

**PENGARUH EKSTRAK METANOL DAUN *Moringa oleifera* TERHADAP
JUMLAH EPITEL YANG MENGEKSPRESIKAN P53 PADA MUKOSA
KOLON *Rattus novergicus* STRAIN WISTAR JANTAN YANG
DIINDUKSI DMBA (7,12 DIMETHYLBENZ[α]ANTHRACENE)**

TUGAS AKHIR

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



**Oleh :
Fitria Nurindro Rahmahani
NIM. 0910710074**

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

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

Pengaruh Ekstrak Metanol Daun *Moringa oleifera* Terhadap Jumlah Epitel yang Mengekspresikan p53 pada Mukosa Kolon *Rattus novvergicus* Strain Wistar Jantan yang Diinduksi DMBA (7,12 dimethylbenz[*a*]anthracene)

Oleh:

Fitria Nurindro Rahmahani

NIM: 0910710074

Telah diuji pada

Hari : Rabu

Tanggal : 27 Februari 2013

Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I

Dr. rer. nat Tri Yudani MR, M.App.Sc
NIP. 19651105 199303 2 001

Penguji II/Pembimbing I

Penguji III/Pembimbing II

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

Dra. Diana Lyrawati, Apt, MS, Ph.D
NIP. 19681101 199303 2 004

Mengetahui:

Ketua Jurusan Kedokteran

Prof. Dr. dr. Teguh Wahyu Sardiono, DMT&H, MSc, SpParK
NIP: 19520410 198002 1 001

KATA PENGANTAR

Segala puji hanya bagi Allah SWT yang telah meridhai terselesaikannya tugas akhir saya yang berjudul “Pengaruh Ekstrak Metanol Daun *Moringa oleifera* Terhadap Jumlah Epitel yang Mengekspresikan p53 pada Mukosa Kolon *Rattus norvegicus* Strain Wistar Jantan yang Diinduksi DMBA (7,12 dimethylbenz[*a*]anthracene)”.

Ketertarikan dalam pemilihan topik ini didasari pada tingginya angka kejadian kanker yang menjadi penyebab kematian ke 2 di dunia setelah penyakit kardiovaskular. Berbagai penelitian terkait strategi terapi kanker telah dilakukan dan belum menemukan hasil yang memuaskan sementara angka kejadian kanker terus bertambah sehingga dibutuhkan upaya pencegahan terhadap kanker untuk menghindari kecacatan serta kematian pada kasus-kasus baru. Daun kelor (*Moringa oleifera*) merupakan salah satu tanaman yang diharapkan dapat digunakan sebagai obat herbal pada kanker. Pengaruh daun kelor terhadap karsinogenesis diteliti pada jumlah ekspresi p53 pada epitel mukosa kolon tikus strain wistar.

Dengan terselesaikannya penelitian dan penulisan 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 yang dengan sabar membimbing dan mengarahkan saya dari awal penelitian hingga akhir penulisan sehingga saya dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.

3. Dra. Diana Lyrawati, Apt, MS, Ph.D selaku pembimbing kedua yang telah banyak memberikan ide-ide dan arahan dalam membimbing penulisan dan analisis data sehingga saya dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
4. Dr. rer. nat Tri Yudani MR, M.App.Sc sebagai penguji Tugas Akhir.
5. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB.
6. Para analis di Laboratorium Fisiologi, Farmakologi, dan Patologi Anatomi FKUB yang telah membantu saya dalam menyelesaikan penelitian ini.
7. Yang tercinta ayahanda Roediro dan ibunda Lies Indrasasi Awal, serta adikku Cahya Pandya Astami atas segala perhatian dan kasih sayangnya. Juga keluarga besar di Balikpapan, Jawa Timur, Jawa Tengah, dan Jakarta
8. Sahabatku Edah Humaidah, Firdah Zuniar Fadhilah, Mayya Mumtaz Maharani, Meidiana Pertiwi, Azizatu Nazilah, Ifada Zulfatur Rohmah, dan Riza Rahmawati atas segala dukungan dan masukannya.
9. Teman-teman RKIM UB 2012 atas segala pengalaman yang luar biasa.
10. Teman-teman Tim Kelor atas kerjasamanya.
11. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

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

Malang, 22 Februari 2013

Penulis

ABSTRAK

Rahmahani, Fitria N. 2013. **Pengaruh Ekstrak Metanol Daun *Moringa oleifera* Terhadap Jumlah Epitel yang Mengekspresikan p53 pada Mukosa Kolon *Rattus norvegicus* Strain Wistar Jantan yang Diinduksi DMBA (7,12 dimethylbenz[*a*]anthracene)**. Tugas Akhir, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS. (2) Dra. Diana Lyrawati, Apt., MS, Ph.D.

Protein p53 berperan pada jalur respon stress yang mencegah pertumbuhan dan *survival* sel-sel yang memiliki potensi keganasan dan banyak diekspresikan pada sel yang mengalami mutasi dan stress genotoksik. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* terhadap jumlah epitel yang mengekspresikan p53 pada mukosa kolon *Rattus norvegicus* strain wistar jantan yang diinduksi DMBA. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *post test control group design* yang menggunakan 20 ekor tikus wistar jantan yang dibagi secara acak menjadi lima kelompok. Kelompok I diberi diet normal tanpa DMBA dan ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* selama 105 hari. Kelompok II diberi diet normal dan DMBA 10 mg/kgBB/hari per oral selama 45 hari, dilanjutkan dengan diet normal saja selama 60 hari. Kelompok III-V diberi diet normal dan DMBA 10 mg/kgBB/hari per oral selama 45 hari, dilanjutkan dengan diet normal dan ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* dalam berbagai dosis (20, 40, dan 80 mg/kgBB/hari) per oral selama 60 hari. Jumlah epitel yang mengekspresikan p53 pada mukosa kolon tikus dihitung menggunakan metode imunohistokimia. Analisis data menggunakan metode *One Way ANOVA* diikuti dengan uji *Post Hoc Tukey* menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* memberikan pengaruh yang signifikan terhadap jumlah epitel yang mengekspresikan p53 ($p < 0,05$) (dari 12 sel pada kelompok II menjadi 5 sel pada kelompok IV per 60.000 sel). Kesimpulan penelitian ini adalah ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* dapat menurunkan jumlah epitel yang mengekspresikan p53 pada mukosa kolon tikus wistar jantan yang diinduksi DMBA.

Kata kunci : p53, ekstrak metanol daun *Moringa oleifera*, DMBA

ABSTRACT

Rahmahani, Fitria N. 2013. **Effect of Methanolic Extract *Moringa oleifera* Leaves on Number of Epithel which Expressed p53 in Male Wistar Strain *Rattus novergicus* Colon Mucosa Induced by DMBA (7,12 dimethylbenz[*a*]anthracene)**. Final Assignment, Medical Faculty of Brawijaya University. Supervisors : (1) Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS. (2) Dra. Diana Lyrawati, Apt., MS, Ph.D.

p53 protein plays a role in stress response pathway which prevent cell growth and survival and is expressed in genotoxic and mutagenic stressed cells. The present study was conducted to investigate the effect of methanolic extract *Moringa oleifera* leaves on number of epithel which expressed p53 in male wistar strain *Rattus novergicus* colon mucosa induced by DMBA (7,12 dimethylbenz[*a*]anthracene). This study was experimental study using post test control group design. Twenty male wistar rat were randomly divided into five groups. Group I was fed with normal diet without DMBA and methanolic extract *Moringa oleifera* leaves for 105 days. Group II was fed with normal diet and DMBA 10 mg/kgBW/day per oral for 45 days, followed by normal diet for 60 days. Group III-V were fed with normal diet and DMBA 10 mg/kgBW/day per oral for 45 days, followed by normal diet and methanolic extract *Moringa oleifera* leaves in different dosages (20, 40 , dan 80 mg/kgBW/day) per oral for 60 days. The number of epithel which expressed p53 in male wistar strain *Rattus novergicus* colon mucosa was counted using immunohistochemistry method. Data analysis was done by *One Way ANOVA* method followed by *Post Hoc Tukey* test. The result demonstrated the methanolic extract *Moringa oleifera* leaves significantly decreased the number of epithel which expressed p53 in male wistar strain *Rattus novergicus* colon mucosa ($p < 0,05$) (from 12 cells in group II become 5 cells in group IV per 60.000 cells). The conclusion of this study is the methanolic extract *Moringa oleifera* leaves can decrease the number of epithel which expressed p53 in male wistar strain *Rattus novergicus* colon mucosa induced by DMBA (7,12 dimethylbenz[*a*]anthracene).

Keywords : p53, methanolic extract *Moringa oleifera* leaves, DMBA

DAFTAR ISI

Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Kata Pengantar	iii
Abstrak	v
Abstract	vi
Daftar Isi	vii
Daftar Gambar	x
Daftar Tabel	xi
Daftar Lampiran	xii
Daftar Singkatan	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Masalah Penelitian	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1 Manfaat Akademis.....	4
1.4.1 Manfaat Praktis.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Kanker Kolon.....	5
2.1.1 Definisi	5
2.1.2 Etiologi	5
2.1.2.1 7,12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)	6
2.1.3 Patogenesis	7



2.1.4 Gejala dan Manifestasi Klinis Kanker Kolon	8
2.1.5 Pencegahan dan Pengobatan.....	9
2.2 p53.....	10
2.2.1 Hubungan p53, DMBA, dan Kanker Kolon	12
2.3 <i>Moringa oleifera</i>	14
2.3.1 Taksonomi	14
2.3.2 Distribusi	15
2.3.3 Morfologi dan Karakteristik.....	15
2.3.4 Kegunaan Daun <i>Moringa oleifera</i>	16
2.3.5 Kandungan Gizi Daun <i>Moringa oleifera</i>	16
2.3.6 Senyawa Kimia dan Antioksidan.....	17
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	19
3.1 Kerangka Konsep.....	19
3.2 Penjelasan Kerangka Konsep.....	20
3.3 Hipotesis Penelitian.....	21
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	22
4.1 Rancangan Penelitian.....	22
4.2 Populasi dan Sampel	22
4.2.1 Hewan Coba, Objek, dan Teknik Randomisasi	22
4.2.2 Estimasi Jumlah Pengulangan.....	23
4.2.3 Kriteria Inklusi	24
4.2.4 Kriteria Eksklusi	24
4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	24
4.4 Variabel Penelitian	24
4.5 Definisi Operasional	25

4.6 Alat dan Bahan Penelitian.....	25
4.6.1 Alat.....	25
4.6.2 Bahan Penelitian	26
4.7 Prosedur Penelitian.....	27
4.7.1 Adaptasi.....	28
4.7.2 Tikus yang Diinduksi DMBA.....	28
4.7.3 Perlakuan.....	28
4.7.3.1 Pemeliharaan	28
4.7.3.2 Pembedahan.....	29
4.7.3.3 Pemeriksaan Imunohistokimia p53.....	29
4.8 Pengolahan dan Analisis Data.....	31
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	32
5.1 Hasil Penelitian.....	32
5.2 Analisis Data	37
BAB 6 PEMBAHASAN.....	41
BAB 7 PENUTUP.....	48
7.1 Kesimpulan.....	48
7.2 Saran	48
DAFTAR PUSTAKA.....	49
LAMPIRAN.....	54

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Jalur Sinyal p53..... 12

Gambar 2.2 Patogenesis Kanker Kolon 12

Gambar 2.3 Daun *Moringa oleifera*..... 16

Gambar 4.1 Alur penelitian 27

Gambar 5.1 Gambaran Histologis Jaringan Kolon Kelompok 2 hari ke-45 33

Gambar 5.2 Irisan Jaringan Kolon Kelompok 1 34

Gambar 5.3 Irisan Jaringan Kolon Kelompok 2..... 35

Gambar 5.4 Irisan Jaringan Kolon Kelompok 3..... 35

Gambar 5.5 Irisan Jaringan Kolon Kelompok 4..... 36

Gambar 5.6 Irisan Jaringan Kolon Kelompok 5..... 36

Gambar 5.7 Grafik Rata-rata Jumlah Epitel yang Mengekspresikan p53..... 37

Gambar 6.1 Gambaran Makroskopis Kolon Mencit 42

Gambar 6.2 Displasia pada Permukaan Mukosa Kolon Tikus..... 42

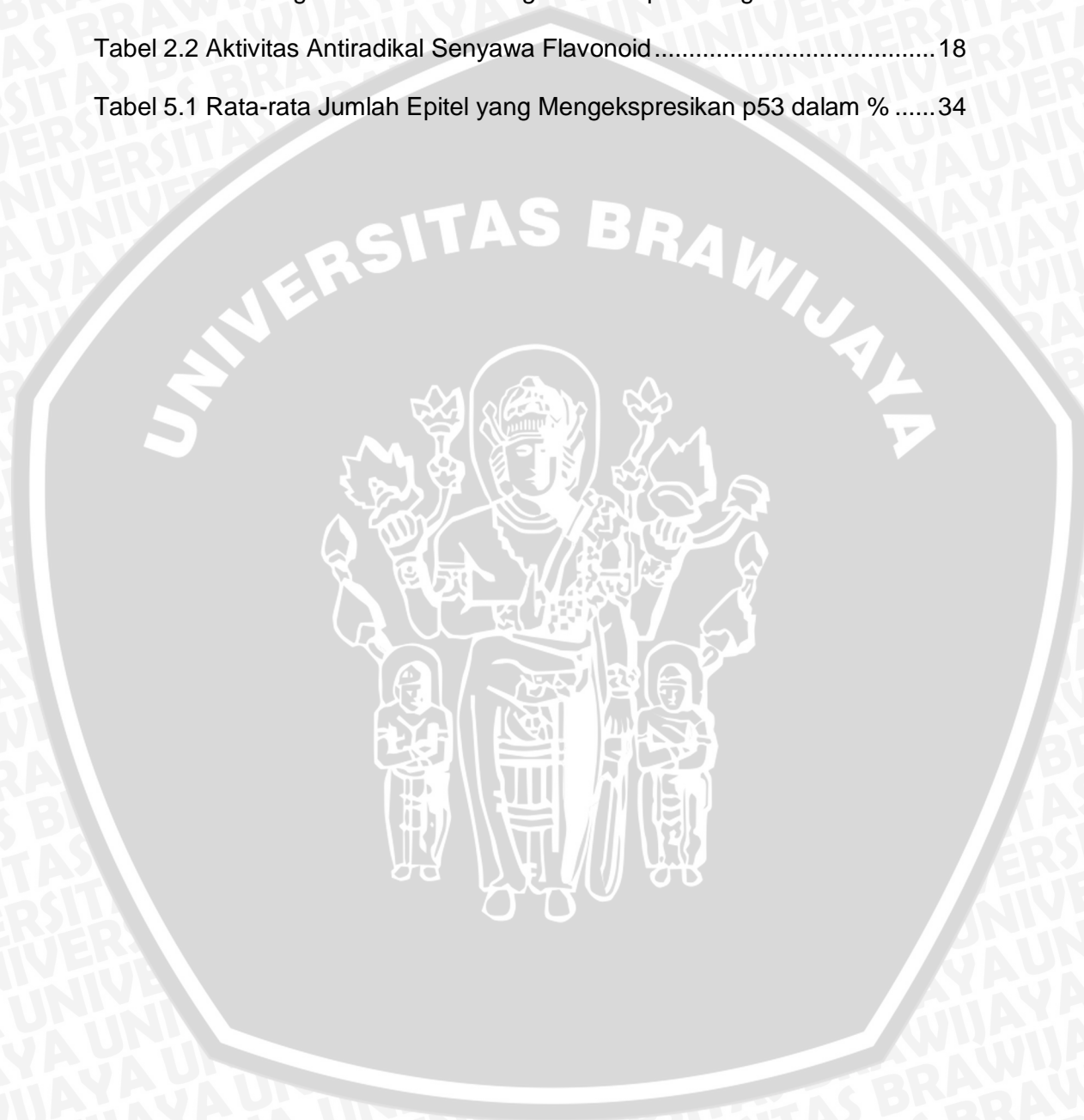
Gambar 6.3 Kontrol Positif Hari ke-45 dan ke-105..... 42

Gambar 6.4 Tahapan Karsinogenesis pada Jaringan Kolon 43



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan Gizi Daun <i>Moringa oleifera</i> per 100 gram.....	16
Tabel 2.2 Aktivitas Antiradikal Senyawa Flavonoid.....	18
Tabel 5.1 Rata-rata Jumlah Epitel yang Mengekspresikan p53 dalam %	34



DAFTAR LAMPIRAN

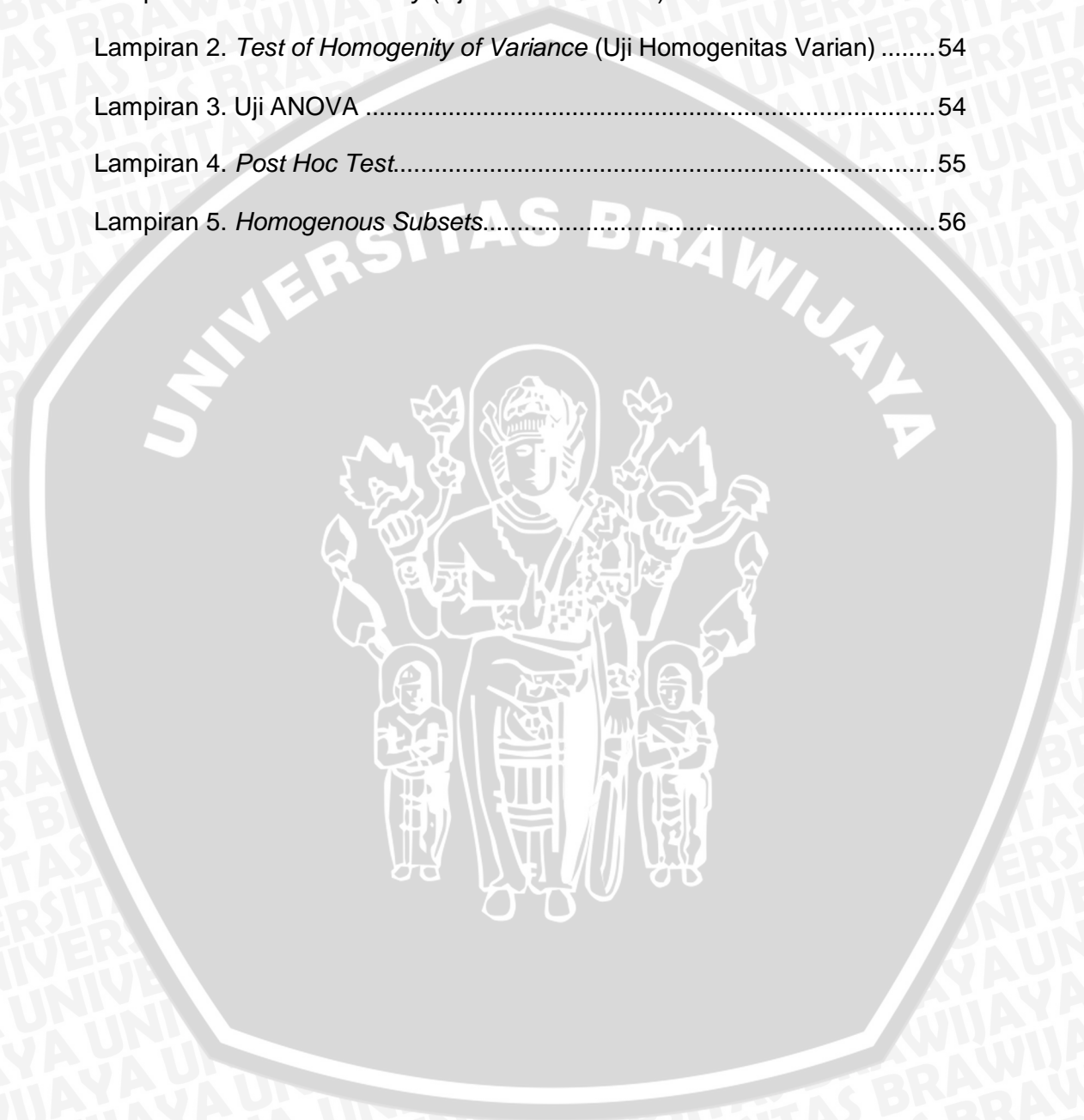
Lampiran 1. *Test of Normality* (Uji Normalitas Data) 54

Lampiran 2. *Test of Homogeneity of Variance* (Uji Homogenitas Varian) 54

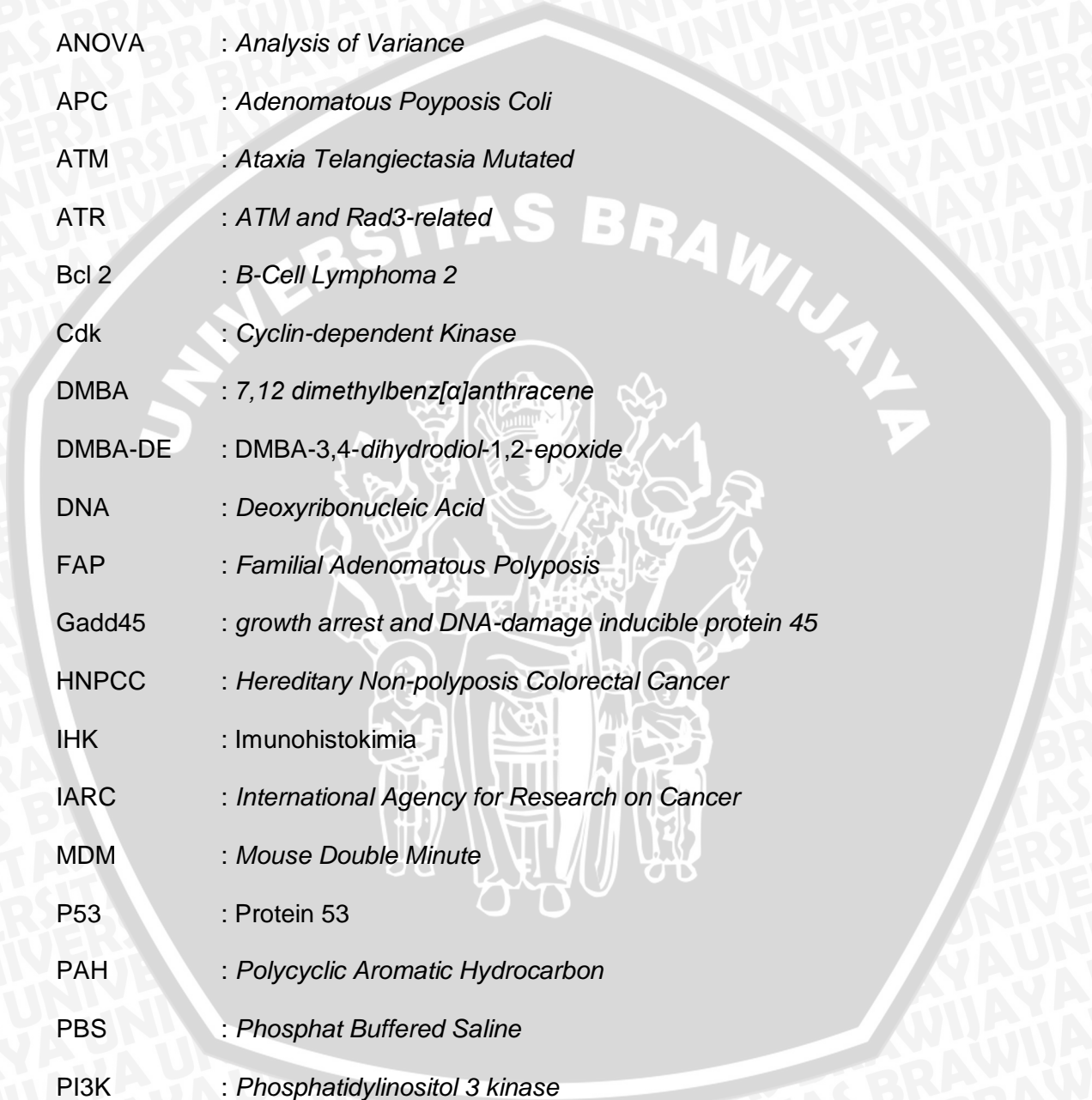
Lampiran 3. Uji ANOVA 54

Lampiran 4. *Post Hoc Test*..... 55

Lampiran 5. *Homogenous Subsets*..... 56



DAFTAR SINGKATAN



AIDS	: <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
APC	: <i>Adenomatous Poyposis Coli</i>
ATM	: <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATR	: <i>ATM and Rad3-related</i>
Bcl 2	: <i>B-Cell Lymphoma 2</i>
Cdk	: <i>Cyclin-dependent Kinase</i>
DMBA	: <i>7,12 dimethylbenz[α]anthracene</i>
DMBA-DE	: <i>DMBA-3,4-dihydrodiol-1,2-epoxide</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
FAP	: <i>Familial Adenomatous Polyposis</i>
Gadd45	: <i>growth arrest and DNA-damage inducible protein 45</i>
HNPCC	: <i>Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer</i>
IHK	: <i>Imunohistokimia</i>
IARC	: <i>International Agency for Research on Cancer</i>
MDM	: <i>Mouse Double Minute</i>
P53	: <i>Protein 53</i>
PAH	: <i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbon</i>
PBS	: <i>Phospat Buffered Saline</i>
PI3K	: <i>Phosphatidylinositol 3 kinase</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
WGO	: <i>World Gastroenterology Organization</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Satu dari delapan kematian di dunia disebabkan oleh kanker. Kanker menyebabkan kematian lebih banyak daripada gabungan kematian karena AIDS, tuberkulosis, dan malaria. Pada negara maju, kanker merupakan penyebab kematian terbanyak pertama. Sedangkan pada negara berkembang, kanker merupakan penyebab kematian kedua terbanyak setelah penyakit kardiovaskular. Berdasarkan proyeksi WHO, kanker akan menggantikan penyakit jantung iskemik sebagai penyebab kematian terbanyak di dunia pada tahun 2010 (WHO, 2007)

Kanker kolorektal merupakan kanker ke-3 terbanyak pada laki-laki (663 000 kasus, 10.0% dari total kasus kanker) dan ke-2 terbanyak pada perempuan (571 000 kasus, 9.4% dari total kasus kanker) di dunia dan merupakan penyebab kematian karena kanker terbanyak ke-4. Hampir 60% kasus terjadi di negara berkembang (GLOBOCAN, 2008). Pada kebanyakan kasus kanker kolorektal, mutasi DNA yang menginisiasi kanker didapatkan selama kehidupan seseorang, bukan diwariskan (*American Cancer Society*, 2011). Salah satu faktor lingkungan yang telah diketahui memiliki peran dalam terjadinya kanker adalah *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons* (PAH). (Al-Attar, 2004).

Berdasarkan estimasi *International Agency for Research on Cancer* (IARC), pada tahun 2030 akan terjadi peningkatan global kasus kanker baru sebanyak 21,4 juta dan peningkatan angka kematian karena kanker sebanyak 13,2 juta jiwa disebabkan oleh pertumbuhan dan penuaan populasi sementara kematian anak dan kematian karena infeksi di negara berkembang berkurang (*American Cancer Society*, 2011). Oleh karena itu, dibutuhkan upaya pencegahan terhadap kanker untuk menghindari kecacatan serta kematian pada kasus-kasus baru.

Pengobatan kanker sampai saat ini telah dilakukan dengan berbagai cara dengan target terapi yang berbeda – beda, salah satunya dengan cara memacu apoptosis dan mengurangi tingkat *cell survival* untuk mengontrol jumlah dan proliferasi sel yang melibatkan protein p53 (Kaufmann dan Hengartner, 2003). Protein p53 berperan pada jalur respon stress yang mencegah pertumbuhan dan *survival* dari sel-sel yang memiliki potensi keganasan. Banyak tipe stress mengaktifasi p53, termasuk kerusakan DNA, erosi telomer, aktivasi onkogen, hipoksia, stress metabolik, dan berkurangnya sinyal pertumbuhan normal dan *survival*. Sehingga dapat dikatakan p53 berperan dalam mencegah pertumbuhan sel tumor pada beberapa tahapan proses keganasan (Bai dan Zhu, 2006).

Indonesia sebagai negara tropis mempunyai keragaman flora yang berpotensi besar untuk dikembangkan dalam dunia pengobatan. Kemajuan dalam bidang ilmu pengetahuan menunjukkan bahwa daun kelor (*Moringa oleifera*) memiliki banyak manfaat bagi kesehatan. Tanaman ini tersebar di daerah tropis, termasuk Indonesia. *Moringa oleifera* telah digunakan sebagai obat tradisional untuk penyakit inflamasi, infeksi, kardiovaskular,

gastrointestinal, hematologi, dan hepatorenal (Morimitsu *et.al.*, 2000) *Moringa oleifera* juga telah diketahui memiliki efek supresi tumor karena kandungan antioksidannya yang tinggi (Murakami *et.al.*, 1998)

Efek antioksidan dalam *Moringa oleifera* salah satunya diperankan oleh flavonoid yang terkandung di dalamnya. Beberapa flavonoid yang telah diketahui terkandung dalam *Moringa oleifera* adalah *kaempferol*, *quercetin*, *rhamnetin*, *quercetagenin*, *gossypetin*, dan *proanthocyanidin* (Rubeena, 1995) Quercetin telah dipasarkan oleh Calbiochem sebagai obat kanker. Kaempferol juga telah diketahui dapat mengurangi kandungan karsinogen DMBA dengan menstimulasi pengeluaran DMBA dimediasi oleh *P-glycoprotein* (Phang, J.M., *et.al.*, 1993). Dengan demikian, daun *Moringa oleifera* diharapkan dapat menjadi obat herbal untuk pencegahan dan pengobatan kanker.

1.2 Masalah Penelitian

Apakah ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* mempengaruhi jumlah epitel yang mengekspresikan p53 pada mukosa kolon *Rattus novergicus* strain wistar jantan yang diinduksi DMBA ?

1.3 Tujuan Penelitian

Mengetahui pengaruh ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* terhadap jumlah epitel yang mengekspresikan p53 pada mukosa kolon *Rattus novergicus* strain wistar jantan yang diinduksi DMBA

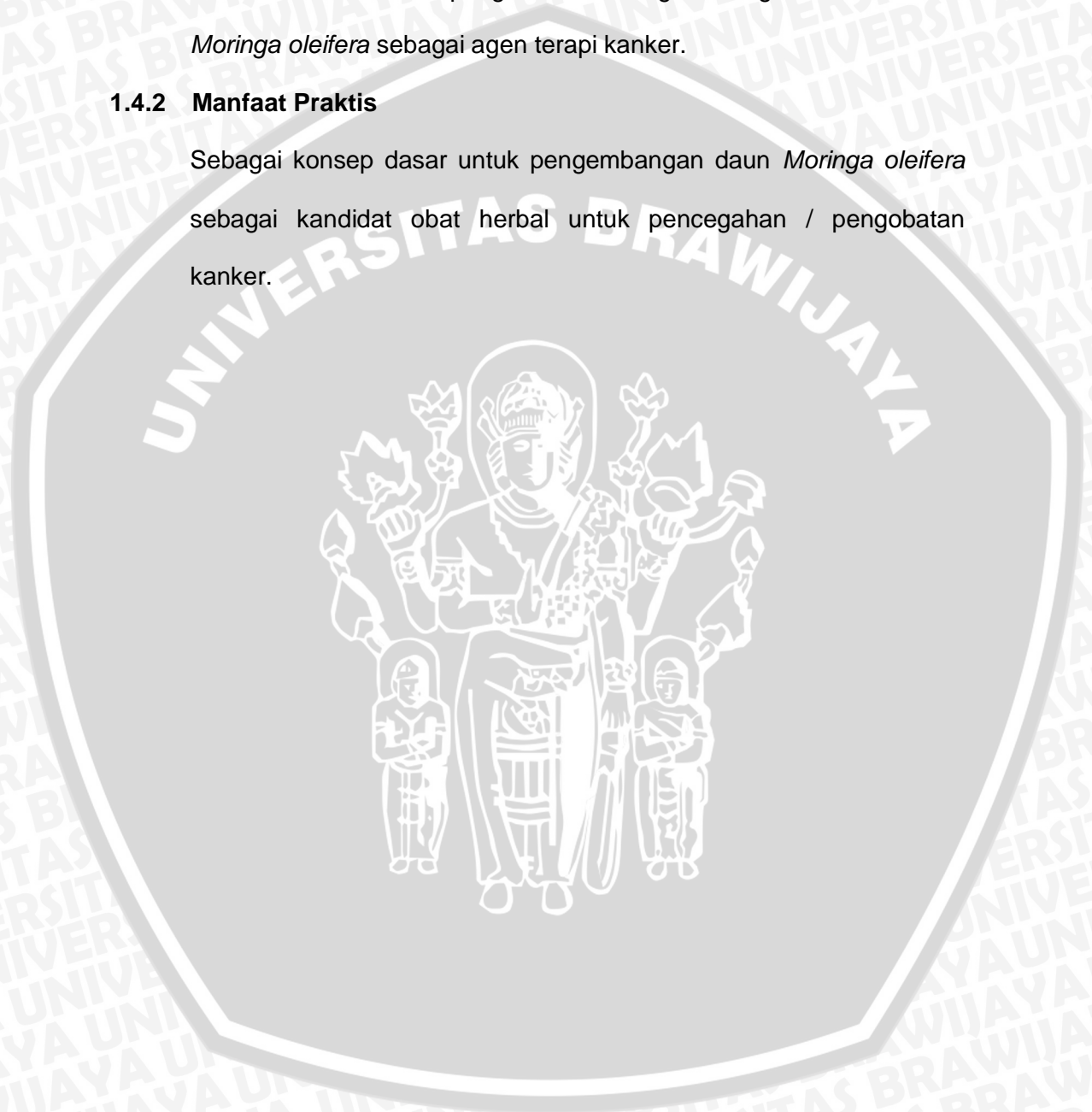
1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

Menambah khasanah pengetahuan mengenai kegunaan dari daun *Moringa oleifera* sebagai agen terapi kanker.

1.4.2 Manfaat Praktis

Sebagai konsep dasar untuk pengembangan daun *Moringa oleifera* sebagai kandidat obat herbal untuk pencegahan / pengobatan kanker.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker Kolon

2.1.1 Definisi

Kanker usus besar (kolon) dan daerah antara usus besar dan anus (disebut rektum) memiliki banyak persamaan, dan oleh sebab itu seringkali secara bersama-sama disebut dengan kanker kolorektal. Kanker kolorektal adalah kanker yang tumbuh pada usus besar (kolon) atau rektum. Kebanyakan kanker usus besar berawal dari pertumbuhan sel yang tidak ganas atau disebut adenoma, yang pada awalnya membentuk polip. Polip pada kondisi tertentu berpotensi menjadi kanker yang dapat terjadi pada semua bagian dari usus besar. Kanker kolorektal ini dapat menyebar keluar jaringan usus besar dan bermetastasis ke bagian tubuh lainnya (Cole *et.al.*, 2002).

2.1.2 Etiologi

Banyak hal dapat berperan sebagai agen pemicu kanker. Faktor risiko dapat diperoleh dari dalam tubuh *host* maupun lingkungan. Berdasarkan *World Gastroenterology Organization (WGO)* tahun 2007, faktor risiko dari *host* antara lain : usia > 50 tahun, penyakit genetik (*Familial adenomatous polyposis (FAP)*, *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)* atau disebut juga *Lynch syndrome*), ras Afrika-Amerika, obesitas, dan kurang aktivitas fisik. Sedangkan faktor

risiko dari lingkungan antara lain : asap rokok, diet rendah serat dan tinggi daging merah, konsumsi alkohol, dan diabetes mellitus tipe 2.

Telah diketahui pula bahwa *7,12-Dimethylbenz[α]anthracene* (DMBA), salah satu bentuk kelompok *Polycyclic aromatic hydrocarbons* (PAH) memiliki sifat sitotoksik, karsinogenik, mutagenik, dan immunosupresif (Al-Attar, 2004). Penelitian menunjukkan bahwa DMBA dapat menginduksi terjadinya kanker sel hepar, kulit, mammae, dan kolon (*European Commission Health and Consumer Protection Directorate-General*, 2002).

2.1.2.1 7,12-dimethylbenz[α]anthracene (DMBA)

Secara alami DMBA dapat ditemukan di alam sebagai hasil dari proses pembakaran yang tidak sempurna, seperti dalam asap tembakau, asap pembakaran kayu, asap pembakaran gas, bensin, minyak, batubara, atau daging. Senyawa DMBA dapat ditemukan di dalam air, tanah, maupun udara (Budi dan Widayari, 2010).

7,12-dimethylbenz[α]anthracene (DMBA) adalah sebuah polisiklik aromatik dengan rumus kimia $C_{20}H_{16}$ yang merupakan *immunosupressor* sekaligus karsinogen yang poten (Miyata *et.al.*, 2001). Menurut *Division of Occupational Health and Safety National Institutes of Health*, DMBA mempunyai 4 cincin *benzene* termasuk dalam tujuh *polycyclic aromatic hydrocarbon* (PAH) yang dapat menyebabkan kanker pada mamalia (Budi dan Sitarina, 2010).

7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA), pada aktivasi metabolitnya memproduksi karsinogen pokok, yaitu *dihydrodiol epoxide*, yang dapat memediasi transformasi neoplastik dengan menginduksi kerusakan DNA, dan membentuk *Reactive Oxygen Species* (ROS) berlebihan, serta memediasi proses inflamasi kronis. Sejumlah besar dari karsinogen kimia, termasuk DMBA, menimbulkan karsinogenesis melalui kerusakan oksidatif jaringan dan sel yang dimediasi radikal bebas. Produksi besar-besaran ROS karena stress oksidatif pada sistem dapat menginduksi kerusakan rantai dan dapat memodifikasi basa DNA sehingga terjadi mutagenesis dan karsinogenesis. Oksidasi 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA) oleh enzim P450 memproduksi metabolit yang membentuk adduksi kovalen dengan DNA di dalam tempat depurinasi dasar DNA (Manoharan *et.al.*, 2009).

2.1.3 Patogenesis

Kanker kolon diawali oleh terbentuknya polip pada mukosa kolon. Polip yang memiliki potensi menjadi keganasan dapat dilihat dari tampilan histopatologinya. Dua tampilan yang paling sering dijumpai adalah tipe hiperplastik dan adenomatous. Polip hiperplastik memiliki jumlah sel – sel glandula yang meningkat dengan penurunan mukus sitoplasma, namun sedikit hiperkromatin nucleus, stratifikasi, ataupun atipia. Nukleus adenomatous biasanya hiperkromatin, membesar, berbentuk seperti rokok, dan berkumpul membentuk pola palisade (Rubin *et.al.*, 2003)

Hampir semua kanker kolon (95%) berawal dari adenoma. Adenoma ditemukan pada sekitar sepertiga spesimen tindakan operatif kanker kolon. Pasien dengan *Familial Adenomatous Polyposis* (FAP) akan mengalami kanker kolon jika tidak menjalani kolektomi. FAP merupakan sindrom yang diwariskan sebagai gen autosom dominan. FAP menyebabkan mutasi pada gen *Adenomatous Polyposis Coli* (APC) yang berada pada kromosom 5q. Mutasi APC ini memicu munculnya ratusan polip adenoma di sepanjang kolon dan bertanggung jawab terhadap 80% dari total kejadian kanker kolon. Pada pasien dengan *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer* (HNPCC), kanker kolon muncul dalam keluarga tanpa didahului poliposis gastrointestinal. Kanker kolon muncul pada awalnya sebagai polip di usia pertengahan. HNPCC disebabkan oleh adanya mutasi pada gen *repair*, seperti hMSH2, hMSH6, hMLH1, hMLH3, hPMS1, hPMS2. Mutasi pada gen *repair* tersebut menyebabkan kesalahan dalam mengkode enzim *repair* yang berujung pada kesalahan replikasi DNA yang terakumulasi pada onkogen dan *tumor suppressor gene* sehingga terbentuk kanker kolon.

2.1.4 Gejala dan Manifestasi Klinis Kanker Kolon

Berdasarkan *American Society of Clinical Oncology*, gejala dan manifestasi kanker kolon adalah sebagai berikut :

- Diare, konstipasi, atau perasaan usus tidak kosong sepenuhnya
- Adanya darah berwarna merah segar atau kehitaman bersama faeces

- Faeces lebih pendek dan kecil dari biasanya
- Rasa tidak nyaman pada abdomen, meliputi nyeri karena gas, rasa usus teraduk – aduk, rasa penuh, dan kram
- Penurunan berat badan karena sebab yang tidak jelas
- Kelelahan berkepanjangan
- Anemia defisiensi zat besi (jumlah sel darah merah rendah)

2.1.5 Pencegahan dan Pengobatan

Skruining rutin seringkali dapat membantu deteksi dini kanker kolon, saat kanker masih dapat disembuhkan dengan baik. Pada kebanyakan kasus, skruining juga dapat mencegah kanker kolorektal karena polip dan bentuk pertumbuhan sel lainnya dapat ditemukan dan dibersihkan sebelum berpotensi menjadi kanker. Tes – tes skruining yang dapat dilakukan antara lain :

- Riwayat Keluarga
- *Flexible sigmoidoscopy*
- Kolonoskopi
- *Double – contrast barium enema (air – contrast barium enema)*
- *CT colonography*
- *Fecal occult blood test*
- *Fecal immunochemical test*
- *Stool DNA test*

Pengobatan kanker kolon pada intinya terbagi menjadi empat tipe :

- Pembedahan
- Radiasi
- Kemoterapi

- Terapi tertarget

Dua atau lebih tipe pengobatan tersebut dapat dikombinasi pada saat yang bersamaan atau digunakan secara berurutan berdasarkan hasil diagnosis dan staging. Pembedahan merupakan cara pengobatan utama pada kanker kolon stadium awal. Radiasi sebelum maupun setelah pembedahan mampu mengurangi tumor dalam batas lokal. Pasien dengan kanker kolorektal tahap II dan III memiliki risiko tinggi penyebaran tumor lebih lanjut, lokal maupun sistemik sehingga terapi tambahan seperti radioterapi dan kemoterapi diperlukan. Pasien dengan kanker kolon tahap III tanpa kontraindikasi dianjurkan untuk melakukan kemoterapi setelah pembedahan untuk mencegah penyebaran kanker. Kemoterapi juga bermanfaat pada pasien dengan kanker kolorektal pada tahap II dan III. Selain itu, kemoterapi juga dapat menjadi terapi paliatif pada kanker kolorektal tahap IV (Patwardhan *et.al.*, 2006).

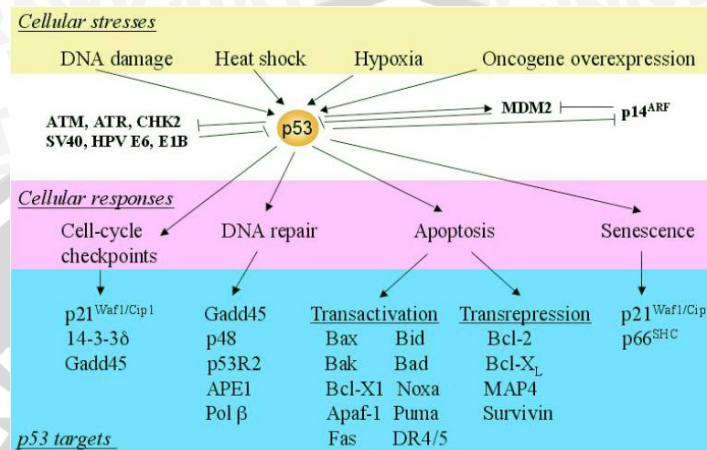
2.2 p53

Protein p53 pada mamalia berperan pada jalur respon stress yang mencegah pertumbuhan dan *survival* dari sel-sel yang memiliki potensi keganasan. Banyak tipe stress mengaktivasi p53, termasuk kerusakan DNA, erosi telomer, aktivasi onkogen, hipoksia, dan berkurangnya sinyal pertumbuhan normal dan *survival*. Sehingga dapat dikatakan p53 berperan dalam mencegah pertumbuhan sel tumor pada beberapa tahapan proses keganasan. Peran p53 sebagai *tumor suppressor* sangat esensial dalam mencegah proliferasi sel yang tidak tepat dan mempertahankan integritas genom selama stress genotoksik. Melalui beberapa stimulus intraseluler dan

ekstraseluler seperti kerusakan DNA (radiasi ion, radiasi UV, penggunaan obat-obat sitotoksik dan virus), *heat shock*, hipoksia, dan overekspresi onkogen, p53 teraktivasi dan muncul sebagai protein regulator utama pemicu beragam respon biologis di tingkat sel maupun organisme. Aktivasi p53 dapat memicu beberapa respon seluler meliputi diferensiasi, *senescence*, DNA repair, dan inhibisi angiogenesis, namun kemampuan p53 yang tampak jelas adalah menginduksi *cell cycle arrest* dan apoptosis. Dua respon ini memungkinkan p53 menghambat pertumbuhan sel yang mengalami stress dengan cara *cycle arrest* yang *irreversible* maupun *transient* pada fase G₁, G₂, maupun fase S untuk memungkinkan terjadinya perbaikan dan pemulihan sebelum memasuki tahap replikasi atau dengan cara pemusnahan sel dengan apoptosis (Ling dan Zhu, 2006).

Aktivasi p53 meliputi peningkatan level protein p53 dan juga perubahan kualitatif protein melalui modifikasi post-translasi yang memicu aktivasi gen-gen yang menjadi target p53. Contohnya pada respon kerusakan DNA, protein kinase ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) teraktivasi yang mengakibatkan aktivasi Chk2 kinase. ATM dan Chk2 lalu memfosforilasi p53 yang membuat sel masuk pada tahap *cell cycle arrest* atau apoptosis. Kerusakan DNA juga dapat menyebabkan blokade replikasi yang mengaktivasi ATR (*ATM and Rad3-related*) kinase. Setelah itu, ATR dan Chk1 yang telah teraktivasi memfosforilasi dan mengaktivasi p53. Fungsi p53 sangat beragam di antaranya fungsi supresi tumor dari kemampuannya sebagai faktor transkripsi spesifik rantai yang meregulasi ekspresi gen-gen untuk memodulasi beberapa proses seluler. Gen-gen tersebut meliputi gen yang terlibat dalam *cell cycle arrest* dan *DNA repair*, juga apoptosis dan

senescence-related genes seperti gen-gen untuk p21^{Waf1/Cip1}, Gadd45 (*growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45*) dan gen-gen keluarga Bcl-2 (Vousden dan Lu, 2002).

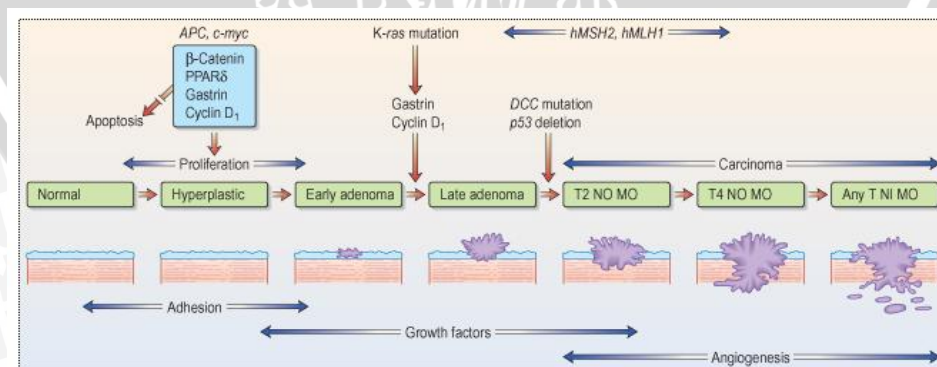


Gambar 2.1 Jalur sinyal p53 (Ling dan Zhu, 2006)

2.2.1 Hubungan p53, DMBA, dan Kanker Kolon

Dalam patogenesis kanker kolon, pada awalnya terjadi proliferasi epitel lokal kolon diikuti dengan pembentukan adenoma kecil yang secara progresif membesar, menjadi lebih displastik, dan akhirnya berkembang menjadi kanker invasif.

Berikut adalah bagan patogenesis kanker kolon pada manusia (Kumar dan Clark, 2005) :



Gambar 2.2 Patogenesis Kanker Kolon

Fungsi p53 dalam mencegah proses keganasan dapat menghilang dengan beberapa mekanisme meliputi lesi yang menghambat aktivasi p53, mutasi pada gen p53 yang mengkode protein p53, atau mutasi pada mediator-mediator *downstream* dari fungsi protein p53. Analisis terhadap banyak kasus tumor menunjukkan bahwa p53 termutasi pada sekitar separuh dari proses kanker yang mengakibatkan menurunnya fungsi apoptosis. Terdapat 3 pola mutasi yang telah ditemukan pada gen p53 dalam sel leukemia tikus yang diinduksi DMBA, yaitu substitusi basa tunggal pada kodon 177, kodon 211, dan kodon 242 (Wei *et.al.*, 2002). Mutasi terkait tumor pada p53 93,6% merupakan *point mutation* yang mengakibatkan substitusi asam amino tunggal, di mana mutasi ini agak berbeda dengan kebanyakan gen *tumor suppressor* lainnya yang mengalami delesi luas atau mutasi *frameshift* yang mengakibatkan hilangnya ekspresi protein secara total. Tumor seringkali mengalami defek pada jalur yang memiliki fungsi stabilisasi p53 pada respon stress atau pada efektor aktivitas apoptosis p53 (Vousden dan Lu, 2002). Sitotoksik pada sel lien mencit yang diinduksi DMBA telah dilaporkan dapat meningkatkan aktivitas p53 secara independen maupun melalui peningkatan aktivitas ATM/ATR yang dapat meningkatkan waktu stabilisasi p53 dan memutuskan ikatan p53 dengan regulatornya, yaitu MDM2 (Gao *et.al.*, 2007).

Terdapat dua protein; MDM2 dan MDM4/MDMX, yang memiliki peran krusial dalam meregulasi aktivitas p53 sehingga memungkinkan pertumbuhan dan perkembangan yang normal. MDM2 berpartisipasi

dalam autoregulasi p53 sebagai ubiquitin ligase yang mengarahkan protein p53 pada proses degradasi. Aktivasi dan stabilisasi p53 berhubungan dengan inhibisi fungsi MDM2 dan defek pada jalur MDM2. Hal ini banyak terjadi pada tumor. Pada sebuah penelitian tentang kanker kolon pada mencit menunjukkan adanya penurunan ARF (juga dikenal sebagai p14ARF pada manusia), yaitu protein yang menghambat MDM2 dan memediasi induksi p53 sebagai respon terhadap *adenomatous polyposis coli* (Alexander *et.al*, 2001).

2.3 *Moringa oleifera*

Moringa oleifera adalah tanaman asli India, Pakistan, dan Nepal. Tanaman ini juga telah dibudidayakan di daerah sekitarnya, meliputi Asia Selatan, Asia Tenggara, peninsula Arab, Afrika, Amerika Tengah, Karibia, dan daerah tropis Amerika Selatan. Seluruh bagian tanaman (buah, daun, bunga, akar, batang dan biji) *Moringa oleifera* dimanfaatkan di berbagai negara pembudidayanya untuk berbagai macam kepentingan, mulai dari menjernihkan air, sumber nutrisi harian, sampai pengobatan tradisional (Roloff, 2009).

2.3.1 Taksonomi

Kingdom	:	Plantae
Sub kingdom	:	Tracheobionta
Divisi	:	Magnoliophyta
Kelas	:	Magnoliopsida
Sub kelas	:	Dilleniidae
Ordo	:	Capparales

Famili : Moringaceae
Genus : Moringa
Spesies : *Moringa oleifera lam.*

(*Integrated Taxonomic Information System, 2000*)

2.3.2 Distribusi

Moringa oleifera adalah tanaman asli India, Pakistan, dan Nepal, kemudian menyebar ke daerah sekitarnya meliputi Asia Selatan, Asia Tenggara, peninsula Arab, Afrika, Amerika Tengah, Karibia, dan daerah tropis Amerika Selatan (Roloff, 2009). Tanaman ini mulai dibudidayakan di Afrika sejak abad ke-20 dan dimanfaatkan sebagai suplemen gizi (Muluvi *et.al.*, 1999).

2.3.3 Morfologi dan Karakteristik

Pohon *Moringa oleifera* dapat tumbuh sekitar 5-12 m dengan cabang dan ranting yang melebar sehingga berbentuk seperti payung. Batangnya tegak, dengan diameter 10-30 cm. kulit kayunya berwarna keputihan seperti gabus. Daunnya berdiameter 1-2 cm dan panjangnya 1,5-2,5 cm (tergantung cuaca). Akarnya berumbi, sehingga tumbuhan ini tahan terhadap kekeringan. Tumbuh baik pada curah hujan tahunan 250-1500 mm. *Moringa oleifera* dapat beradaptasi dengan kondisi cuaca panas, panas-kering, lembab, dan kondisi basah. Pohonnya tahan terhadap tempat bercahaya langsung, namun tidak dapat bertahan pada kondisi bersuhu rendah terus menerus. Tumbuh besar pada tanah yang gembur dan memiliki kandungan air cukup luas, namun dapat menyesuaikan diri pada tanah pasir maupun tanah yang lebih liat. Ia juga dapat tumbuh pada tanah alkali sampai pH 9, juga

mampu tumbuh di tanah asam sampai pH 4,5 (Shindano dan Chitundu, 2008)

2.3.4 Kegunaan Daun *Moringa oleifera*

Daun *Moringa oleifera* telah banyak dimanfaatkan sebagai antibakteri, mengobati infeksi saluran kemih, virus Epstein-Bar, HSV-1, HIV/AIDS, parasit cacing, trypanosoma, bronkitis, ulkus luar, demam, tumor, pembesaran prostat, radioproteksi, diabetes mellitus, diuretik, *hypcholestemia*, kolitis, rematik, sakit kepala, antioksidan, defisiensi zat besi, protein, sumber energi tubuh, antiseptik, defisiensi vitamin dan mineral, laktasi, katarak, dan lain-lain. Penelitian terbaru juga telah menguji kemampuan daun *Moringa oleifera* sebagai antibiotik dan prevensi terhadap kanker, termasuk kanker kolon (Fahey, 2005).



Gambar 2.3 Daun *Moringa oleifera* (Sreelatha dan Padma, 2009)

2.3.5 Kandungan Gizi daun *Moringa oleifera*

Kandungan gizi daun *Moringa oleifera* per 100 gram (Price, 2007) disajikan pada tabel berikut:

Tabel 2.1 Kandungan gizi daun *Moringa oleifera* per 100 gram (Price, 2007)

Moisture (%)	75.0
Kalori	92
Protein (g)	6.7
Lemak (g)	1.7
Karbohidrat (g)	13.4
Serat (g)	0.9
Mineral (g)	2.3
Ca (mg)	440
Mg (mg)	24
P (mg)	70
K (mg)	259
Cu (mg)	1.1
Fe (mg)	7
S (mg)	137
Asam oksalat (mg)	101
Vitamin A – β karoten (mg)	6.8
Vitamin B – kolin (mg)	423
Vitamin B1 – tiamin (mg)	0.21
Vitamin B2 – riboflavin (mg)	0.05
Vitamin B3 – asam nikotinat (mg)	0.8
Vitamin C – asam askorbat (mg)	220
Vitamin E – tokoferol asetat (mg)	-
Arginin (g/16g N)	6.0
Histidin (g/16g N)	2.1
Lisin (g/16g N)	4.3
Triptofan (g/16g N)	1.9
Fenilalanin (g/16g N)	6.4
Metionin (g/16g N)	2.0
Treonin (g/16g N)	4.9
Leusin (g/16g N)	9.3
Isoleusin (g/16g N)	6.3
Valin (g/16g N)	7.1

2.3.6 Senyawa Kimia dan Antioksidan

Moringa oleifera telah diketahui memiliki efek kemopreventif dan inhibisi produksi radikal bebas melalui modulasi enzim detoksifikasi seperti sitokrom b5, sitokrom P450, katalase, reduktase, S-transferase, dan *glutathione-peroxidase* (Bharali *et.al.*, 2003). Jaringan dari berbagai varietas *Moringa oleifera* telah dianalisis mengandung

banyak flavonoid diikuti 45 antioksidan lainnya. Berikut ini adalah tabel aktivitas antiradikal beberapa flavonoid (Bennet *et.al.*, 2003) :

Tabel 2.2 Aktivitas Antiradikal Senyawa Flavonoid (Bennet *et.al.*, 2003)

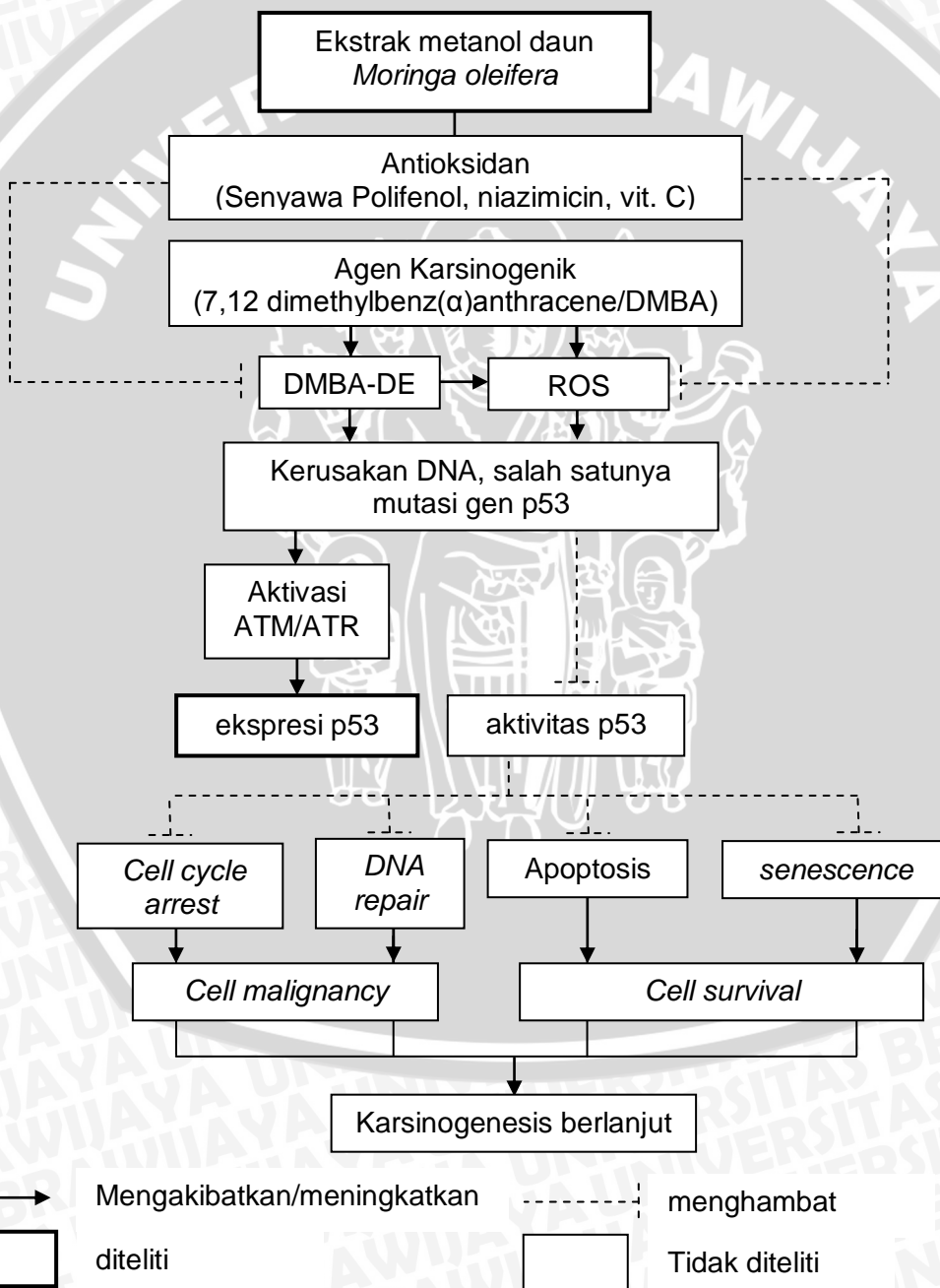
No	Senyawa flavon/flavonol	Aktivitas antiradikal (% A)
1	Kaempferol	93.5
2	Galangin	91.8
3	Quercetin	89.8
4	Morin	96.5
5	Robinetin	82.3
6	Fisetin	79.0
7	3-hidroksiflavon	66.0
8	Laristrin	84.6
9	Mirisetrin	72.8
10	3,5,7,3',4',5'pentametoksiflavon	12.6
11	7-hidroksiflavon	2.8
12	Flavon	1.5
13	5-hidroksiflavon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

Flavonoid yang terdapat dalam daun *Moringa oleifera* diantaranya adalah quercetin dan kaempferol. Quercetin merupakan antioksidan kuat, dengan kekuatan 4 – 5 kali lebih tinggi dibandingkan vitamin C dan vitamin E yang dikenal sebagai antioksidan potensial. (Boyer *et.al.*, 2005). Selain itu quercetin juga telah diketahui memiliki potensi anti kanker sebagai penginduksi apoptosis (Akan, 2011) dan telah dipasarkan oleh Calbiochem sebagai obat (Lamson dan Brignall, 2000). Kaempferol juga merupakan antioksidan kuat dan memiliki potensi anti kanker, terutama dengan menghambat proliferasi dan meningkatkan apoptosis pada sel kanker kolon (Li *et.al.*, 2009). Kaempferol menunjukkan penghambatan yang poten terhadap aktifitas generasi ROS (Piao, 2011). Kaempferol juga memiliki efek anti kanker (Kong *et.al.*, 2011). Niazimicin, salah satu alkaloid pada *Moringa oleifera* juga telah diketahui memiliki potensi antitumor pada karsinogenesis kanker kulit pada mencit yang diinduksi DMBA (Guavera *et.al.*, 1999).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka konsep



3.2 Penjelasan Kerangka Konsep

Agen karsinogenik seperti 7,12 *dimethylbenz(a)anthracene* (DMBA) yang dikenal bersifat mutagenik, teratogenik, karsinogenik, sitotoksik dan immunosupresif (Uno *et.al.*, 2004). DMBA menginduksi pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) yang dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid, kerusakan DNA, dan penurunan sistem pertahanan antioksidan sel (Bharli *et al.*, 2003). DMBA dimetabolisme oleh sitokrom p450 1B1 (CYP1B1) menjadi DMBA-3,4-*epoxide* diikuti oleh konversi oleh *microsomal epoxide hydrolase* (mEH) menjadi DMBA-3,3-*dihydrodiol* lalu dikonversi akhir oleh CYP1B1 menjadi DMBA-3,4-*dihydrodiol-1,2-epoxide* (DMBA-DE) yang berikatan kovalen dengan DNA dan menyebabkan kerusakan DNA yang dapat menimbulkan efek karsinogenik. Kerusakan DNA yang dapat terjadi pada paparan DMBA salah satunya adalah mutasi gen p53 (Wei *et.al.*, 2002).

Beberapa sensor kunci yang bertanggung jawab pada kerusakan DNA adalah *ataxia telangiectasia mutated* (ATM), Rad3-related (ATR) protein, dan p53. P53 adalah protein *tumor suppressor* yang teraktivasi setelah fosforilasi dan bertanggung jawab dalam regulasi sinyal DNA repair, cell cycle arrest, dan apoptosis setelah paparan genotoksik. Ekspresi p53 dapat ditemukan dalam level yang rendah pada kondisi normal dan diregulasi oleh protein *mouse double minute* (MDM) 2 (Hickman *et.al.*, 2002). ATM dan ATR adalah bagian dari keluarga PI3K yang menginisiasi respon genotoksik seluler setelah kerusakan DNA. ATM cepat teraktivasi dan memfosforilasi dan menstabilisasi p53, juga memicu fosforilasi MDM2 dan memutus kompleks p53-MDM2 sehingga berkontribusi pada stabilisasi p53. Aktivasi ATR

merupakan respon yang muncul beberapa saat kemudian yang dapat mempertahankan fosforilasi p53 (Myers dan Cortez, 2006). Aktivitas p53 juga dapat menurun pada mutasi gen p53, meskipun ekspresinya tetap tinggi. Berkurangnya aktivitas p53 sebagai *tumor suppressor* mengakibatkan penurunan *cell cycle arrest* untuk perbaikan komponen sel yang mengalami stress dan menurunkan *DNA repair* pada sel yang mengalami mutasi DNA sehingga *cell malignancy* meningkat. Berkurangnya aktivitas p53 juga mengakibatkan menurunnya apoptosis dan *senescence* sehingga *cell survival* meningkat.

Dengan pemberian ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* yang mengandung senyawa polifenolat kaempferol dan quercetin, niazimicin, dan vitamin C yang berpotensi sebagai antioksidan dan memodulasi enzim detoksifikasi seperti sitokrom b5, sitokrom P450, katalase, reduktase, S-transferase, dan *glutathione-peroxidase* diharapkan dapat menekan pembentukan DMBA-DE dan ROS sehingga dapat meminimalisasi kerusakan DNA dan stress sel, dan perbaikan DNA pada sel yang mengalami stress sehingga keganasan dapat menurun. Berkurangnya sel yang mengalami stress dan kerusakan DNA ditandai dengan menurunnya ekspresi p53 karena protein ini banyak diekspresikan pada keadaan sel stress dan keganasan.

3.3 Hipotesis Penelitian

Pemberian ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan jumlah epitel yang mengekspresikan p53 pada mukosa kolon *Rattus novergicus* strain wistar jantan yang diinduksi DMBA.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Rancangan eksperimental yang digunakan adalah rancangan eksperimen sederhana (*post test control group design*) dimana subyek dibagi menjadi 5 kelompok (I sampai dengan V) secara acak. Pada penelitian ini tiap kelompok terdiri dari 6 sampel kecuali kelompok II yang terdiri dari 9. Kelompok I adalah sampel yang tidak diberi diet mengandung DMBA (kontrol negatif), kelompok II sampel diberi diet mengandung DMBA saja (kontrol positif), sedangkan kelompok III sampai dengan V (3 kelompok) diberi diet mengandung DMBA dengan ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dalam berbagai dosis.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Hewan Coba, Objek dan Teknik Randomisasi

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

Objek penelitian yang dipakai adalah tikus wistar jenis kelamin jantan, dewasa dengan umur \pm 2 bulan. Teknik randomisasi untuk

pengelompokan perlakuan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap atau *Randomized Completely Design* mengingat baik hewan coba, bahan pakan, dan bahan penelitian lainnya dapat dikatakan homogen. Pada rancangan ini 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 dan 2 ekor lainnya adalah cadangan untuk tiap kelompok. Jadi untuk 5 kelompok dibutuhkan sebanyak 33 sampel (Solimun, 2001).

4.2.3 Kriteria Inklusi

1. Strain Wistar
2. Umur 2 bulan
3. Berat badan ± 200 gr
4. Jenis kelamin jantan
5. Dalam keadaan sehat selama penelitian

4.2.4 Kriteria Eksklusi

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

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

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

4.4 Variabel Penelitian

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

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah ekspresi protein p53 pada preperat 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 sebagai berikut :

1. Kriteria inklusi
2. Pemberian DMBA
3. Kondisi lingkungan kandang
4. Pemberian per oral ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* dengan sonde

4.5 Definisi Operasional

1. Pemberian per oral ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*)
Perlakuan (Intervensi) adalah pemberian suplementasi ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) 0 mg/kgBB/hari, 20 mg/kgBB/hari, 40 mg/kgBB/hari, 80 mg/kgBB/hari per oral dengan sonde (Parvathy and Umamaheswari, 2007).
2. Induksi kanker kolon
Tikus wistar diberi 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA) per oral (sonde) 10 mg/kgBB/hari yang dilarutkan ke dalam 3 ml air selama 45 hari
3. Ekspresi protein p53 dalam jaringan kolon.
Ekspresi protein p53 dihitung dengan metode imunohistokimia pada setiap kelompok tikus. Ekspresi p53 dihitung dengan satuan sel dengan perbesaran mikroskop 400x sebanyak 10 lapangan pandang pada setiap tikus. Ekspresi p53 positif ditampilkan sebagai warna coklat

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat

1. Alat Pemeliharaan Binatang Coba

Kandang dari kotak plastik, tutup kandang dari anyaman kawat, botol air, rak tempat menaruh kandang. Satu kandang berisi satu ekor tikus.

2. Alat 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 p53 adalah *Immunohistochemistry kit*, mikroskop

4.6.2 Bahan Penelitian

1. Bahan Makanan Tikus

Pakan tikus dewasa per ekor per hari adalah 50 gram. Dalam penelitian ini terdapat satu macam pakan tikus yaitu diet normal untuk kelima kelompok perlakuan. Adapun komposisi pakan normal terdiri dari comfeed PARS 53% (dengan kandungan air 12 %, protein 11 %, lemak 4 %, serat 7 %, abu 8 %, Ca 1,1 %, fosfor 0,9 %, antibiotik, *coccidiostat* 53 %) dan tepung terigu 23,5 %, dan air 23,5 %.

2. Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*)

Proses ekstraksi menggunakan 42 gram dari tepung daun kelor (*Moringa oleifera*) yang disuspensikan dalam metanol 96%. Ekstrak kemudian diaduk secara mekanis selama 12 jam dalam temperatur ruangan (25°C). Solid kemudian dipindahkan dengan sentrifugasi (4,000 g, 10 min) dan supernatan diambil. Hasil ekstrak kemudian

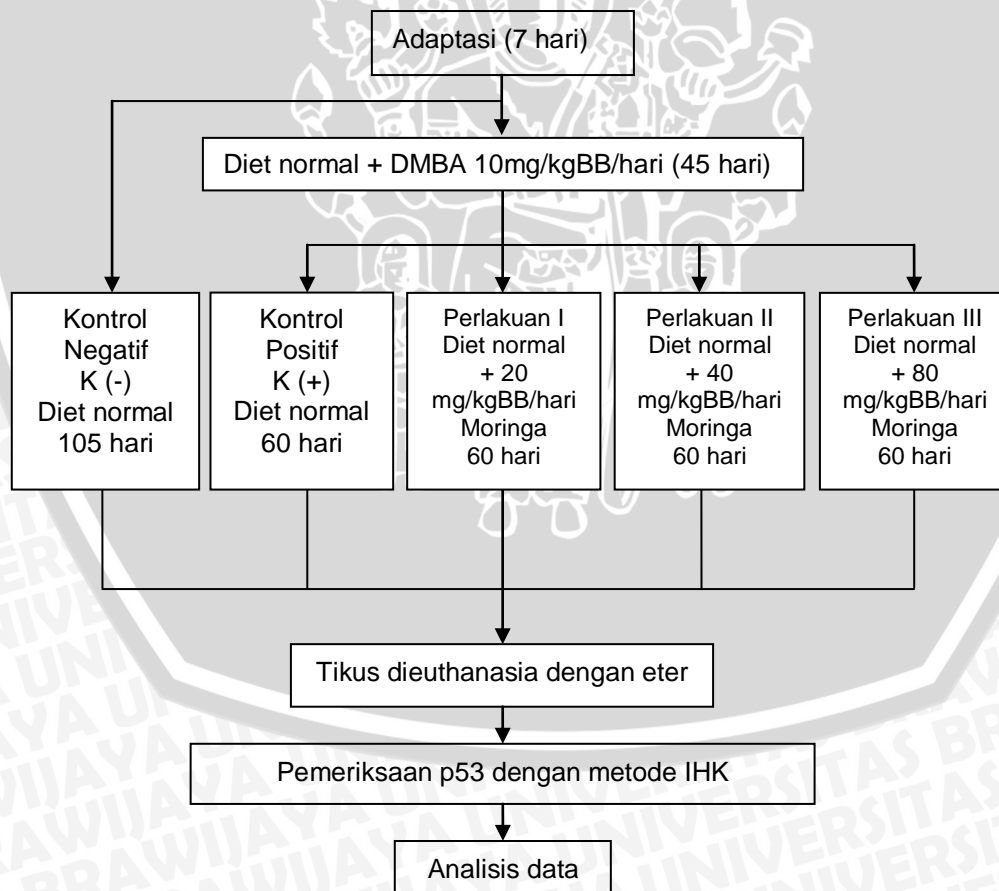
disimpan pada suhu 4°C untuk proses lebih lanjut (Mutasim *et al.*,2010).

3. Bahan Pemeriksaan imunohistokimia

Jaringan kolontikus, antibodi p53, IHK *kit unit*.

4.7 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh pengetahuan mengenai efek ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap ekspresi protein p53 dalam jaringan kolon tikus (*Rattus norvegicus*) wistar jantan yang diinduksi DMBA. Alur penelitian dapat dijelaskan melalui bagan berikut.



Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.7.1 Adaptasi

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

4.7.2 Tikus yang Diinduksi DMBA

Tikus wistar diberi 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) per oral (sonde) 10 mg/kgBB/hari yang dilarutkan ke dalam 3 ml air. Pemberian DMBA dilakukan selama 45 hari. Setelah 45 hari, 1 ekor tikus yang diberi DMBA tanpa ekstrak *Moringa oleifera* dieuthanasia untuk melihat adanya perkembangan karsinogenesis pada jaringan kolon.

4.7.3 Perlakuan

4.7.3.1 Pemeliharaan

Dalam masa ini, kelima kelompok tikus mendapat perlakuan yang berbeda. Untuk kelompok I (kontrol negatif), tikus hanya diberi pakan normal saja selama 105 hari. Kelompok perlakuan II hingga V diberi diet DMBA sebanyak 10 mg/kgBB/hari dengan sonde selama 45 hari. Setelah itu, kelompok II diberi diet normal tanpa pemberian ekstrak metanol daun *Moringa oleifera*. Sedangkan kelompok III diberi ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* per oral dengan dosis 20 mg/kgBB/hari dengan sonde + diet normal. Kelompok IV diberi ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* per oral dengan dosis 40 mg/kgBB/hari + diet normal. Kelompok V diberi ekstrak metanol

daun *Moringa oleifera* per oral dengan dosis 80 mg/kgBB/hari + diet normal. Semua pakan di atas diberikan selama 60 hari.

4.7.3.2 Pembedahan

Pemeriksaan p53 dalam jaringan kolon tikus wistar pada eksperimen ini memerlukan jaringan kolon. Penelitian ini merupakan penelitian payung, yang meneliti efek ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* pada jaringan hepar dan kolon tikus wistar jantan dengan *dependent variable* yang berbeda-beda. Karena itu, setelah 60 hari pemberian ekstrak metanol daun *Moringa oleifera*, tikus dieuthanasia dengan cara pembiusan eter. Kemudian abdomen dibuka, setelah itu sebagian jaringan kolon diambil untuk pemeriksaan protein p53. Setelah penelitian, tikus dikuburkan di tempat yang aman oleh laboran.

4.7.3.3 Pemeriksaan Imunohistokimia p53

Berikut prosedur metode imunohistokimia :

1. Pemotongan jaringan makros

Setelah dipisahkan, jaringan kolon dipotong setebal 2-3 mm, kemudian dimasukkan ke kaset sesuai dengan kode gross. Setelah itu dilakukan fiksasi dengan memasukkan jaringan ke dalam formalin 10%. Dan diproses menggunakan mesin

Tissue Tex Processor

2. Proses Pengeblokan dan Pemotongan Jaringan

Jaringan diangkat dari mesin *Tissue Tex Processor* dan diblok dengan paraffin sesuai dengan kode jaringan, lalu dipotong dengan mesin *microtome* dengan ketebalan 3-5 μm .

3. Proses Deparafinisasi

Setelah jaringan dipotong dengan mesin *microtome*, dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 70°C selama 15 menit, kemudian dimasukkan ke dalam xylol sebanyak dua kali, dengan masing-masing tahap selama 15 menit dan suhu xylol 70°C dilanjutkan dengan perendaman pada alkohol 96% sebanyak empat kali dengan masing-masing tahap selama 3 menit dan dicuci dengan air mengalir selama 10 menit

4. Pemberian antibodi primer p53 pada suhu 37°C selama 60 menit, lalu bilas dengan PBS 3 kali masing-masing selama 5 menit dan diseka dengan tisu.

5. Pemberian antibodi sekunder selama 60 menit lalu bilas lagi dengan PBS 2 kali selama masing-masing 5 menit dengan tisu.

6. SA-HRP 60 menit, bilas dengan PBS 2 kali masing-masing dan diseka dengan tisu.

7. DAB \pm 20 menit, lalu cuci dengan akuades 2x masing-masing 5 menit dan diseka dengan tisu.

8. *Control staining mayer*, hematoxilen 10 detik, lalu dicuci dengan air kran sampai bersih dan dikeringkan dengan tisu.

9. *Mounting* dengan entelan.

Setelah siap, sediaan diperiksa dibawah mikroskop perbesaran 400x untuk melihat ekspresi protein p53.

4.8 Pengolahan dan Analisis Data

Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif yaitu :

1. Uji normalitas data menunjukkan bahwa sebaran data penelitian ini normal ($p > 0,05$).
2. Uji homogenitas varian yang menunjukkan bahwa data yang diperoleh memiliki varian yang homogen ($p > 0,05$). Karena data normal dan homogen, analisis dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.
3. Uji *One-way* ANOVA didapatkan nilai rata-rata jumlah ekspresi protein p53 dari kelima populasi memang berbeda ($p < 0,05$). Dengan demikian terdapat minimal 2 kelompok yang berbeda signifikan.
4. Analisis data kemudian dilakukan dengan *Post Hoc test* (uji Tuckey HSD), uji *Post Hoc* yang digunakan adalah uji Tuckey HSD dengan tingkat kemaknaan 95% ($p < 0,05$).
5. Untuk melengkapi analisis yang dilakukan, digunakan uji *Homogenous Subsets*. Uji ini menunjukkan bahwa terdapat 3 subset yang didapatkan pada data, dan dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara subset sesuai hasil uji *Tuckey*.

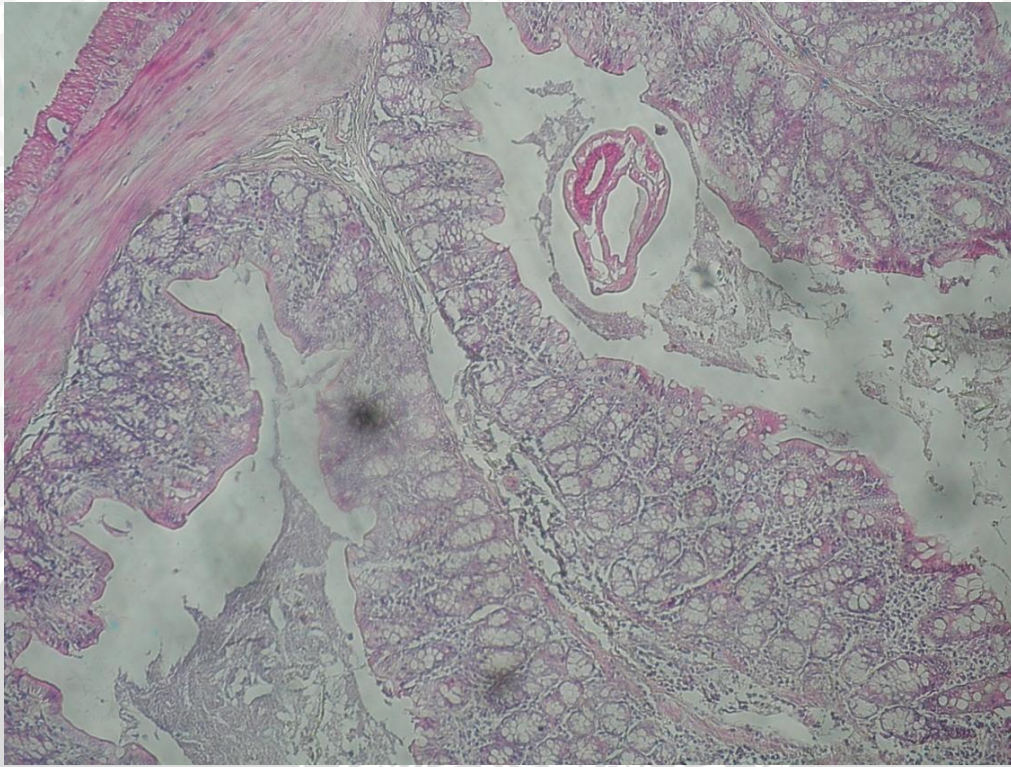
BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

Terdapat lima macam perlakuan terhadap *Rattus norvegicus* strain wistar jantan, yaitu : kelompok 1 diberi diet normal selama 105 hari (kontrol negatif), kelompok 2 diberi diet normal dan 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) 10mg/kgBB/hari selama 45 hari (kontrol positif), dilanjutkan dengan pemberian diet normal tanpa ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*); sedangkan kelompok 3 sampai dengan 5 (Perlakuan I-III) diberi diet normal dan 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) 10mg/kgBB/hari selama 45 hari, dilanjutkan dengan pemberian ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dalam dosis yang berbeda pada tiap kelompok (20, 40 dan 80 mg/kgBB/hari yang dilarutkan ke dalam 3 ml air) per oral dengan sonde selama 60 hari.

Pada hari ke-45 induksi DMBA dilakukan pembedahan pada salah satu hewan coba kelompok kontrol positif dan dilakukan pemeriksaan histologi terhadap Jaringan kolon untuk melihat progresifitas karsinogenesis. Gambaran histologi yang didapatkan dari pemeriksaan tersebut ditampilkan pada gambar 5.1

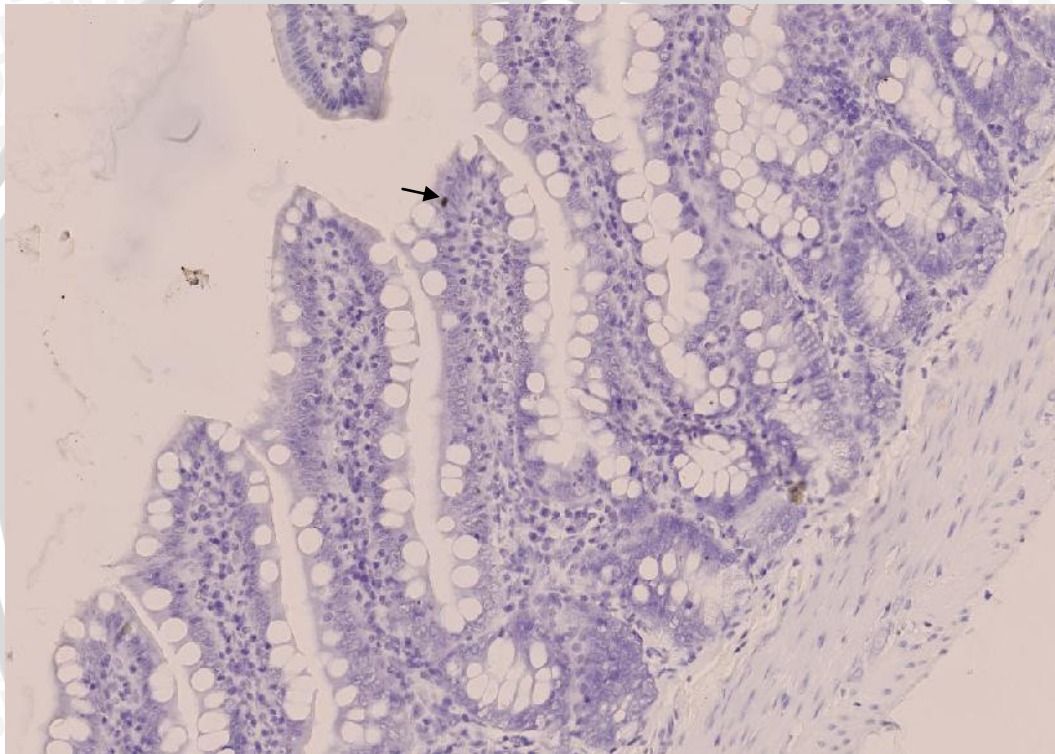


Gambar 5.1 Gambaran Histologi Jaringan Kolon Kelompok Kontrol Positif pada Hari ke-45 Induksi DMBA. Tampak Adanya Gambaran Hiperplasia pada Mukosa Kolon

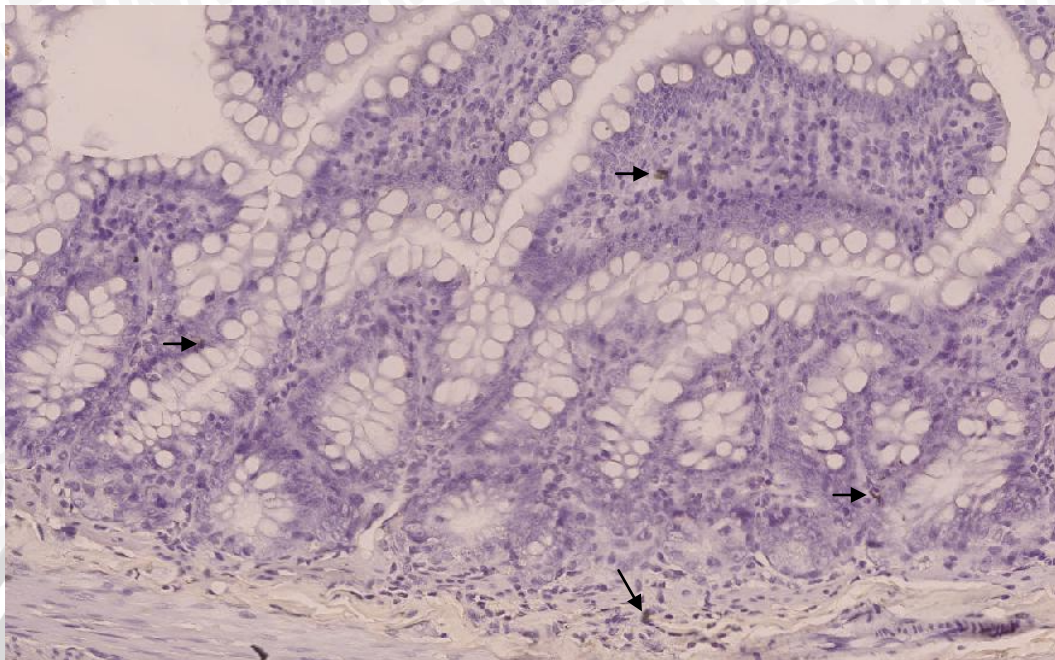
Pemeriksaan jumlah epitel yang mengekspresikan p53 dilakukan menggunakan pengecatan IHC dan dihitung di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x terhadap mukosa kolon dari semua kelompok. Persentase rata-rata jumlah epitel yang mengekspresikan p53 pada masing-masing kelompok perlakuan dihitung dengan cara menjumlahkan epitel yang mengekspresikan p53 dibagi jumlah epitel yang terlihat pada seluruh lapang pandang pada masing-masing sampel kemudian dibagi dengan jumlah sampel pada masing-masing kelompok. Dari 6 sampel yang didapat, hanya 4 sampel yang disertakan dalam perhitungan karena jumlah pengulangan yang dibutuhkan untuk tiap-tiap kelompok dalam penelitian ini adalah 4. Rata-rata jumlah epitel yang mengekspresikan p53 pada masing-masing kelompok ditampilkan pada tabel 5.1.

Tabel 5.1 Rata-rata Jumlah Epitel yang Mengekspresikan p53 dalam %

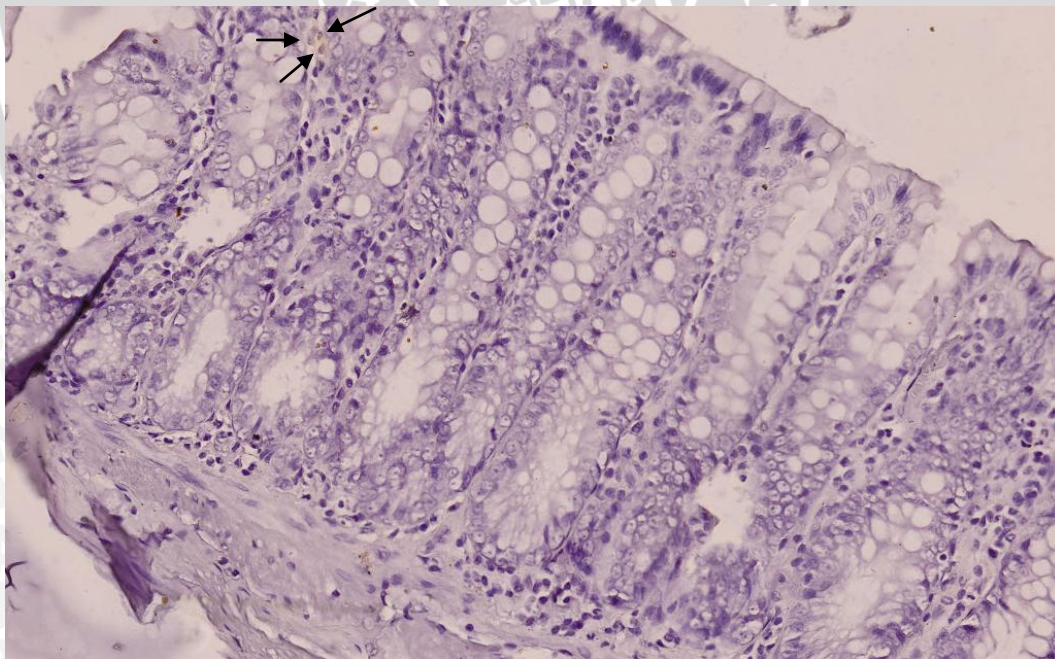
Kelompok	N	Rerata	Standar Deviasi	Total jumlah sel per 60.000 sel
1 Kontrol Negatif	4	.0050	.0064	3
2 Kontrol Positif	4	.0200	.0054	12
3 Moringa 20 mg	4	.0083	.0084	5
4 Moringa 40 mg	4	.0050	.0064	3
5 Moringa 80 mg	4	.0050	.0064	3



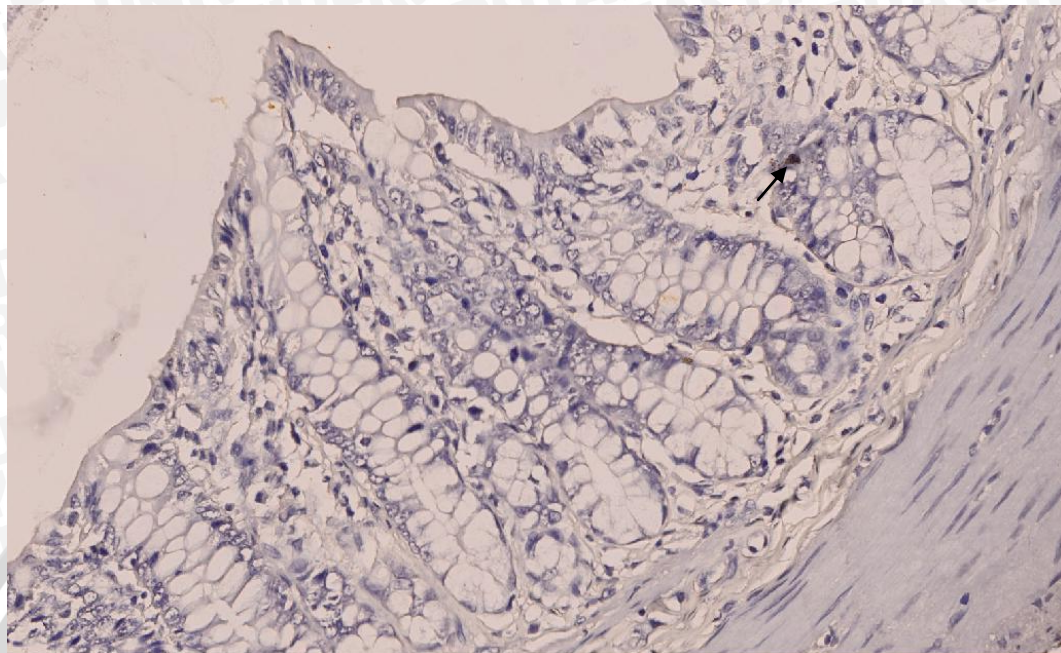
Gambar 5.2 Irisan Jaringan Kolon kelompok 1 (kontrol negatif) dengan sel yang mengekspresikan p53 (metode IHK, perbesaran mikroskop 400x) terlihat berwarna coklat ditunjuk dengan tanda panah



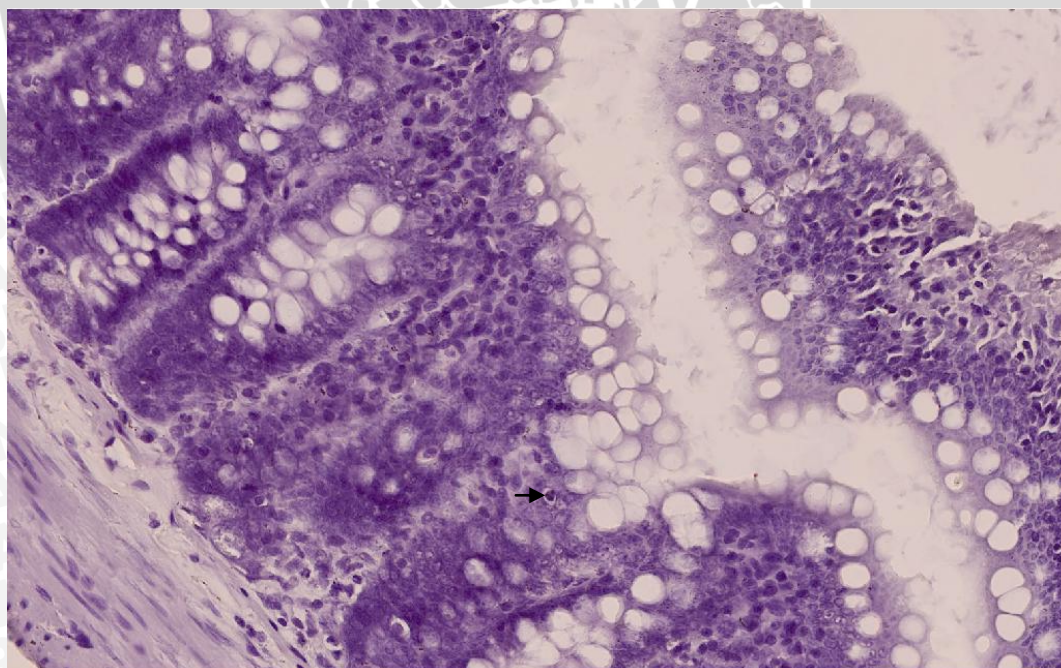
Gambar 5.3 Irisan Jaringan Kolon kelompok 2 (kontrol positif) dengan sel yang mengekspresikan p53 (metode IHK, perbesaran mikroskop 400x) terlihat berwarna cokelat ditunjuk dengan tanda panah



Gambar 5.4 Irisan Jaringan Kolon kelompok 3 (perlakuan I, Moringa 20 mg/kgBB/hari) dengan sel yang mengekspresikan p53 (metode IHK, perbesaran mikroskop 400x) terlihat berwarna cokelat ditunjuk dengan tanda panah



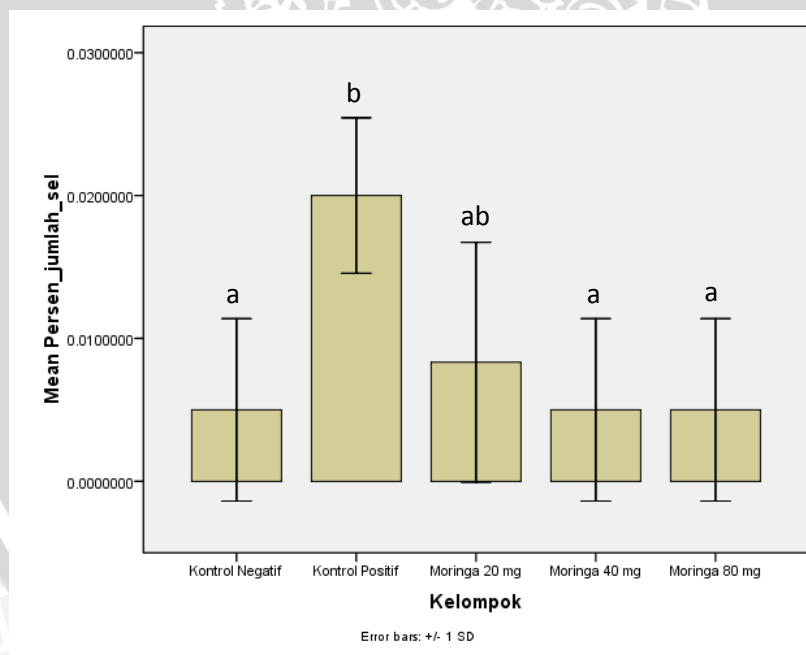
Gambar 5.5 Irisan Jaringan Kolon kelompok 4 (perlakuan II, Moringa 40 mg/kgBB/hari) dengan sel yang mengekspresikan p53 (metode IHK, perbesaran mikroskop 400x) terlihat berwarna coklat ditunjuk dengan tanda panah



Gambar 5.6 Irisan Jaringan Kolon kelompok 5 (perlakuan III, Moringa 80 mg/kgBB/hari) dengan sel yang mengekspresikan p53 (metode IHK, perbesaran mikroskop 400x) terlihat berwarna coklat ditunjuk dengan tanda panah

5. 2 Analisis Data

Rata-rata jumlah epitel yang mengekspresikan p53 pada kelompok 1 (Kontrol Negatif) adalah 0,005 % (perbesaran mikroskop 400x). Rata-rata jumlah epitel yang mengekspresikan p53 pada kelompok 2 (Kontrol Positif) adalah 0,02 % (perbesaran mikroskop 400x). Rata-rata jumlah epitel yang mengekspresikan p53 pada kelompok 3 (Perlakuan I) adalah 0,0083 % (perbesaran mikroskop 400x). Rata-rata jumlah epitel yang mengekspresikan p53 pada kelompok 4 (Perlakuan II) adalah 0,005 % (perbesaran mikroskop 400x). Rata-rata jumlah epitel yang mengekspresikan p53 pada kelompok 5 (Perlakuan III) adalah 0,005 % (perbesaran mikroskop 400x).



Gambar 5.7 Grafik Rata-rata Jumlah Epitel yang Mengekspresikan p53 pada Kelompok Kontrol Negatif, Kontrol Positif, Perlakuan I (Moringa 20 mg), Perlakuan II (Moringa 40 mg), dan Perlakuan III (Moringa 80 mg)

Keterangan : Kontrol negatif dan Kontrol positif memiliki perbedaan yang signifikan. Perbandingan Kontrol positif dengan Perlakuan I (Moringa 20 mg), II (Moringa 40 mg), dan III (Moringa 80 mg) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* menurunkan jumlah sel yang mengekspresikan p53 seiring dengan peningkatan dosis yang diberikan. Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$).

Dari gambar 5.7 terlihat rata-rata jumlah epitel yang mengekspresikan p53 dengan nilai terendah terdapat pada kelompok 1 (Kontrol Negatif), kelompok 4 (Moringa 40 mg), dan kelompok 5 (Moringa 80 mg) yaitu sebesar 0,005 % (perbesaran mikroskop 400x). Sedangkan rata-rata jumlah epitel yang mengekspresikan p53 tertinggi terdapat pada kelompok 2 (Kontrol Positif) yaitu sebesar 0,02 % (perbesaran mikroskop 400x).

Data yang didapatkan dari hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan program komputer SPSS 16 untuk *Windows*. Rata-rata jumlah epitel yang mengekspresikan p53 menunjukkan bahwa pada kelompok 3, 4, 5 (Perlakuan I, Perlakuan II, Perlakuan III) yang diberi diet normal, DMBA, dan ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* pada berbagai dosis memiliki jumlah epitel yang mengekspresikan p53 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok 2 (kontrol positif) ($p=0,025$).

Hasil penelitian tersebut diuji dengan uji normalitas data dan homogenitas varian, seperti tersusun dalam lampiran . Untuk menguji normalitas distribusi data digunakan Shapiro-Wilk (Lampiran 1). Didapatkan bahwa distribusi data hasil penelitian ini adalah normal. Sedangkan untuk menguji homogenitas varian digunakan *Levene test* (Lampiran 2). Dari hasil *Levene test* tampak bahwa data berasal dari populasi-populasi yang memiliki varian sama ($p=0,894$). Oleh karena data hasil penelitian memiliki distribusi normal, dan varian yang homogen, dapat dilakukan pengujian *One-way ANOVA*.

Uji ANOVA (*Analysis of Variance*) (Lampiran 3) dilakukan untuk menguji variasi dari rata-rata (*mean*) persentase jumlah sel yang mengekspresikan p53 antar kelompok. Dari hasil tes tersebut didapatkan variasi yang berbeda

($p=0,025$) antar kelompok. Hal ini menunjukkan bahwa pada penelitian ini terdapat minimal 2 kelompok yang berbeda signifikan.

Analisis dilanjutkan dengan *Post hoc test (Least Significant Difference)* yang bertujuan untuk mengetahui kelompok yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA. Pada analisis ini digunakan *Tukey HSD test* (Lampiran 4).

Dari hasil *Tukey HSD test* terdapat perbedaan jumlah epitel yang mengekspresikan p53 pada mukosa kolon tikus wistar jantan secara signifikan antara kelompok Kontrol Negatif dengan kelompok Kontrol Positif, kelompok Kontrol Negatif dengan kelompok Perlakuan II, dan kelompok Kontrol Positif dengan kelompok Perlakuan III ($p<0,05$) (Lampiran 4). Sedangkan analisis antara kelompok Kontrol Negatif dengan kelompok Perlakuan I, kelompok Kontrol Negatif dengan kelompok Perlakuan II, kelompok Kontrol Negatif dengan kelompok Perlakuan III, kelompok Kontrol Positif dengan kelompok Perlakuan I, kelompok Perlakuan I dengan kelompok Perlakuan II, kelompok Perlakuan I dengan kelompok Perlakuan III, kelompok Perlakuan II dengan kelompok Perlakuan III tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($p>0,05$) (Lampiran 4).

Untuk melengkapi hasil dari uji *Tukey* digunakan *Homogeneous Subsets* (Lampiran 5) yang digunakan untuk mencari grup atau subset yang memiliki perbedaan rata-rata (*Mean Difference*) yang tidak berbeda secara signifikan. Pada subset 1 menunjukkan empat kelompok, yaitu kelompok 1 (Kontrol Negatif), kelompok 3 (Perlakuan I), kelompok 4 (Perlakuan II), dan kelompok 5 (Perlakuan III). Pada subset 2 terdapat dua kelompok, yaitu kelompok 2 (Kontrol positif) dan kelompok 3 (Perlakuan I). Dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antar subset sesuai hasil uji *Tukey*.

Dari Gambar 5.7 dapat dilihat rata-rata jumlah epitel yang mengekspresikan p53 telah menurun pada kelompok 3 (Perlakuan I) dibandingkan rata-rata jumlah epitel yang mengekspresikan p53 pada kelompok 2 (Kontrol Positif) dan mengalami penurunan kembali pada kelompok 4 dan 5 (Perlakuan II dan III). Pada kelompok 2 (Perlakuan I), hasilnya tidak memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok 2 (Kontrol Positif) dan kelompok 1 (Kontrol Negatif). Sedangkan pada kelompok 4 (Perlakuan II) dan kelompok 5 (Perlakuan III), hasilnya memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok 2 (Kontrol Positif) dan tidak signifikan terhadap kelompok 1 (Kontrol Negatif). Oleh karena itu dapat diambil kesimpulan bahwa ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* memiliki efek menurunkan jumlah epitel yang mengekspresikan p53 pada mukosa kolon tikus wistar jantan yang diinduksi DMBA dan dosis respon terletak pada kelompok 2 (Perlakuan I) karena merupakan dosis terkecil yang telah memberikan efek mendekati normal (Kontrol Negatif).

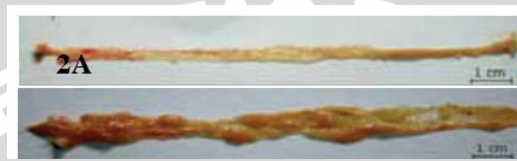
BAB 6

PEMBAHASAN

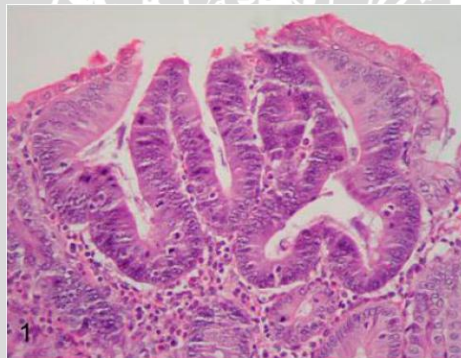
Penelitian mengenai pengaruh ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap jumlah epitel yang mengekspresikan p53 pada mukosa kolon *Rattus novergicus* strain wistar jantan yang diinduksi DMBA telah dilakukan. *Moringa oleifera* telah diketahui memiliki efek kemopreventif dan inhibisi produksi radikal bebas seperti *reactive oxygen species* (ROS) melalui modulasi enzim detoksifikasi seperti sitokrom b5, sitokrom P450, katalase, reduktase, S-transferase, dan *glutathione-peroxidase* (Bharali *et.al.*, 2003).

Paparan DMBA menginduksi perubahan patologi klinik melalui toksisitas yang terjadi pada kulit, ovarium, mukosa *buccal*, kelenjar *mammae*, hepar, ginjal, dan kolon (*European Commission Health and Consumer Protection Directorate-General*, 2002). Hal ini sesuai dengan kenaikan jumlah epitel yang mengekspresikan p53 pada mukosa kolon tikus setelah diinduksi DMBA. Selanjutnya terjadi penurunan jumlah epitel yang mengekspresikan p53 setelah pemberian ekstrak metanol daun *Moringa oleifera*. Hal ini disebabkan pemberian ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* mengandung antioksidan (flavonoid, alkaloid, vitamin C) yang akan menghambat pembentukan radikal bebas, juga menghambat terbentuknya metabolit DMBA-DE yang dapat berikatan dengan DNA yang mengakibatkan kerusakan DNA sehingga ekspresi dan aktivasi p53 menurun jumlahnya (Saha *et.al.*, 2012).

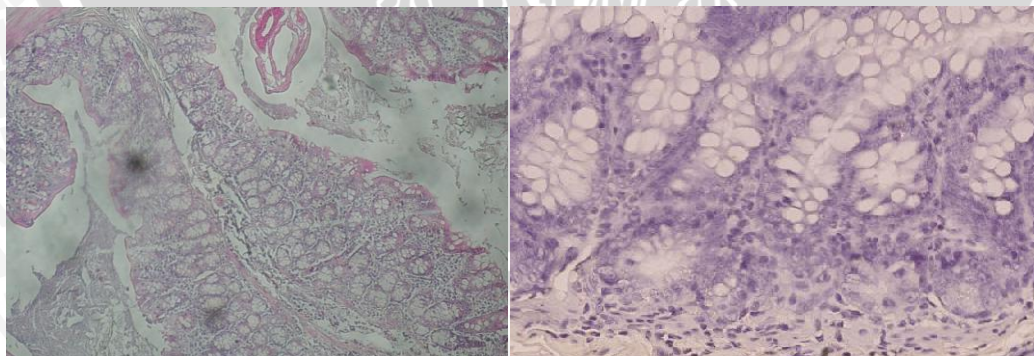
Pada eksperimen yang meneliti terjadinya kanker pada kolon tikus wistar jantan, gambaran morfologis yang pertama kali terlihat adalah lesi displasia pada mukosa seperti ditunjukkan pada gambar 6.2 setelah 17 minggu pemberian DMH (1,2-dimethylhidrazine) per subkutan (Catuogno *et.al.*, 2011). Sedangkan gambaran mukosa kontrol positif di hari ke-45 dan ke-105 pada penelitian ini ditampilkan pada gambar 6.3.



Gambar 6.1 Gambaran makroskopis kolon mencit yang normal (atas) dan mengalami tumor (bawah). Tampak nodul tumor dengan berbagai ukuran di sepanjang kolon mencit yang mengalami kanker kolon (Budda *et.al.*, 2011)

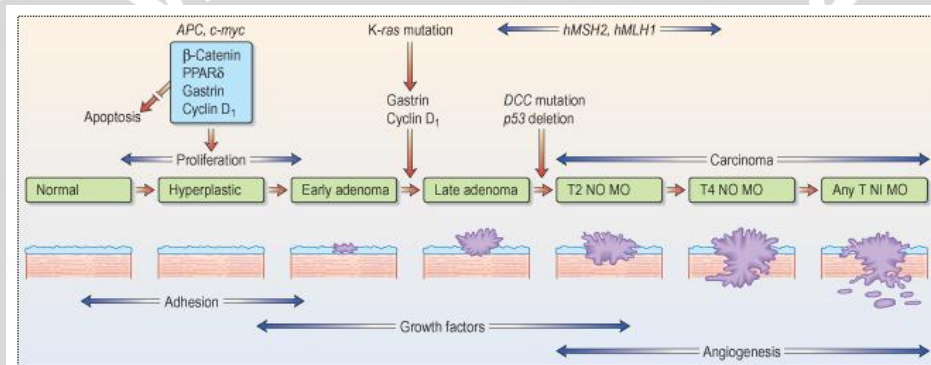


Gambar 6.2 Displasia pada permukaan mukosa kolon tikus. Bentukan pseudopapillar, berkurangnya produksi mucin, nukleus hiperkromatin, gambaran mitotic. HE, 100X (Catuogno *et.al.*, 2011)



Gambar 6.3 Kontrol Positif hari ke-45 perbesaran 100x (kiri), dan hari ke-105 perbesaran 400x (kanan). Pada Hari ke-45 tampak gambaran hiperplasia yang tidak tampak pada hari ke-105

Terdapat dua kemungkinan gambaran kontrol positif yang tidak menunjukkan gambaran displasia maupun hiperplasia pada hari ke-105 penelitian ini. Pertama, adanya rentang waktu 60 hari setelah waktu terakhir pemberian DMBA memberi kesempatan tubuh tikus memperbaiki stress seluler yang disebabkan oleh DMBA, mengingat regenerasi epitel mukosa kolon yang cepat sehingga tersisa perbedaan ekspresi protein p53 saja tanpa perbedaan morfologis seperti tampak pada gambar 6.3. Berikut adalah tahapan karsinogenesis pada jaringan kolon :



Gambar 6.4 tahapan karsinogenesis pada jaringan kolon (Kumar dan Clark, 2005)

Dari gambar 6.4 terlihat bahwa protoonkogen mengalami overekspresi di stadium awal yang menyebabkan terjadinya hiperplasia dan p53 termutasi pada tahap selanjutnya. Hal ini sesuai dengan adanya gambaran hiperplasia pada hari ke-45 paparan DMBA. Berdasarkan pemaparan diatas, jalur p53 merupakan salah satu target terapi yang efektif untuk dihambat ketika merencanakan suatu terapi terhadap kanker.

Rata-rata jumlah p53 pada kontrol positif yang berbeda secara signifikan dari kontrol negatif dalam jumlah yang relatif rendah juga dapat dipengaruhi oleh rentang waktu 60 hari ini, sesuai dengan penelitian Hickman *et.al.* (1994) yang menyatakan puncak respon p53 pada stress sel yang berlangsung dalam hitungan jam dan dapat dipertahankan sampai hitungan hari tergantung jenis

paparannya, sehingga pada penelitian ini terdapat kemungkinan puncak respon p53 telah selesai dan meninggalkan beberapa ekspresi yang masih bertahan pada sel kelompok kontrol positif, sementara pada kelompok perlakuan I sampai III proses penyembuhan sel dari induksi DMBA telah selesai karena adanya efek kemopreventif dari ekstrak daun *Moringa oleifera* dan kembali pada kondisi fisiologis.

Gambaran kontrol positif yang tidak menunjukkan gambaran displasia juga dapat disebabkan oleh masa laten pasca paparan DMBA. Waktu 60 hari pasca paparan DMBA terakhir belum dapat menunjukkan adanya kanker karena dibutuhkan waktu yang lebih lama untuk menimbulkan kanker, seperti yang dipaparkan oleh Jerry *et.al.* (1994) yang membutuhkan waktu 12 minggu (84 hari) pasca paparan DMBA untuk menimbulkan kanker mammae. Namun pada penelitian lain tentang kanker mammae, tumor telah muncul pasca paparan DMBA 100 mg/kgBB dosis tunggal dengan masa laten 60 sampai 90 hari (Todorova *et.al.*, 2006) sehingga penelitian ini tetap memiliki potensi memunculkan kanker kolon. Hal ini juga didukung oleh meningkatnya ekspresi *Cyclin D1* (salah satu protoonkogen yang berperan dalam proliferasi sel) pada kontrol positif secara signifikan dari kontrol negatif pada penelitian ini ($p=0.000$) (Humaidah, 2013). Dengan adanya peningkatan ekspresi p53 yang menandai adanya proses *repair* pada sel setelah mengalami stress atau *DNA damage*, juga peningkatan ekspresi *Cyclin D1* yang menandai adanya induksi proliferasi sel, induksi DMBA pada penelitian ini memiliki potensi memunculkan keganasan dalam beberapa waktu ke depan melalui efek mutageniknya. Namun demikian, proses karsinogenesis memang sesuatu yang kompleks dan multifaktorial sehingga banyak kemungkinan yang dapat terjadi.

Mekanisme potensi anti-tumor p53 yang berkurang dan ekspresinya yang bertambah pada proses keganasan dapat dijelaskan sebagai berikut. Keseimbangan p53 memiliki efek yang berbeda pada tahapan perkembangan tumor. Pada tahap awal stress sel karena paparan agen karsinogenik, p53 efektif dalam *DNA repair*, *senescence*, apoptosis, dan *cell cycle arrest* yang mencegah perkembangan keganasan lebih lanjut. Sedangkan pada stadium lanjut ketika telah terjadi overekspresi dari protoonkogen, aktivitas fisiologis p53 tidak lagi mampu menanggulangi hiperplasia yang terjadi pada jaringan kolon sehingga sel-sel tumor yang memiliki potensi keganasan terus bertambah banyak dan mengancam kerusakan DNA lebih lanjut, salah satunya gen yang mengkode p53. Kerusakan gen p53 mengakibatkan p53 tidak dapat berfungsi, namun tetap dapat diekspresikan. Sebanyak 93,6% mutasi terkait tumor pada p53 merupakan *point mutation* yang mengakibatkan substitusi asam amino tunggal, di mana mutasi ini agak berbeda dengan kebanyakan gen *tumor suppressor* lainnya yang mengalami delesi luas atau mutasi *frameshift* yang mengakibatkan hilangnya ekspresi protein secara total (Vousden dan Lu, 2002).

Daun kelor (*Moringa oleifera*) mengandung zat bioaktif yang memiliki efek kemopreventif dan inhibisi produksi radikal bebas melalui modulasi enzim detoksifikasi seperti sitokrom b5, sitokrom P450, katalase, reduktase, S-transferase, dan *glutathione-peroxidase* (Bharali *et.al.*, 2003). Beberapa zat bioaktif yang terkandung adalah flavonoid, niazimicin, glucomoringin, vit. C dan E. Flavonoid mempunyai kecenderungan mengikat atom, atau sebagai "*scavenging*" bagi radikal bebas sehingga tidak terbentuk ROS berlebihan (Nakagawa dan Kawagoe, 2000). Antioksidan adalah senyawa yang mampu menghambat oksidasi. Antioksidan merupakan senyawa pelindung sel melawan

efek merusak dari *Reactive Oxygen Species* (ROS). Ketidakseimbangan antara antioksidan dengan ROS menimbulkan *oxidative stress* dan memicu kerusakan selular. *Oxidative stress* berhubungan dengan kanker, penuaan, aterosklerosis, dan inflamasi (Buhler dan Miranda, 2000). Menurut penelitian, daun *Moringa oleifera* adalah sumber antioksidan alami yang potensial dengan metanol yang merupakan salah satu pelarut terbaik untuk ekstraksinya. Senyawa bioaktif yang utama ditemukan adalah quercetin dan kaempferol (Shidduraju dan Becker, 2003). Sumber lain mengatakan quercetin dan kaempferol dengan bentuk 3'-O-glikosida merupakan flavonol yang dominan pada daun *Moringa oleifera* (Manguro dan Lemmen, 2007) dengan konsentrasi flavonol quercetin mencapai 100mg/100g daun kelor (Lako *et al.*, 2007). Quercetin merupakan antioksidan kuat, dengan kekuatan 4 – 5 kali lebih tinggi dibandingkan vitamin C dan vitamin E yang dikenal sebagai antioksidan potensial. (Boyer *et.al*, 2005).

Kaempferol menunjukkan penghambatan yang poten terhadap aktifitas generasi ROS (Sharma *et al.*, 2007). Kaempferol juga merupakan antioksidan kuat dan memiliki potensi anti kanker, terutama dengan menghambat proliferasi dan meningkatkan apoptosis pada kultur sel kanker kolon (Li *et.al.*, 2009). Kaempferol menunjukkan penghambatan yang poten terhadap aktifitas generasi ROS (Piao, 2011). Kaempferol diketahui memiliki efek anti kanker pada penelitian *in vitro* (Kong *et.al.*, 2011). Selain itu quercetin juga telah diketahui memiliki potensi anti kanker sebagai penginduksi apoptosis (Akan, 2011). Niazimicin, salah satu alkaloid pada *Moringa oleifera* juga telah diketahui memiliki potensi antitumor pada karsinogenesis kanker kulit pada mencit yang diinduksi DMBA (Guavera *et.al.*, 1999). Hasil penelitian menunjukkan potensi daun *Moringa oleifera* sebagai substansi yang mencegah sekaligus menghambat dan

mengatasi perkembangan terjadinya karsinogenesis kolon lebih lanjut, ditandai dengan adanya penurunan ekspresi p53 dan *Cyclin D1* setelah pemberian ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* pada penelitian ini. Hasil ini sejalan dengan penelitian lain yang mengatakan bahwa ekstrak daun *Moringa oleifera* memiliki efek penghambatan proliferasi tumor dan inhibisi ROS pada dosis 50, 100, 150, 200 dan 300 mg/kgBB/hari (Das *et.al.* 2012) sehingga pada penelitian ini didapatkan efek kemopreventif dalam dosis yang lebih rendah. Namun, mengingat adanya perbedaan jumlah sel yang relatif rendah antara kontrol positif dan kelompok perlakuan, yaitu 7 sel per 15.000 sel terhadap perlakuan I dan 9 sel per 15.000 sel terhadap perlakuan II dan III, masih diperlukan penelitian lebih lanjut terkait potensi daun *Moringa oleifera* untuk menjadi salah satu kandidat agen prevensi dan terapi kanker dalam aplikasi klinis.

Peningkatan efek antioksidan mungkin terjadi bila dosis pemberian ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* ditambahkan. Namun karena tidak didapatkan batas penurunan jumlah sel yang mengekspresikan p53 ketika dosis daun *Moringa oleifera* ditambahkan, maka pada penelitian ini tidak ditemukan dosis efek antioksidan daun *Moringa oleifera* berubah menjadi prooksidan. Hal ini berhubungan dengan penelitian Kumar *et.al.* (2010) yang menyatakan tidak didaptkannya efek samping pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera* pada mencit yang diberi dosis 500mg/kgBB/hari selama 7 hari. Namun demikian perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait rentang dosis terapi ekstrak daun *Moringa oleifera*.

BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* dapat menurunkan jumlah epitel yang mengekspresikan p53 pada mukosa kolon tikus wistar yang diinduksi DMBA. Dosis respon pada penelitian ini adalah 20 mg/kgBB/hari.

7.2 Saran

Dari penelitian ini, saran yang dapat diajukan adalah:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui apakah terdapat peningkatan efek antioksidan dan efek samping dari daun *Moringa oleifera* bila dosis perlakuan ditambah.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis dimana efek antioksidan daun *Moringa oleifera* berubah menjadi prooksidan.
3. Perlu dilakukan penelitian serupa yang menyertakan dokumentasi makroskopis jaringan kolon per kelompok pada hari ke-45 dan ke-105
4. Perlu dilakukan penelitian serupa yang menyertakan dokumentasi jumlah epitel yang mengekspresikan p53 pada mukosa kolon per kelompok pada hari ke-45 untuk melihat penurunan ekspresi p53

DAFTAR PUSTAKA

- Akan, Zafer. 2011. *Protective Role Of Quercetin : Antioxidants May Protect Cancer Cells from Apoptosis and Enhance Cell Durability*. Online, http://www.webmedcentral.com/wmcpdf/Article_WMC001504.pdf, diakses 30 Agustus 2011.
- Al-Attar, Atef M. 2004. The Influence of Dietary Grapeseed Oil on DMBA-Induced Liver Enzymes Disturbance in the Frog, *Rana ridibunda*. *Pakistan Journal of Nutrition* 3 (5): 304-309,
- Al-Attar, Atef M.. 1998. *Physiological Studies on the Effect of Fish Oil on Liver Tumour Induced by DMBA in the Egyptian Toad*. Ph.D. thesis. Alexandria University. Mesir.
- American Cancer Society. 2011. *Colorectal cancer*. Online.<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003096-pdf.pdf>. Diakses 23 Desember 2011
- American Society of Clinical Oncology. 2010. *Guide to Colorectal Cancer*. Online.[http://www.cancer.net/patient/Cancer%20Types/Cancer.Net%20Guide%20to%20Cancer%20PDFs/Cancer.Net Guide to Colorectal Cancer PDF.pdf](http://www.cancer.net/patient/Cancer%20Types/Cancer.Net%20Guide%20to%20Cancer%20PDFs/Cancer.Net%20Guide%20to%20Colorectal%20Cancer%20PDF.pdf). Diakses 12 Desember 2011
- Bai, Ling, Wei-Guo Zhu. 2006. p53: Structure, Function and Therapeutic Applications. *Journal of Cancer Molecules* 2(4): 141-153. Online : [http://mupnet.com/JOCM%20\(4\)%20141-153.pdf](http://mupnet.com/JOCM%20(4)%20141-153.pdf). Diakses 23 Juli 2012
- Bharali R, Tabassum J, Azad MR. 2003. Chemomodulatory effect of *Moringa oleifera* Lam on Hepatic Carcinogen Metabolizing Enzymes, Antioxidant Parameters and Skin Papillomagenesis in Mice. *Asian Pac J Cancer Prev*, 4,131-9.
- Boyer et al, 2005. *The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells : Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer*. Online, <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/52/4/673.full>. Diakses 23 Desember 2011.
- Budda S. et.al. 2011. Suppressive Effects of *Moringa oleifera* Lam Pod Against Mouse Colon Carcinogenesis Induced by Azoxymethane and Dextran Sodium Sulfate. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 12, 3221-3228
- Budi R.T., Widyarini S. 2010. *Dampak Induksi Karsinogenesis Glandula Mammariae dengan 7,12-dimetilbenz(a)antrasen terhadap Gambaran Histopatologis Lambung Tikus Sprague Dawley*. (<http://ejournal.unud.ac.id/abstrak/3.%20budi%20dan%20widyarini.pdf>, diakses tanggal 2 Oktober 2010).

- Buhler, D.R., Miranda, C. 2000. *Antioxidant Activities of Flavonoids*. Department of Environmental and Molecular Toxicology, Oregon State University
- Catuogno, M.S., Montenegro, M.A., Sánchez Negrette, M., Ramirez, G.V. 2011. Decrease of colonic dysplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in butyric acid supplemented rats. *Rev. vet.* 22: 1, 13–18. Online : http://vet.unne.edu.ar/revista/22-1%202011/RevVet_vol_22_nro_1_2011-03_Catuogno.pdf. Diakses 10 Februari 2013
- Cole S.R., Young G.P., Byrne D., Guy, J.R., & Morcom, J. 2002. Participation in Screening for Colorectal Cancer Based on a Faecal Occult Blood Test is Improved by Endorsement by the Primary Care Practitioner. *Journal of Medical Screening*, 9, 147-152.
- Das, N., Sikder K., Ghosh S., Fromenty B., Dey S. *Moringa oleifera* Lam. Leaf Extract Prevents Early Liver Injury and Restores Antioxidant Status in Mice Fed with High-fat Diet. *Indian Journal of Experimental Biology* Vol 50 pp. 404-412
- Fahey, J.W. 2005. *Moringa oleifera* : A review of the Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophylactic Properties Part 1. *Trees for Life Journal* 2005, 1 : 1 – 5
- GLOBOCAN. 2008. *Fact Stats World*. Online. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>. Diakses 9 Desember 2011
- GLOBOCAN. 2008. *Fact Stats Indonesia*. Online. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=360>. Diakses 9 Desember 2011
- Guevara AP, Vargas C, Sakurai H, et al. 1999. An Antitumor Promoter from *Moringa Oleifera* Lam. *Mutat Res.* 440:181-188
- Hickmann AW, Jaramillo RJ, Lechner JF, Johnson NF. 1994. α -particle-induced p53 Protein Expression in a Rat Lung Epithelial Cell Strain. *Cancer Research* 54, 5797-5800
- Humaidah, Edah. 2013. *Pengaruh Ekstrak Metanol Daun Moringa oleifera Terhadap Jumlah Ekspresi Cyclin D1 pada Jaringan Kolon Tikus Wistar yang Diinduksi DMBA*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya, Malang
- Integrated Taxonomic Information System, 2000. Online. http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=503874. Diakses 12 Desember 2011.
- Jerry DJ, Butel JS, Donehower LA, Paulson EJ, Cochran C, Wiseman RW, Medina D. 1994. Infrequent p53 Mutation in 7,12

dimethylbenz[α]anthracene-induced Mammary Tumors in BALB/c and p53 Hemizygous Mice. *Molecular Carcinogenesis* 9:175-183

Kaufmann, Y., Luo, S., Johnson, A., Babb, K., Klimberg, V.S. 2003. Timing of Oral Glutamine on DMBA-induced Tumorigenesis. *Journal of Surgery. Res.*, 111, 158--165.

Kong Dexin, Yanwen Z., Yamori T., Duan H., Jin M. 2011. Inhibitory Activity of Flavonoids Against Class I Phosphatidylinositol 3-Kinase Isoforms. *Molecules*, 16 : 5159-5167

Kumar, C.S. *et.al.* 2010. Hepatoprotective Activity of Leaves and Roots Extracts of *Moringa oleifera* Lam. *Int J Med Res.* 2010; 1(2): 90-93

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

Lamson Davis W., Matthew S. Brignall. 2000. Antioxidants and Cancer III : Quercetin. *Alternative Medicine Review*, 5, 3 :196-208

Li-Weber M. 2009. New Therapeutic Aspects of Flavones: the Anti Cancer Properties of Scutellaria and Its Main Active Constituents Wogonin, Baicalein and Bacalin. *Cancer Treat Rev.* 35: 57-68.

Lu X, Lane DP. 1993. Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or Ionizing radiation: Defects in chromosome instability syndromes?. *Cell*, Volume 75, Issue 4, 765-778. Online: <http://www.cell.com/retrieve/pii/009286749390496D>. Diakses 15 Februari 2013

Manoharan, S., *et.al.* 2009. *Chemopreventive Efficacy of Curcumin and Piperine During 7,12-dimethylbenz[α]anthracene-Induced Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis*, (Online). <http://smj.sma.org.sg/5002/5002a4.pdf>, diakses 12 Maret 2011.

Martin L. Price, Martin L. 2007. The Moringa Tree. *ECHO Technical Note* 1 : 1 – 6.

Miyata, M., M. Furukawa, K. Takahashi, F.J. Gonzales and Y. Yamazoe. 2001. Mechanism of 7,12- Dimethylbenz[α]anthracene-induced Immunotoxicity: Role of Metabolic Activation at the Target Organ. *Japan Journal of Pharmacology*, 86: 302-309.

Morimitsu Y., Hayashi K., Nakagawa Y., Horio F., Uchida K., Osawa T. 2000. Antiplatelet and Anticancer Isothiocyanates in Japanese Domestic Horseradish, Wasabi. *Biofactors*, 13(1-4) : 271-276.

Muluvi G.M., Sprent J.I., Soranzo N., Provan J., Odee D., Folkard G., McNicol J.W., Powell W. 1999. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Analysis of Genetic Variation in *M. oleifera* Lam. *Journal of Molecular Ecology* 1999, 8 : 463-470.

- Murakami, A., Kitazono, Y., Jiwajinda, S., Koshimizu, K., Ohigashi, H., Naizimin. A Thiocarbamate from the Leaves of *M. oleifera*, Holds a Strict Structural Requirement for Inhibition of Tumor-promoter-induced Epstein-Barr Virus Activation. *Planta Med.* 1998, 64, 319-323.
- Nakagawa, K; Kawagoe M. 2000. Differential Effects of Flavonoid Quercetin on Oxidative Damages Induced by Hydrophilic and Lipophilic Radical Generators in Hepatic Lysosomal Fractions of Mice. *Journal of Health Science.* 46: 509-512
- Paliwal R, Sharma V, Pracheta, Sharma S, Yadav S, Sharma SH. 2011. Antinephrotoxic Effect Of Administration Of Moringa Oleifera Lam In Amelioration Of Dmba-Induced Renal Carcinogenesis In Swiss Albino Mice. *Biol Med* 3: 25-35
- Parvathy,M., Umamaheswari,A., 2007. *Cytotoxic Effect of Moringa oleifera Leaf Extracts on Human Multiple Myeloma Cell Lines.* Ayya Acade Baby Nagar India. *Trends in Medical Reseach* 2 (1):44-50
- Patwardhan M.B, Samsa G.P, Michael M.A, Prosnitz R.G, Fisher D.A, Mantyh C.R, McCrory D.C. 2006. Cancer Care Quality Measures : Diagnosis and Treatment of Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 24 No 18s (June 20 Supplement): 16031
- Penwarden, Linda, Brigle, Kevin. 2004. Colorectal Cancer. Current Treatment and Future Directions. *OncologyNurse Practitioner, Massey Cancer Center at Virginia Commonwealth University.* Richmond. Virginia.
- Phang J.M., Poore C.M., Lopaczynska J., Yeh G.C. 1993. Flavonol-stimulated Efflux of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in Multidrug Resistant Breast Cancer Cells. *Cancer Res.*, 53, 5977-5981.
- Piao, Mei Jing *et.al.* 2011. *Antioxidant Effects of the Ethanol Extract from Flower of Camellia japonica via Scavenging of Reactive Oxygen Species and Induction of Antioxidant Enzymes.* Online, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3127137/>, diakses tanggal 23 Desember 2011.
- Roloff A., H. Weisgerber, U. Lang, B. Stimm. 2009. Moringa oleifera Lam. *Enzyklopädie der Holzgewächse, Handbuch und Atlas der Dendrologie* 40 : 1 – 6.
- Rubin C.E., Bronner M.P. 2003. Endoscopic Mucosal Biopsy. *Textbook of gastroenterology*, 4th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 2893–2946.
- Saha Dibyajyoti, Milan Hait. 2012. An Ontological Design: Two Stage Mouse Skin Carcinogenesis Induced By DMBA and Promoted By Croton Oil. *Asian J. Res. Pharm. Sci.* Vol. 2: Issue 1, Pg 01-03

- Saleem Rubeena. 1995. *Studies in the Chemical Constituents of Moringa oleifera Lam., and Preparation of Potential Biologically Significant Derivatives of 8-hydroxyquinoline*. Ph.D. thesis.H.E.J. Research Institute of Chemistry University of Karachi. Pakistan.
- Sharma, V., Joseph, C., Ghosh, S., et al. 2007. Kaempferol Induces Apoptosis in Glioblastoma Cells through Oxidative Stress. *Mol Cancer Ther* 6:2544-2553
- Siddhuraju, P., Becker, K. 2003. Antioxidant Properties of Various Solvent Extracts of Total Phenolic Constituents from Three Different Agroclimatic Origins of Drumstick Tree (*M. oleifera* Lam.) Leaves. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2144-2155
- Shindano, Chitundu K. 2008. Review.*M. oleifera – Food, Medicine and Industrial Products*.Department of Food Science and Technology, School of Agricultural Sciences. University of Zambia. Zambia
- Sreelatha S., Padma P.R. 2009. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Moringa oleifera Leaves in Two Stages of Maturity. *Plant Foods Hum Nutr* 64:303–311
- Todorova VK, Kauffmann Y, Luo S, Klimberg VS. 2006. Modulation of p53 and c-myc in DMBA-Induced Mammary Tumors by Oral Glutamine. *Nutrition and Cancer*, 54(2), 263-273
- Vousden KH, Lu X. 2002. Live or Let Die : the Cell's Response to p53. *Nat Rev Cancer* 2: 594-604. Online:<http://www.fundacion-barcelo.com.ar/oncologia-molecular/sesion%203/Bibliografia%20Sesion%203/d-%20Ignacio%20PalmeroEI%20gen%20TP53/Vousden%20KH%20Lu%20X%20%20Live%20or%20let%20die%20the%20cells%20response%20up%2053.pdf>. Diakses 23 Juli 2012
- Wei S, Kito K, Miyoshi A, Matsumoto S, Kauzi A, Aramoto T, Abe Y, Ueda N. 2002. Incidence of p53 and ras gene mutations in DMBA-induced rat leukemias. *J Exp Clin Cancer Res*. Sep;21(3):389-96. Online : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12385583>. Diakses 10 Februari 2013
- World Gastroenterology Organization (WGO). 2007. *Colorectal Cancer Screening*. Online.http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/en/pdf/guidelines/06_colorecta_cancer_screening_and_surveillance.pdf. Diakses 12 Desember 2011
- World Health Organization (WHO). 2000. *Classification of Tumours*. International Agency for Research on Cancer (IARC) Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. Online, http://www.iranpath.org/Books/Tumors_of_GI_WHO.pdf. Diakses 12 Desember 2011

LAMPIRAN

Lampiran 1. Test of Normality (Uni Normalitas Data)

Tests of Normality

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Persen_jumlah_ Kontrol Negatif	.283	4	.	.863	4	.272
sel Kontrol Positif	.250	4	.	.945	4	.683
Moringa 20 mg	.329	4	.	.895	4	.407
Moringa 40 mg	.283	4	.	.863	4	.273
Moringa 80 mg	.283	4	.	.863	4	.273

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 2. Test of Homogeneity of Variances (Uji Homogenitas Varian)

Test of Homogeneity of Variances

Persen_jumlah_sel

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.268	4	15	.894

Lampiran 3. Uji ANOVA

ANOVA

Persen_jumlah_sel

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	4	.000	3.801	.025
Within Groups	.001	15	.000		
Total	.001	19			

Lampiran 4: Post Hoc Test

Multiple Comparisons

Persen_jumlah_sel
Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Negatif	Kontrol Positif	-1.5000825000E-2*	.0047137709	.042	-.029556594	-.000445056
	Moringa 20 mg	-.0033358250	.0047137709	.952	-.017891594	.011219944
	Moringa 40 mg	-.000008250	.0047137709	1.000	-.014556594	.014554944
	Moringa 80 mg	-.000008250	.0047137709	1.000	-.014556594	.014554944
Kontrol Positif	Kontrol Negatif	.0150008250*	.0047137709	.042	.000445056	.029556594
	Moringa 20 mg	.0116650000	.0047137709	.149	-.002890769	.026220769
	Moringa 40 mg	.0150000000*	.0047137709	.042	.000444231	.029555769
	Moringa 80 mg	.0150000000*	.0047137709	.042	.000444231	.029555769
Moringa 20 mg	Kontrol Negatif	.0033358250	.0047137709	.952	-.011219944	.017891594
	Kontrol Positif	-.0116650000	.0047137709	.149	-.026220769	.002890769
	Moringa 40 mg	.0033350000	.0047137709	.952	-.011220769	.017890769
	Moringa 80 mg	.0033350000	.0047137709	.952	-.011220769	.017890769
Moringa 40 mg	Kontrol Negatif	.000008250	.0047137709	1.000	-.014554944	.014556594
	Kontrol Positif	-1.5000000000E-2*	.0047137709	.042	-.029555769	-.000444231
	Moringa 20 mg	-.0033350000	.0047137709	.952	-.017890769	.011220769
	Moringa 80 mg	.0000000000	.0047137709	1.000	-.014555769	.014555769
Moringa 80 mg	Kontrol Negatif	.000008250	.0047137709	1.000	-.014554944	.014556594
	Kontrol Positif	-1.5000000000E-2*	.0047137709	.042	-.029555769	-.000444231
	Moringa 20 mg	-.0033350000	.0047137709	.952	-.017890769	.011220769
	Moringa 40 mg	.0000000000	.0047137709	1.000	-.014555769	.014555769

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

Lampiran 5: Homogeneous Subsets

Jumlah_sel

Tukey HSD

Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Kontrol Negatif	4	.004999175	
Moringa 40 mg	4	.005000000	
Moringa 80 mg	4	.005000000	
Moringa 20 mg	4	.008335000	.008335000
Kontrol Positif	4		.020000000
Sig.		.952	.149

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

