *Histologi Dasar: Teks dan Atlas*, Edisi Kesepuluh., Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, hal. 307.

Jonathan SG, Olawuyi OJ, Aina DA, Odeniyi SO, Adediji IO, and Ikhedia A, 2012. Comparative Studies on Antifungal, Anti-oxidant and Phytochemical Potential of *Momordica charantia* and *Moringa oleifera*. *New York Science Journal*, 2012, 5 (12).

Kang TB and Liang NC, 1997. Effect of Quercetin on Activities of Protein Kinase C and Tyrosine Protein Kinase from 60 Cells. *Acta Phammmlcgica Sinic*, 1997, 18 (4): 374-376

Kasolo JN, Bimenya GS, Ojok L, Ochieng J and Ogwal-Okeng JW, 2010. Phytochemicals and Uses of *Moringa oleifera* Leaves in Ugandan Rural Communities. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2010, 4 (9):.753-757.

Kim SA, Yoon JH, Lee SH and Ahn SG, 2005. Polo-like Kinase 1 Phosphorylates HSF1 and Mediates Its Nuclear Translocation During Heat Stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280 (13): 12653–12657.

Klemenz R, Andres A, Frohli E, Schafer R, Aoyama A, 1993. Expresion of The Murine Small Heat Shock Protein hsp25 and αβ Crystallin in The Absence of Stress. *The Journal of Cell Biology*, 1993, 120 (3): 639-645.

Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang

Lah, Katarina, 2011. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, (Online). (<http://toxipedia.org/display/toxipedia/Polycyclic+Aromatic+Hydrocarbons>, accessed 18 December 2011).

Lamson DW and Brignall MS, 2000. Antioxidant and Cancer III: Quercetin. *Alternative Medicine Review* 5, 2000.

Li et al, 2002. Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced Oral Carcinogenesis in Hamster by Tea and Curcumin. *Carcinogenesis*, 2002, 23 (8): 1307-1313.

Matondang, Zulkifi. Pengujian Normalitas Data

Merriam-Webster, 2007. Necrosis. (Online). (<http://dictionary.reference.com/browse/necrosis>, accessed 18 Desember 2011).

Miean KH and Mohamed S, 2000. *Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants*. Faculty of Food Science and Biotechnology, University Putra Malaysia, 43400 Serdang Selangor, Malaysia.

Minden A and Karin M, 1997. Regulation and Function of the JNK Subgroup of MAP kinases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1333, 1997: 85-104

Murtaza I et al, 2006. A Preliminary Investigation Demonstrating The Effect of Quercetin on The Expression of Genes Related to Cell-Cycle Arrest, Apoptosis and Xenobiotic Metabolism in Human CO115 Colon-Adenocarcinoma Cells Using DNA Microarray. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2006, 45: 29-36.

Nagai N, Nakai A. and Nagata K, 1995. Quercetin Suppresses Heat Shock Response by Down Regulation of HSF1. (Absract). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995, 208: 1099-1105.

Narayana KR, Reddy MS, Chaluvadi MR and Krishna DR, 2001. Bioflavonoids Classification, Pharmacological, Biochemical Effects and Therapeutic Potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 2001, 33: 2-16.

Németh K et al, 2003. Deglycosylation by Small Intestinal Epithelial Cell Beta-Glucosidases is A Critical Step in The Absorption and Metabolism of Dietary Flavonoid Glycosides in Humans. *Eur J Nutr*, 2003, 42 (1): 29-42.

- Parvathy MVS and Umamaheshwari A, 2007. Cytotoxic Effect of *Moringa oleifera* Leaf Extracts on Human Multiple Myeoma Cell Lines. *Trends in Medical Research*, 2007, 2 (1): 44-50.
- Poirier MC, 2004. Chemical-Induced DNA Damage and Human Cancer Risk. *Nature Reviews* 4, 2004.
- Powers MV, Clarke PA, and Workman P, 2009. Death by Chaperone: HSP90, HSP70 or both?. *Cell Cycle*, 2009, 8 (4): 518-526.
- Rusak G, Gutzeit HO dan Ludwig-Müller J, 2002. Effects of Structurally Related Flavonoids on hsp Gene Expression in Human Promyeloid Leukaemia Cells. *Food Technol. Biotechnol*, 2002, 40 (4): 267–273.
- Schmitt E, Gehrmann M, Brunet M, Multhoff G, and Garrido C, 2007. Intracellular and Extracellular Functions of Heat Shock Proteins: Repercussions in Cancer Therapy. *Journal of Leukocyte Biology*, 2007, 81: 15-27
- Shen HM dan Liu, ZG, 2006. JNK signaling pathway is A key Modulator in Cell Death Mediated by Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Free Radic Biol Med*, 2006, 15; 40(6) :928-939.
- Shih CM, Lin H, Liang YC, Lee WS, Bi WF, Juan SH, 2004. Concentration-dependent Differential Effects of Quercetin on Rat Aortic Smooth Muscle Cells. *European Journal of Pharmacology* 496, 2004: 41-48.
- Stephanou A and Latchman DS, 2011. Transcriptional Modulation of Heat-Shock Protein Gene Expression. *Biochemistry Research International*, 2011.
- Suarsana IN, Priosoeryanto BP, Bintang M, and Wresdiyati T, 2010. Profil Glukosa Darah dan Ultrastruktur Sel Beta Pankreas Tikus yang Diinduksi Senyawa Aloksan. *JITV*, 2010, 15(2): 118-123.
- Tomanek, Lars, 2002. The Heat-Shock Response: Its Variation, Regulation and Ecological Importance in Intertidal Gastropods (genus *Tegula*). *Integ. And Comp. Biol.*, 2002, 42: 797-807.
- Tsai-Turton M, Nakamura BN and Luderer U, 2007. Induction of Apoptosis by 9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthracene in Cultured Preovulatory Rat Follicles Is Preceded by a Rise in Reactive Oxygen Species and Is Prevented by Glutathione. *Biology of Reproduction* 77, 2007: 442-451.
- Vargas AJ and Burd R, 2010. Hormesis and Synergy: Pathways and Mechanisms of Quercetin in Cancer Prevention and Management. *Nutrition Reviews*, 2010, 68 (7): 418-428.
- Venkatakrishnan CD et al, 2008. HSP27 Regulates p53 Transcriptional Activity in Doxorubicin-treated Fibroblasts and Cardiac H9c2 Cells: p21 Upregulation and G2/M Phase Cell Cycle Arrest. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294: 1736-1744.

Whitesell L and Lindquist S, 2009. Inhibiting the Transcription Factor HSF1 as An Anticancer Strategy. *Expert Opin. Ther. Targets*, 2009, 13 (4):469-478.

WHO, 2008. Cancer, (Online). (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>, accessed 15 December 2011).

Wisconsin Department of Health and Family Services, 2000. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*. Information on Toxic Chemicals State of Wisconsin. U.S. Department of Health and Human Services.

Wong RSY, 2011. Apoptosis in Cancer: from Pathogenesis to Treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2011, 30: 87.

Yang RY, Lin S and Kuo G, 2008. Content and Distribution of Flavonoids among 91 Edible Plant Species. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2008, 17 (S1): 275-279.



Lampiran 1: Statistik

❖ Sel yang mengekspresikan HSP25

Sample		Lapang Pandang ke-										Jumlah	Rata-Rata
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
K(-)	1	0	1	0	0	0	0	1	2	3	0	7	9,00
	2	4	2	0	0	0	0	1	0	0	0	7	
	3	4	5	0	0	0	0	0	0	0	0	9	
	4	0	0	2	0	3	3	0	0	0	5	13	
K(+)	1	5	0	2	0	1	0	0	0	6	0	14	12,75
	2	0	1	3	1	3	0	0	0	1	2	11	
	3	3	3	0	1	0	0	0	3	2	1	13	
	4	1	0	3	3	0	0	0	0	4	2	13	
P1	1	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	4	6,00
	2	0	0	0	4	0	0	2	2	0	1	9	
	3	2	2	1	0	1	0	0	1	0	0	7	
	4	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	4	
P2	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	4	2,75
	2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	2	
	3	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	3	
	4	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	3	
P3	1	2	2	0	0	1	0	2	0	1	0	8	10,50
	2	0	0	0	5	3	1	1	0	0	0	10	
	3	0	1	1	0	0	0	4	2	0	0	8	
	4	2	4	2	3	3	0	1	0	1	0	16	

❖ Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test			
			Rata-Rata
N			20
Normal Parameters ^{a,b}	Mean		8.2000
	Std. Deviation		4.21276
Most Extreme Differences	Absolute		.141
	Positive		.141
	Negative		-.123
Kolmogorov-Smirnov Z			.629
Asymp. Sig. (2-tailed)			.824

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

❖ Deskriptif

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kmin	4	9.0000	2.82843	1.41421	4.4993	13.5007	7.00	13.00
kplus	4	12.7500	1.25831	.62915	10.7478	14.7522	11.00	14.00
p1	4	6.0000	2.44949	1.22474	2.1023	9.8977	4.00	9.00
p2	4	2.7500	.95743	.47871	1.2265	4.2735	2.00	4.00
p3	4	10.5000	3.78594	1.89297	4.4757	16.5243	8.00	16.00
Total	20	8.2000	4.21276	.94200	6.2284	10.1716	2.00	16.00

❖ Uji Homogenitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.722	4	15	.198

❖ Uji One-way ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	244.700	4	61.175	9.920	.000
Within Groups	92.500	15	6.167		
Total	337.200	19			

❖ Uji Post Hoc

Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kmin	kplus	-3.75000	1.75594	.256	-9.1722	1.6722
	p1	3.00000	1.75594	.458	-2.4222	8.4222
	p2	6.25000*	1.75594	.020	.8278	11.6722
	p3	-1.50000	1.75594	.909	-6.9222	3.9222
Kplus	kmin	3.75000	1.75594	.256	-1.6722	9.1722
	p1	6.75000*	1.75594	.012	1.3278	12.1722
	p2	10.00000*	1.75594	.000	4.5778	15.4222
	p3	2.25000	1.75594	.706	-3.1722	7.6722

p1	kmin	-3.00000	1.75594	.458	-8.4222	2.4222
	kplus	-6.75000*	1.75594	.012	-12.1722	-1.3278
	p2	3.25000	1.75594	.383	-2.1722	8.6722
	p3	-4.50000	1.75594	.128	-9.9222	.9222
p2	kmin	-6.25000*	1.75594	.020	-11.6722	-.8278
	kplus	-10.00000*	1.75594	.000	-15.4222	-4.5778
	p1	-3.25000	1.75594	.383	-8.6722	2.1722
	p3	-7.75000*	1.75594	.004	-13.1722	-2.3278
p3	kmin	1.50000	1.75594	.909	-3.9222	6.9222
	kplus	-2.25000	1.75594	.706	-7.6722	3.1722
	p1	4.50000	1.75594	.128	-.9222	9.9222
	p2	7.75000*	1.75594	.004	2.3278	13.1722

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

❖ Homogenous Subsets

Tukey HSD^a

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
p2	4	2.7500		
p1	4	6.0000	6.0000	
kmin	4		9.0000	9.0000
p3	4		10.5000	10.5000
kplus	4			12.7500
Sig.		.383	.128	.256

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.