

PENGARUH EKSTRAK METANOL DAUN *Moringa oleifera* TERHADAP
JUMLAH EKSPRESI CYCLIN D1 PADA JARINGAN KOLON TIKUS WISTAR
YANG DIINDUKSI DMBA

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum



Oleh :

EDAH HUMAIDAH
0910710062

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

PENGARUH EKSTRAK METANOL DAUN *Moringa oleifera* TERHADAP
JUMLAH EKSPRESI CYCLIN D1 PADA
JARINGAN KOLON TIKUS WISTAR YANG DIINDUKSI DMBA

Oleh:
Edah Humaidah
NIM: 0910710062

Telah diuji pada
Hari: Jum'at
Tanggal: 22 Februari 2013

Dan dinyatakan lulus oleh:
Penguji I

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

Penguji II/Pembimbing I

Penguji III/Pembimbing II

Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc
NIP. 19550201 198503 2 001

Dr.dr.Tinny Endang H.,Sp.PK (K)
NIP. 19521225 198002 2 001

Mengetahui:
Ketua Jurusan Kedokteran

Prof. Dr. dr. Teguh W. Sardjono, DMT&H, MSc, SpPark
NIP: 19520410 198002 1 001



KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT yang telah memberi petunjuk dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir dengan judul "Pengaruh Ekstrak Metanol Daun *Moringa Oleifera* terhadap Jumlah Ekspresi *Cyclin D1* Pada Jaringan Kolon Tikus Wistar yang Diinduksi DMBA.

Ketertarikan dalam pemilihan topik ini didasari pada tingginya angka kejadian kanker kolon yang menempati peringkat 3 dunia. Pengobatan yang aman dan efektif belum ditemukan sehingga usaha untuk menemukan obat dari sumber alam nabati terus dilakukan. Daun kelor (*Moringa oleifera*) merupakan salah satu tanaman yang diharapkan dapat digunakan sebagai obat herbal kanker kolon. Pengaruh daun kelor terhadap karsinogenesis pada kolon akan diteliti melalui ekspresi cyclin D1.

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

1. Dr.dr. Karyono M, SpPA, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Dr.dr. Retty Ratnawati,M.Sc, selaku pembimbing pertama yang dengan sabar membimbing dari awal hingga akhir sehingga saya dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
3. Dr.dr. Tinny Endang Hernowati,Sp.PK (K), selaku pembimbing kedua yang telah membimbing penulisan dan analisis data dan senantiasa memberi semangat sehingga saya dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
4. Dr.dr. Wisnu Barlianto, Msi.Med,SpA (K), sebagai penguji Tugas Akhir.
5. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB.
6. Para analis di laboratorium FAAL dan PA yang telah membantu saya dalam menyelesaikan penelitian ini.
7. Yang tercinta ayahanda Djuhanan dan ibunda Suhaemi, serta kakak Omah S. Rohaemah dan Aang B. Ahmad atas segala pengertian dan kasih sayangnya.
8. Sahabatku Banner's (Fitria Nurindro, Mayya Mumtaz Maharani, Firdah Zuniar Fadhilah dan Meidiana Pertiwi) atas segala semangat dan masukannya.
9. Teman-teman Tim Kelor atas kerjasamanya.
10. 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, 18 Februari 2013

Penulis

ABSTRAK

Humaidah, Edah. 2013. **Pengaruh Ekstrak Metanol Daun *Moringa Oleifera* Terhadap Jumlah Ekspresi *Cyclin D1* Pada Jaringan Kolon Tikus Wistar yang Diinduksi DMBA.** Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc (2) Dr.dr.Tinny Endang H.,Sp.PK (K)

Ekstrak daun *Moringa oleifera* telah diketahui sebagai bahan anti inflamasi, antioksidan dan anti kanker. *Cyclin D1* mempunyai peranan penting dalam proliferasi dan diferensiasi sel. Ekspresi *cyclin D1* yang abnormal telah diketahui berhubungan dengan perkembangan dan progresi kanker pada sejumlah jaringan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* terhadap jumlah ekspresi *cyclin D1* pada jaringan kolon tikus wistar yang diinduksi DMBA. Penelitian ini menggunakan metode eksperimental, dilakukan pada 20 ekor tikus wistar jantan yang dikelompokkan secara acak menjadi lima kelompok. Selama 45 hari kelompok pertama (kontrol negatif) diberi diet normal saja, pada kelompok kedua (kontrol positif) tikus diberi diet normal dan DMBA 10 mg/kgBB/hari. Sedangkan kelompok III-V diberi diet normal, DMBA 10 mg/kgBB/hari selama 45 hari dan ekstrak methanol daun kelor dengan dosis yang berbeda (20, 40, 80 mg/kgBB/hari) selama 60 hari kemudian. Jumlah ekspresi *cyclin D1* dihitung menggunakan metode imunohistokimia. Analisis data menggunakan metode One-Way ANOVA diikuti dengan uji Post Hoc Tukey, menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* mempunyai pengaruh yang signifikan terhadap ekspresi *cyclin D1* ($p<0.05$). Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* dapat menurunkan jumlah ekspresi *cyclin D1* pada jaringan kolon tikus wistar yang diinduksi 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA).

Kata Kunci: *cyclin D1*, DMBA, ekstrak metanol daun *Moringa oleifera*

ABSTRACT

Humaidah, Edah. 2013. **The effect of methanolic extract of *Moringa oleifera* leaves on cyclin D1 expression in colon tissue of rat which was induced by DMBA.** Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisor: (1) Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc (2) Dr.dr.Tinny Endang H.,Sp.PK (K)

The extract of *Moringa oleifera* leaves is known as antiinflammatory, antioxidant, and anticancer. Cyclin D1 plays important roles in cell proliferation and differentiation. Its abnormal expression has been linked to cancer development and progression in a number tissues. The objective of the study was to discover the effect of giving methanolic extract of *Moringa oleifera* leaves on the amount of cyclin D1 expression in colon tissue of rat which was induced by DMBA. This study used true experimental method, done on 20 male Wistar rats were randomly divided into five groups. For 45 days, the first group (negative control) were given a normal diet alone, the second group (positive control) mice were given a normal diet and DMBA 10 mg/kgBW/day. While the group III until V were given a normal diet, DMBA 10 mg/kgBW/day for 45 days and methanol leaf extract *Moringa oleifera* with different doses (20, 40, 80 mg/kgBW/day) for 60 days then. The amount of cyclin D1 expression was measured using immunohistochemistry method. Data analysis used the One-Way ANOVA method followed by Post Hoc Tukey Test, showed that methanolic extract of *Moringa oleifera* leaves has effect to amount of cyclin D1 expression significantly ($p<0.05$). The conclusion of this study is that methanolic extract of *Moringa oleifera* leaves decreases the amount of cyclin D1 expression in colon tissue of Wistar rats (*Rattus norvegicus*) induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA).

Keywords: cyclin D1, DMBA, methanolic extract of *Moringa oleifera* leaves



DAFTAR ISI

Halaman

Judul.....	i
Halaman Pengesahan	ii
Kata Pengantar.....	iii
Abstrak.....	iv
Abstract.....	v
Daftar Isi	vi
Daftar Gambar.....	viii
Daftar Tabel.....	ix
Daftar Lampiran.....	x
Daftar Singkatan.....	xi

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker Kolon.....	4
2.1.1 Definisi Kanker dan Kanker Kolon	4
2.1.2 Etiologi dan Epidemiologi.....	4
2.1.3 Faktor Resiko.....	5
2.1.4 Gejala dan Tanda Kanker Kolon.....	6
2.1.5 Patogenesis Kanker Kolon.....	7
2.1.6 Stadium Kanker Kolon.....	9
2.1.7 Diagnosis Kanker Kolon.....	9
2.1.8 Terapi Kanker Kolon.....	10
2.1.9 Pencegahan Kanker Kolon.....	11
2.2 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA).....	12
2.3 Proliferasi sel dan <i>Cyclin D1</i>	13
2.4 <i>Moringa oleifera</i>	14
2.4.1 Taksonomi <i>Moringa oleifera</i>	14
2.4.2 Penyebaran <i>Moringa oleifera</i>	14
2.4.3 Morfologi dan karakteristik <i>Moringa oleifera</i>	15
2.4.4 Kandungan <i>Moringa oleifera</i>	16
2.4.4.1 Senyawa Polifenolat.....	17
2.4.4.2 Quercetin.....	17
2.5 Hubungan antara <i>Moringa oleifera</i> , Kanker Kolon dan <i>Cyclin D1</i>	18

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep.....	22
3.2 Penjelasan Kerangka Konsep.....	23
3.3 Hipotesis Penelitian.....	25

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian.....	26
4.2 Binatang Coba.....	26
4.2.1 Binatang coba, Objek dan Teknik Randomisasi.....	26
4.2.2 Estimasi Jumlah Pengulangan.....	27
4.2.3 Kriteria Inklusi.....	27
4.2.4 Kriteria Eksklusi.....	28
4.3 Variabel Penelitian.....	28
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	28
4.5 Alat dan Bahan Penelitian.....	29
4.5.1 Alat.....	29
4.5.2 Bahan Penelitian.....	29
4.6 Definisi Operasional.....	30
4.7 Prosedur penelitian.....	31
4.7.1 Aklimatisasi.....	31
4.7.2 Induksi 7,12 dimethyl benz[<i>a</i>]anthracene	32
4.7.3 Perlakuan.....	32
4.7.3.1 Pemeliharaan.....	32
4.7.3.2 Pembedahan.....	32
4.7.4 Cara Pemeriksaan Mikroskop.....	33
4.8 Pengolahan dan Analisis Data.....	33

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian.....	35
5.2 Analisis Data.....	42

BAB 6 PEMBAHASAN

45

BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan	51
7.2 Saran	51

DAFTAR PUSTAKA

52

LAMPIRAN

59



DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1	Progresi Kanker Kolon.....	8
Gambar 2.2	Stadium Kanker Kolon	9
Gambar 2.3	<i>Moringa oleifera</i>	15
Gambar 2.4	<i>Wnt Canonical Pathway</i>	19
Gambar 5.1	Grafik Hubungan Antara Kelompok Perlakuan dan Rata-rata Kenaikan Berat Badan Tikus.....	36
Gambar 5.2	Potongan Gambaran Histologi Kolon Post-DMBA (Hari 45)	36
Gambar 5.3	Potongan Gambaran Histologi Kolon Post-DMBA (Hari 45)	37
Gambar 5.4	Potongan Gambaran Histologi Kolon (Hari 105).....	37
Gambar 5.5	Grafik Hubungan Antara Kelompok Perlakuan dan Rata-rata Jumlah <i>Cyclin D1</i>	39
Gambar 5.6	Potongan Gambaran Histologi Kolon Kontrol Negatif.....	39
Gambar 5.7	Potongan Gambaran Histologi Kolon Kontrol Positif.....	40
Gambar 5.8	Potongan Gambaran Histologi Kolon Perlakuan I.....	40
Gambar 5.9	Potongan Gambaran Histologi Kolon Perlakuan II.....	41
Gambar 5.10	Potongan Gambaran Histologi Kolon Perlakuan III.....	41
Gambar 6.1	Potongan Gambaran Histologi Kolon.....	46
Gambar 6.2	Progresi Kanker Kolon.....	47
Gambar 6.3	<i>Wnt Canonical Pathway</i>	48

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1	16
Tabel 2.2	17
Tabel 5.1	35
Tabel 5.2	38
Kandungan Daun Kelor.....
Aktivitas Antiradikal Senyawa Turunan Flavon dan Flavonol.....
Karakteristik Tikus Percobaan.....
Nilai Rata-rata Jumlah Ekspresi <i>Cyclin D1</i>



DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1	Imunohistokimia <i>Cyclin D1</i>	59
Lampiran 2	Tabel Rata-rata Jumlah Ekspresi <i>Cyclin D1</i>	61
Lampiran 3	Tabel Uji Normalitas.....	61
Lampiran 4	Tabel Uji Homeogenitas Varian.....	62
Lampiran 5	Tabel Uji ANOVA.....	62
Lampiran 6	Tabel Uji <i>Tukey HSD</i>	62
Lampiran 7	Tabel Uji <i>Homogenous Subsets</i>	64



DAFTAR SINGKATAN

Anova	: <i>Analysis of Variance</i>
APC	: <i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
Bcl 2	: <i>B-cell lymphoma 2</i>
Cdk	: <i>cyclin-dependent kinase</i>
DAB	: Diaminobenzidine
DMBA	: <i>7,12 dimethybenz α anthracene</i>
DNA	: Deoxyribonucleic acid
Dvl	: <i>cytoplasmic protein Disheveled</i>
FAP	: <i>Familial Adenomatous Polyposis</i>
Fz	: <i>transmembrane Frizzled</i>
GSK-3 β	: <i>Glycogen Synthase Kinase 3β</i>
HNPPCC	: <i>Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer</i>
IHK	: Imunohistokimia
LRP5/6	: <i>Lipoprotein Receptor-related Protein 5/6</i>
PAH	: <i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbon</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCNA	: <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
RCD	: <i>Randomized Completely Design</i>
Tcf/Lef	: <i>T cell factor and Lymphoid-enhancing factor</i>
TNM	: <i>Tumor-Node-Metastases</i>
TGF- β	: <i>Tumor Growth Factor – β</i>
Wnt	: <i>Wingless Integrated</i>

1.1 Latar Belakang

Salah satu bahan yang dapat menimbulkan kanker adalah DMBA (7,12-dimethylbenzen[a]anthracene) yang merupakan salah satu *polycyclic aromatic hydrocarbon* (PAH). PAH adalah komponen dari bahan petroleum dan debu batubara. Di alam, PAH ditemukan pada saat pembakaran bahan organik yang tidak sempurna (Ozdemir, et al, 2007). DMBA merupakan salah satu dari tiga produk degradasi PAH yang berpotensi sebagai bahan sitotoksik, mutagenik, agen imunosupresif dan karsinogen. PAH juga ditemukan pada makanan yang tercemar limbah industri, makanan yang tidak dimasak dengan sempurna dan makanan yang dimasak dengan suhu tinggi. Apabila makanan ini dikonsumsi maka beresiko terjadinya kanker (Philip, 2002; Norat et al, 2005).

Sel-sel kanker akan berkembang dengan cepat, tidak terkendali, dan akan terus berproliferasi, selanjutnya menyusup ke jaringan sekitarnya (*invasive*) dan terus menyebar melalui jaringan ikat, darah, serta menyerang organ-organ penting lainnya (Penwarden et al, 2004). Beberapa protein telah diketahui berfungsi dalam regulasi siklus sel. Kehilangan regulasi ini merupakan tanda utama kanker. Protein yang mengontrol siklus sel diantaranya adalah *cyclin* dan *cyclin-dependent kinase*. *Cyclin D1*, komponen subunit dari *cyclin-dependent kinase* (Cdk)-4 dan Cdk6, merupakan faktor pembatas progresi sel melalui fase gap pertama (G1) pada siklus sel (Baldin, 1993). Disregulasi dari *check point* siklus sel dan ekspresi berlebihan faktor pertumbuhan siklus sel seperti *cyclin D1* dan *cyclin-dependent kinase* (Cdk) berhubungan dengan tumorigenesis

(Diehl, 2002). Translokasi atau amplifikasi gen CCND1 (juga diketahui sebagai PRAD1 dan bcl-1 onkogen) dan diikuti dengan *overexpressi cyclin D1* telah didapatkan pada berbagai macam kanker pada manusia (Deane *et al.*, 2001).

Beberapa usaha pengobatan terhadap kanker telah dilakukan secara intensif, yaitu dengan pembedahan, kemoterapi dan radioterapi, namun belum mampu secara efektif menanggulangi kanker. Meskipun pengobatan dengan cara-cara tersebut cukup menolong penderita kanker yang terdeteksi dini dan belum mengalami metastasis (Ganiswara, 1995). Kegagalan yang sering terjadi dalam pengobatan kanker, utamanya melalui kemoterapi, dikarenakan rendahnya selektifitas anti kanker dan belum jelasnya proses karsinogenesis itu sendiri. Kendala lain yang dihadapi dalam pengobatan kanker adalah mahalnya biaya pengobatan. Berdasarkan hal-hal tersebut di atas, penelitian dan pengembangan obat kanker menjadi sangat penting untuk terus dilakukan (Susilowati dkk., 2007).

Salah satu mekanisme tubuh dalam mengatasi sel kanker yang terus berproliferasi adalah dengan menggunakan bahan – bahan antiproliferatif. *Moringa oleifera* memiliki banyak kandungan flavonoid yang dapat berfungsi sebagai anti mikroba, anti karsinogenesis, anti mutagenik, dan dapat menurunkan tekanan darah (Ayinde *et al.*, 2007, Dhawan dan Jain, 2005, Li-Weber, 2009, dan Nandakuma *et al.*, 2008). *Moringa oleifera* juga mengandung quersetin yang mempunyai efek antiproliferatif melalui kemampuannya dalam menunda siklus sel. Quercetin dilaporkan mampu menginduksi G2/M arrest pada beberapa *cell line* (Lepley *et al.*, 1996 cit Pan *et al.*, 2002).

Oleh karena itu penelitian ini dilaksanakan untuk mengetahui apakah ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* ini dapat menurunkan jumlah ekspresi *cyclin D1* pada jaringan kolon tikus wistar yang diinduksi DMBA.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang diambil oleh penulis adalah:

Apakah pemberian ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan berbagai dosis dapat menurunkan jumlah ekspresi *cyclin D1* pada jaringan kolon tikus wistar yang diinduksi DMBA?

1.3 Tujuan Penelitian

Membuktikan pemberian ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) berbagai dosis menurunkan jumlah ekspresi *cyclin D1* pada jaringan kolon tikus (*Rattus norvegicus*) wistar yang diinduksi DMBA.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Akademis :

- Menambah wawasan tentang manfaat kelor (*Moringa oleifera*), khususnya ekstrak metanol daun kelor.
- Mengetahui efek pemberian ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap jumlah ekspresi *cyclin D1* pada tikus wistar yang diinduksi DMBA.

2. Praktis :

- Sebagai dasar teori untuk pengembangan daun kelor (*Moringa oleifera*) sebagai alternatif pencegahan dan pengobatan kanker terutama kanker kolon.

2.1. Kanker Kolon

2.1.1. Definisi Kanker dan Kanker Kolon

Kanker adalah istilah umum untuk grup penyakit yang dapat menyerang bagian tubuh manapun . Istilah lainnya yang sering digunakan adalah tumor dan neoplasma. Satu hal yang bisa mendefinisikan kanker adalah adanya pertumbuhan yang cepat dari sel abnormal melebihi batasnya, dan kemudian dapat menginvasi bagian di sekitarnya dan menyebar ke organ lainnya. Proses ini disebut metastasis. Metastase adalah penyebab utama kematian karena kanker (WHO, 2012).

Kanker kolon adalah suatu penyakit dimana sel kanker ganas terbentuk di jaringan kolon. Tumor dapat berkembang di dalam dinding kolon dan atau jaringan rektum yang disebut polip. Tumor tersebut dapat jinak maupun ganas. Polip jinak dapat berkembang jadi polip adenomatous dan faktanya, sekitar 85% kanker kolon berkembang dari polip adenomatous (American Cancer Society, 2005).

2.1.2. Etiologi dan Epidemiologi

Penyebab kanker kolon tidak diketahui dengan pasti, tetapi beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengetahui hal ini. Dari hasil penelitian telah ditemukan adanya mutasi beberapa gen berbeda dapat menyebabkan kanker



kolon. Beberapa mutasi DNA bisa diteruskan dari generasi ke generasi yang disebut mutasi diwariskan dan ada mutasi yang terjadi selama hidup tetapi tidak diteruskan disebut mutasi didapat. Mutasi didapat ini yang paling sering terjadi. Ada beberapa gen yang terlibat baik di mutasi herediter maupun didapat (American Cancer Society, 2011).

Pada tahun 2002 terdapat lebih dari 1 juta insiden kanker kolorektal dengan tingkat mortalitas lebih dari 50%. 9,5 persen pria penderita kanker terkena kanker kolorektal, sedangkan pada wanita angkanya mencapai 9,3 persen dari total jumlah penderita kanker (Depkes, 2006). Perkiraan insiden kanker di Indonesia adalah 100 per 100.000 penduduk. Namun, hanya 3,2% dari kasus kanker yang baru mencari perawatan di Rumah Sakit (WHO, 2003). Dewasa ini kanker kolorektal telah menjadi salah satu dari kanker yang banyak terjadi di Indonesia, data yang dikumpulkan dari 13 pusat kanker menunjukkan bahwa kanker kolorektal merupakan salah satu dari lima kanker yang paling sering terdapat pada pria maupun wanita (Soeripto, 2003).

2.1.3. Faktor Resiko

Studi epidemiologi menunjukkan ada beberapa hal yang merupakan faktor resiko kanker kolon, di antaranya adalah sebagai berikut:

a. Usia

Usia dewasa muda dapat terjadi kanker kolon, namun kesempatan terjadinya kanker kolon meningkat setelah usia 50 (American Cancer Society, 2011).

b. Jenis Kelamin

Pria lebih banyak mengidap kanker kolon dibanding dengan wanita (Jemal *et al.*, 2008).

c. Etnik dan ras

Dari semua ras yang ada di Amerika insiden dan mortalitas kanker kolon tertinggi pada ras Afrika-Amerika. Sedangkan etnis yang paling beresiko terkena kanker kolon adalah etnis Yahudi Eropa Timur (American Cancer Society, 2011).

d. Riwayat keluarga

Secara epidemiologis, kurang lebih 10% kasus kanker kolon berhubungan dengan riwayat keluarga. Contoh mutasi genetik yang dapat menyebabkan kanker kolon adalah *familial adenomatous polyposis* (FAP) dan *hereditary non-polyposis colorectal cancer* (HNPCC) (CDC, 2009).

e. Merokok

Perokok memiliki resiko lebih tinggi terhadap berkembangnya polip adenoma dan adenoma berkelanjutan dibanding mereka yang tidak merokok (Botteri *et al.*, 2008; Heavey, 2004).

f. Diet

Konsumsi daging merah dan daging yang diproses misalnya *hot dog* dapat meningkatkan resiko kanker kolon (American Cancer Society, 2011).

2.1.4. Gejala dan Tanda Kanker Kolon

- Perubahan kebiasaan usus, seperti diare, konstipasi, perubahan konsistensi feses, yang berlangsung lama.
- Perasaan ingin buang air besar namun tidak hilang-hilang.

- Pendarahan rektal (*hemorrhoid*), feses berwarna gelap atau darah pada feses (*melena*). Meski demikian seringkali feses terlihat normal.
- Nyeri abdomen / *cramping*.
- Merasa lemas dan mudah lelah.
- Kehilangan berat badan tanpa diinginkan.

(American Cancer Society, 2011)

2.1.5. Patogenesis Kanker Kolon

Sebagian besar (98%) kanker di usus besar adalah adenokarsinoma.

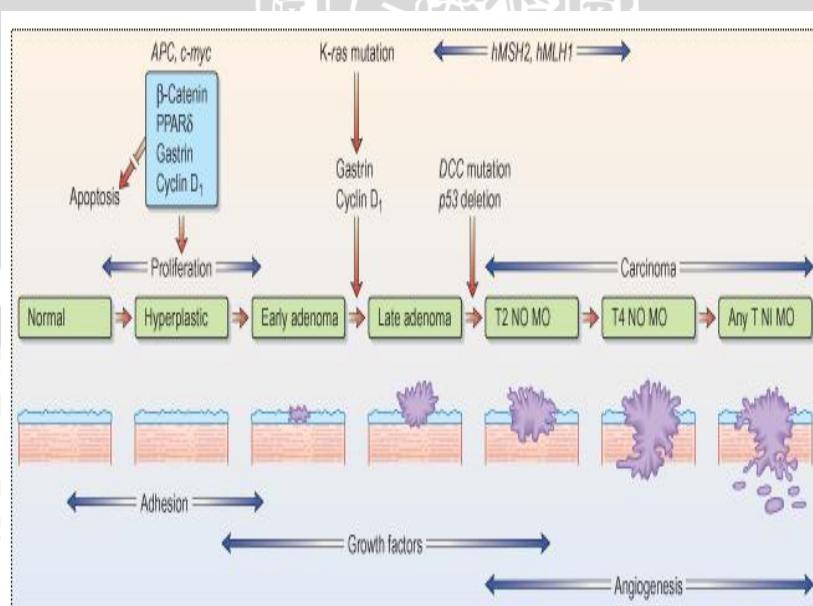
Terdapat dua jalur pembentukan kanker kolon yang secara patogenetis berbeda karena gen yang terlibat dalam mekanisme timbulnya mutasi berbeda. Namun, keduanya melibatkan akumulasi mutasi yang bertahap. Jalur pertama, disebut jalur APC/ β -catenin, ditandai dengan instabilitas kromosom yang menyebabkan akumulasi bertahap mutasi di serangkaian onkogen dan gen penekan tumor. Evolusi molekular kanker kolon sepanjang jalur ini dapat dibedakan. 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 (Robbins *et al.*, 2004). Proses genetik yang berperan di jalur ini adalah:

1. Hilangnya fungsi gen penekan tumor APC. Hal ini merupakan kejadian paling awal dalam pembentukan adenoma. Hilangnya fungsi APC menyebabkan β -catenin menumpuk sehingga dapat mendorong proliferasi sel. Mutasi APC terdapat pada 80% kanker kolon sporadik.
2. Mutasi K-RAS. RAS yang bermutasi menjadi aktif (terikat dengan guanosin trifosfat) dapat mencegah apoptosis.



3. Delesi 18q21. Tiga gen yang terletak di kromosom ini adalah DCC, DPC4/SMAD4, dan SMAD2. DPC4/SMAD4 dan SMAD2 mengkode komponen-komponen jalur sinyal TGF- β (berfungsi menghambat siklus sel) sehingga delesi 18q21 menyebabkan sel tumbuh tak terkendali.
4. Hilangnya TP53. Jarang ditemukan pada adenoma karena terjadi belakangan pada karsinoma kolon (Robbins *et al.*, 2004).

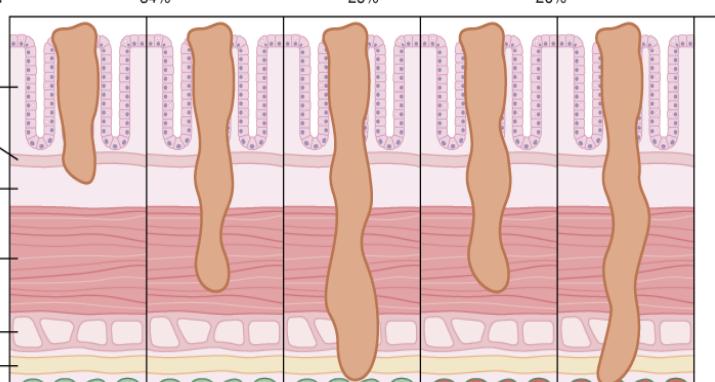
Jalur kedua ditandai dengan lesi genetic di *DNA mismatch repair genes* yang terjadi pada 10-15% kanker sporadik. Mutasi herediter satu dari lima gen perbaikan ketidakcocokan DNA (MSH2, MSH6, MLH1, PMS1, dan PMS2) menyebabkan karsinoma kolon nonpoliposis herediter (HNPCC). Instabilitas mikrosatelit (MSI) terjadi pada semua gen, termasuk yang berperan dalam pengendalian pertumbuhan sel sehingga pada akhirnya dapat menyebabkan kanker kolon (Robbins *et al.*, 2004).



Gambar 2.1. Progresi Kanker Kolon (Kumar dan Clark,2005)

2.1.6. Stadium Kanker Kolon

Stadium pasti hanya dapat dilakukan setelah operasi telah dilakukan dan laporan patologi ditinjau. Sistem stadium yang paling umum adalah sistem TNM (tumor/node/metastasis). Sistem TNM memberikan gambaran stadium berdasarkan pada tiga kategori. "T" menunjukkan derajat invasi pada dinding usus, "N" tingkat keterlibatan node limfatik, dan "M" derajat metastasis. Tahap yang lebih luas dari kanker biasanya dikutip sebagai angka I, II, III, IV berasal dari nilai TNM dikelompokkan melalui prognosis (lihat gambar 2.2); jumlah yang lebih tinggi menunjukkan kanker lebih maju dan kemungkinan hasil yang buruk.

Stage	Staging of colorectal cancer					
	T ₁	T ₂	T ₃	N ₁	N ₂	M
Extent of tumor	No deeper than submucosa	Not through muscularis	Through muscularis	1-3 lymph node metastases	≥4 lymph node metastases	Distant metastases
5-year survival	>95%	>90%	70-85%	50-70%	25-60%	<5%
Stage at presentation	Colon Rectal	23% 34%	31% 25%	26% 26%	26% 15%	20%
						
Mucosa						
Muscularis mucosa						
Submucosa						
Muscularis propria						
Serosa						
Fat						
Lymph nodes						

Gambar

2.2. Stadium Kanker Kolon (Fauci et al., 2008)

2.1.7. Diagnosis Kanker Kolon

Diagnosis termasuk *screening* untuk mendeteksi kanker kolon. *Screening* termasuk :

- Riwayat Keluarga



- Barium enema kontras ganda setiap 5 tahun
 - Kolonoskopi total setiap 10 tahun untuk orang yang beresiko (jika pemeriksaan yang lain negatif).
 - Biopsi diperlukan untuk memastikan diagnosis.
- (Siregar, 2008)

2.1.8. Terapi Kanker Kolon

Terapi utama yang digunakan untuk penatalaksanaan kanker kolon adalah:

- Pembedahan

Pembedahan kuratif harus mengeksisi dengan batas yang luas dan maksimal regional lymphadenektomi sementara mempertahankan fungsi dari kolon sebisanya. Untuk lesi diatas rektum, reseksi tumor dengan minimum margin 5 cm bebas tumor (Casciato DA, 2004).

- Terapi radiasi

Radiasi sebelum maupun setelah pembedahan mampu mengurangi tumor dalam batas lokal. Pasien dengan kanker rektal tahap II dan III memiliki resiko tinggi penyebaran tumor lebih lanjut, lokal maupun sistemik, sehingga terapi tambahan seperti radioterapi dan kemoterapi diperlukan (Patwardhan *et al.*, 2006).

- Kemoterapi

Pasien dengan kanker kolon pada tahap III tanpa kontraindikasi dianjurkan untuk melakukan kemoterapi setelah pembedahan untuk mencegah penyebaran kanker. Kemoterapi juga bermanfaat pada pasien dengan kanker rektal pada tahap II dan III. Kemoterapi juga dapat menjadi terapi

paliatif (untuk meningkatkan harapan hidup) pada tahap IV (Patwardhan *et al.*, 2006).

2.1.9. Pencegahan Kanker Kolon

- Diet

The National Research Council telah merekomendasikan pola diet pada tahun 1982. Rekomendasi ini diantaranya : (a) menurunkan lemak total dari 40% ke 30% dari total kalori, (b) meningkatkan konsumsi makanan yang mengandung serat, (c) membatasi makanan yang diasinkan, diawetkan dan diasapkan, (d) membatasi makanan yang mengandung bahan pengawet, (e) mengurangi konsumsi alkohol (Schwartz, 2005).

- Non Steroid Anti Inflammation Drug (NSAID)

Penelitian pada pasien familial poliposis dengan menggunakan NSAID sulindac dosis 150 mg secara signifikan menurunkan rata-rata jumlah dan diameter dari polip bila dibandingkan dengan pasien yang diberi placebo. Ukuran dan jumlah dari polip bagaimanapun juga tetap meningkat tiga bulan setelah perlakuan dihentikan. Data lebih jauh menunjukkan bahwa aspirin mengurangi formasi, ukuran dan jumlah dari polip; dan menurunkan insiden dari kanker kolon, baik pada kanker kolon familial maupun non familial. Efek protektif ini terlihat membutuhkan pemakaian aspirin yang berkelanjutan setidaknya 325 mg perhari selama 1 tahun (Casciato DA, 2004).

- *Hormon Replacement Therapy (HRT)*

Penelitian oleh the Nurses Health Study yang melibatkan partisipan sebanyak 59.002 orang wanita postmenopouse menunjukkan hubungan antara pemakaian HRT dengan kanker kolon dan adenoma. Pemakaian

HRT menunjukkan penurunan risiko untuk menderita kanker kolon sebesar 40%, dan efek protektif dari HRT menghilang antara 5 tahun setelah pemakaian HRT dihentikan (Devita *et al*, 2001).

2.2. 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)

Senyawa 7,12-dimetilbenz (α) antrasen (DMBA) yang mempunyai 4 cincin benzene termasuk dalam tujuh *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* (PAH) yang dapat menyebabkan kanker pada manusia (Lukitaningsih dan Noegrohati, 2000). Kontaminasi DMBA biasa terjadi melalui makanan atau peroral, inhalasi maupun kontak kulit (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1995). Dampak paparan kronis DMBA induksi kanker dapat menyebabkan perubahan berupa hiperplasia dan reaksi radang pada saluran pencernaan. Perubahan yang terjadi diduga merupakan lesi prakanker pada saluran pencernaan (Budi dan Widyarini, 2010).

Karsinogen kimiawi DMBA mampu menginduksi terjadinya kanker pada glandula mammae hewan coba dengan histopatogenesis yang mirip dengan histopatogenesis yang terjadi pada manusia (Meiyanto *et al.*, 2007; Russo dan Russo, 1996). Metabolit aktif dari DMBA akan berikatan dengan DNA sel epitel (DNA *adduct*), selanjutnya ikatan dengan DNA akan turun hingga 50% 16 jam pasca paparan dengan DMBA. Namun demikian, apabila paparan DMBA dilakukan terus menerus selama 42 hari, maka akan terjadi ikatan yang menetap antara metabolit aktif DMBA dan DNA yang akan memicu munculnya kanker (Van Nostrand Reinhold Co, 1981).

2.3. Proliferasi sel dan *Cyclin D1*

Proliferasi sel dalam keadaan normal hanya terjadi bila badan membutuhkan, misalnya ada sel-sel yang perlu diganti karena mati atau rusak. Sedangkan sel kanker akan membelah diri meskipun tidak diperlukan, sehingga terjadi sel-sel baru yang berlebihan yang tidak memiliki daya atur. Jika berhenti membelah, sel kanker melakukannya pada sembarang titik dalam siklusnya, bukan pada *checkpoint* normal saja. Di samping itu, sel kanker dapat terus membelah secara tidak terbatas jika sel tersebut diberi pasokan nutrien secara terus-menerus (Mulyadi, 1997).

Cyclin D1 merupakan protein yang dikode oleh gen CCND1 yang berlokasi di kromosom 11q13. *Cyclin D1* berfungsi sebagai promotor proliferasi seluler. *Cyclin D1* merupakan sensor utama dan integrator sinyal ekstraselular pada siklus sel fase mid-G1. Secara biokimia *cyclin D1* berfungsi sebagai subunit regulator CDK4, CDK6, fosforilasi pRb, sequestrasi p27. Banyak sinyal onkogenik yang menginduksi ekspresi *cyclin D1* dan melakukannya melalui urutan DNA yang berbeda dalam promotor *cyclin D1* termasuk Ras, Src, ErbB2, β-catenin, sinyal onkogenik transduser dan aktivator transkripsi (STATS), khususnya onkogen penting dalam transformasi sel manusia (Fu et al., 2004).

Penyimpangan genetik dalam regulasi sirkuit yang mengatur transit melalui fase G1 dari siklus sel sering terjadi pada kanker manusia, dan overekspresi *cyclin D1* adalah salah satu perubahan yang paling umum diamati. Salah satu model menunjukkan bahwa overekspresi *cyclin D1* dapat berfungsi sebagai onkogen yang melewati fungsi regulasi siklus selnya. *Cyclin D1* diperkuat dan / atau diekspresikan dalam substansial proporsi tumor manusia

yang berbeda. Peningkatan berlebihan *cyclin D1* terjadi relatif dini selama tumorigenesis (Fu *et al.*, 2004).

2.4. *Moringa oleifera*

2.4.1. Taksonomi *Moringa oleifera*

Taksonomi *Moringa oleifera* atau tanaman kelor (Hidayat, 2006)

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

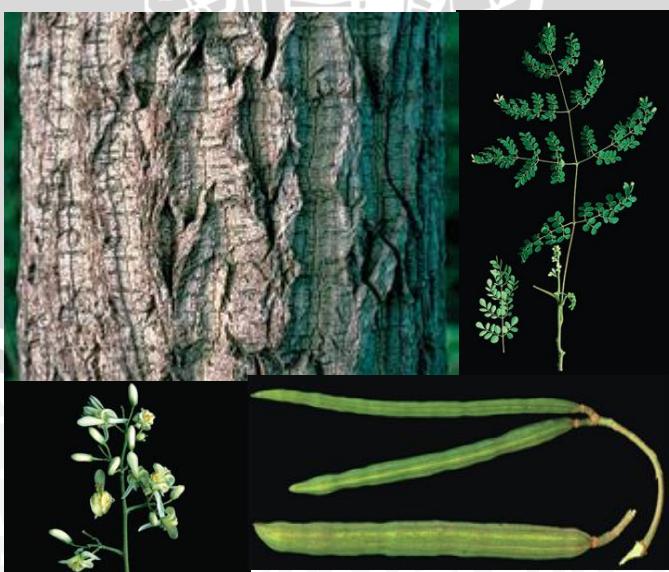
2.4.2. Penyebaran *Moringa oleifera*

Tanaman kelor berasal dari kaki gunung Himalaya bagian Asia Selatan mulai dari timur laut Pakistan sampai utara West Bengal State di India dan timur laut Bangladesh. Tanaman kelor biasa ditemukan di tanah aluvial atau di sekitar sungai. Tanaman kelor tumbuh pada ketinggian 1400m di atas permukaan laut. (Parrotta, 2009). Karena kecepatan tumbuhnya yang sangat tinggi dan juga manfaatnya di bidang kesehatan dan industri, maka daun kelor (*Moringa oleifera*)

telah banyak dibudidayakan di negara-negara tropis, termasuk di Indonesia (Fahey, 2005).

2.4.3. Morfologi dan karakteristik *Moringa oleifera*

Kelor termasuk jenis tumbuhan perdu yang dapat memiliki ketinggian batang 10 -12 meter. Merupakan tumbuhan yang termasuk jenis batang berkayu (Parrotta, 2009). Daunnya berbentuk bulat telur (oval) dengan ukuran kecil-kecil, bersusun majemuk dalam satu tangkai. Pohon kelor berdaun tidak terlalu lebat. Bunga kelor berwarna putih kekuning-kuningan dan tudung pelepas bunganya berwarna hijau (Jonni dkk.,2008). Buah kelor berbentuk segitiga memanjang sekitar 20-50 cm, tetapi bisa mencapai panjang 1 meter atau lebih dan 2-2,5cm lebarnya. Satu polong kelor biasanya mengandung sampai 26 biji kelor, berwarna hijau gelap selama perkembangannya dan membutuhkan waktu sekitar 3 bulan untuk dewasa setelah berbunga. Setelah matang warnanya akan berubah menjadi coklat. Biji kelor diameternya berukuran sekitar 1cm. Berat biji kelor berbeda-beda tiap varietas, beratnya antara 3000-9000 per kilogram (Parrotta, 2009).



Gambar 2.3 *Moringa oleifera* (Parrotta, 2009)

2.4.4. Kandungan *Moringa oleifera*

Daun kelor mengandung alkaloid moringin, moringinan, dan pterigospermin. Gom mengandung arabinosa, galaktan, asam glukonat, dan ramnosa. Bijinya mengandung asam palmitat, streatar, linoleat, olleat, dan lignoserat (Puslitbanghorti, 2011).

Menurut penelitian Kasolo *et al.*, daun kelor mengandung *Gallic tannins*, *Catechol tannins*, *Coumarins*, *Steroids dan triterpenoids*, *Flavonoids*, *Saponins*, *Anthraquinones*, *Alkaloids*, dan *Reducing sugar*. Seperti pada tabel 2.1.

Tabel 2.1 Kandungan Daun Kelor

Table 2. Phytochemicals present in *M. oleifera* leaves.

Phytochemical	Ether extract	Ethanol extract	Water extract
Gallic tannins	+	+	++
Catechol tannins	+	-	++
Coumarins	-	-	-
Steroids and triterpenoids	+++	++	++
Flavonoids	++	++	++
Saponins	+	+	++
Anthraquinones	+	++	+++
Alkaloids	+	-	++
Reducing sugars	-	++	++

Key -: not detected; +: present in low concentration; ++: present in moderate concentration; +++: present in high concentrations.

Jaringan dari berbagai varietas *Moringa oleifera* telah dianalisa dan mengandung banyak flavonoid diikuti 45 antioksidan lainnya. Flavonoid diabsorbsi cepat dan bertahan dengan stabil dalam cairan lumen usus. Flavon (2-fenil-4H-1-benzopyran-4-one) yang merupakan anggota flavon berperan sebagai penghambat proliferasi dan menginduksi apoptosis pada sel-sel kanker kolon dalam aktivasi caspase (Erhart *et al*, 2005). Di samping itu, kaempferol dan Quercetin memiliki aktivitas antiradical yang lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa flavonol lainnya. (Bennett *et al.*, 2003).

Tabel 2.2 Aktivitas antiradikal senyawa turunan flavon dan flavonol(Bennett *et al*, 2003)

No	Senyawa flavon/flavonol	Aktivitas antiradikal (% A)
1	Kaempferol	93.5
2	Galangin	91.8
3	Quercetin	89.8
4	Morin	96.5
5	Robinetin	82.3
6	Fisetin	79.0
7	3-hidroksiflavon	66.0
8	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

2.4.4.1. Senyawa Polifenolat

Senyawa flavonoid adalah senyawa polifenol alam yang dalam tumbuhan.

Flavonoid mempunyai potensi sebagai bahan antioksidan alami. Senyawa flavonoid terdiri atas beberapa jenis, tergantung pada tingkat oksidasi dari rantai propan dari sistem 1,3-diarilpropan. Dalam hal ini, flavon mempunyai tingkat oksidasi yang terendah sehingga senyawa ini dianggap sebagai senyawa induk dalam tatanama senyawa-senyawa turunan flavon (Sari dkk., 2011).

2.4.4.2. Quercetin

Quercetin (3,3',4',5,7 pentahidroksiflavon) merupakan golongan flavonoid, dilaporkan menunjukkan beberapa aktivitas biologi. Aktivitas ini dikaitkan dengan sifat antioksidan quercetin, antara lain karena kemampuan menangkap radikal bebas dan spesi oksigen reaktif seperti anion superokida dan radikal hidroksil (Morikawa *et al.*, 2003; Schmalhausen *et al.*, 2007).

Quercetin dapat menurunkan regulasi secara nyata ekspresi *cyclin D1* dan survivin pada sel kanker kolon SW480 baik lever mRNA maupun protein.

Mekanisme antitumor dari quercetin mungkin berhubungan dengan menghambat ekspresi cyclin D1 dan survivin melalui *Wnt/β-catenin signaling pathway* (Shan, et al., 2009)

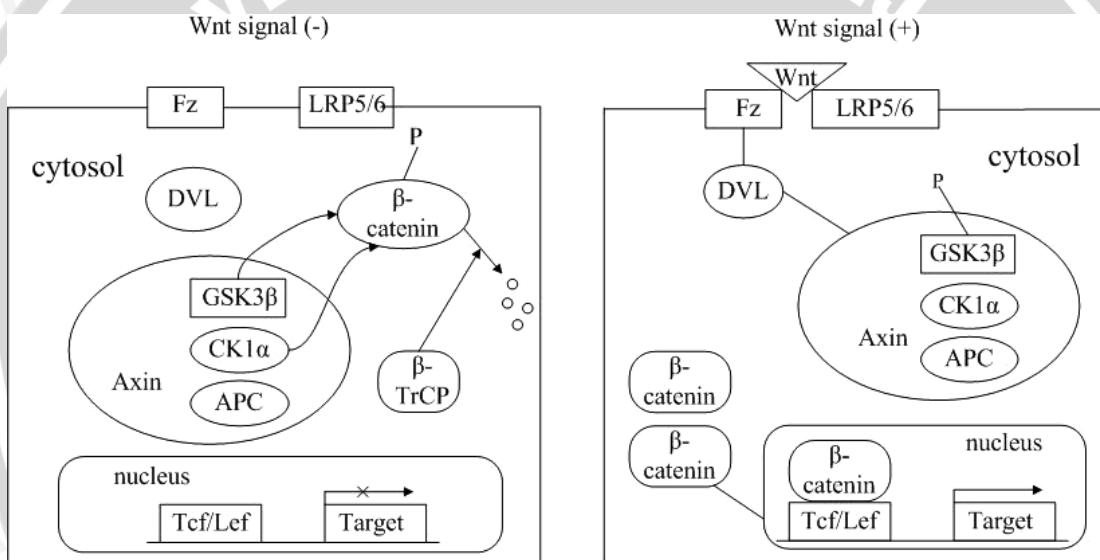
2.5 Hubungan antara *Moringa oleifera*, Kanker Kolon dan *Cyclin D1*

Sebelum menjadi karsinoma kolon, terjadi beberapa tahapan yang melibatkan adenoma terlebih dahulu. Sel normal akan mengalami hiperplastik, lalu terjadi adenoma awal dan akhir. Setelah proses ini, barulah terjadi karsinogenesis. Proses karsinogenesis diawali dengan invasi ke submukosa dan muskularis propria, lalu tumor menginvasi serosa dan secara langsung ke organ lain. Kemudian tumor dapat menyerang limponodi regional, dan pada akhirnya masuk pada tahap yang paling ganas, yaitu apabila tumor mengalami metastasis. Sedangkan proliferasi sel kanker kolon banyak terjadi pada tahapan normal ke hiperplastik lalu ke adenoma awal. Ini dikarenakan pada tahap ini terjadi jalur Wnt (Kumar dan Clark, 2005).

Cyclin D1 merupakan sensor kunci dan *integrator* sinyal ekstraselular pada siklus sel fase mid-G1. *Cyclin D1* diperkuat dan / atau diekspresikan dalam substansial proporsi tumor manusia yang berbeda. Peningkatan berlebihan *cyclin D1* terjadi relatif dini selama tumorigenesis (Fu et al., 2004).

Wnt adalah salah satu jalur biokimia yang terjadi pada CSC (*cancer stem cell*). Wnt merupakan kelompok *cysteine* yang menyekresikan glikoprotein dalam jumlah besar. Ada 19 gen dalam keluarga gen Wnt (Sidow, 1992). Gen ini membutuhkan arahan untuk membuat protein yang sama yang berhubungan dengan jalur *signaling* pada tubuh. Beberapa protein Wnt spesifik pada sel dan jaringan tertentu. Disregulasi pada *signaling* Wnt/β-catenin berperan pada tahap

awal karsinogenesis kolorektal. Protein APC yang berperan dalam tumor suppressor protein dapat menurunkan aktivasi transkripsi sel yang dimediasi Wnt/β-catenin. Namun, mutasi APC dapat menginaktivasi tumor suppressor gen sehingga mampu menginisiasi kanker kolorektal dan protein yang dihasilkannya dapat menghilangkan fungsi penurunan *signaling* Wnt yang normal. Kemudian terjadilah kanker kolon. Pada tahap yang lebih lanjut lagi, mutasi β-catenin pada daerah yang terfosfolirasi secara signifikan terdeteksi pada kanker kolon (Morin *et al.*, 1997).



Gambar 2.4. Wnt canonical pathway (Xueling dan Wang, 2010)

Wnt signaling pathway terdiri dari dua macam jalur, yaitu jalur “canonical” (β -catenin *dependent*) dan “noncanonical” (β -catenin *independent*). Di sini lebih dibahas mengenai jalur canonical karena bergantung dengan β -catenin. Pada keadaan ligan Wnt tidak berikatan dengan reseptornya, β -catenin sitoplasmik didegradasi oleh kompleks destruksi (Axin, GSK-3 β , CK1 α , dan APC). Pada kompleks ini, Axin berperan sebagai protein kerangka, di mana APC (adenomatous polyposis coli), GSK-3 β (glycogen synthase kinase 3 β), dan CK1 α (casein kinase 1 α) berikatan pada Axin untuk memfasilitasi fosforilasi β -catenin

pada 45serine (oleh kinase CK1 α dan 41'treonine) dan 37',33'serine (oleh GSK-3 β) (Rubinfeld *et al.*, 1996 ; Peifer, 1997). Pada dasarnya, fosforilasi β -catenin dikenali oleh β -transducin-repeat-containing protein (β -TrCP) dan didegradasi dengan konstan melalui jalur ubiquitin-proteasome. *Signaling* Wnt diaktivasi melalui ligasi Wnt ke reseptor permukaan sel dimerik respektif yang memiliki tujuh protein *transmembrane frizzled* (Fz) dan lipoprotein receptor-related protein 5/6 (LRP5/6) kepadatan rendah. Melalui ligasi dengan reseptor ini, *cytoplasmic protein disheveled* (Dvl) dilibatkan, difosforilasi, dan diaktivasi. Aktivasi Dvl menginduksi pelepasan GSK-3 β dari kompleks destruksi dan menyebabkan inhibisi fosforilasi β -catenin. Kemudian, fosforilasi dan degradasi β -catenin diinhibisi sebagai akibat dari inaktivasi kompleks desktruksi. Selanjutnya, β -catenin terstabilisasi mengalami translokasi ke nukleus. β -catenin dalam nukelus merupakan efektor yang paling baik, berikatan dengan faktor transkripsi Tcf/Lef (*T cell factor and lymphoid-enhancing factor*) sehingga membentuk kompleks β -catenin/Lef/Tcf (Xueling dan Wang, 2010). Kompleks ini mengatur transkripsi beberapa gen yang berperan dalam proliferasi, deferensiasi, keberlangsungan hidup, dan apoptosis, misalnya c-myc dan cyclin D (He *et al.*, 1998; Tetsu dan McCormick, 1999). Proliferasi sel yang semakin banyak dan tidak terkontrol menyebabkan kanker kolon (Xueling dan Wang, 2010).

Di dalam daun *Moringa oleifera* terdapat antioksidan, yaitu flavonoid. Komponen yang paling banyak dari flavonoid ini adalah quercetin dan kaempferol (Pace, 2004).. Quercetin biasanya digunakan untuk antiinflamasi dan antiaktivitas karsinogenik (Russo, 2007). Quercetin melawan *signaling* β -catenin/Tcf pada sel SW480. Quercetin menginhibisi aktivitas transkripsi β -catenin/Tcf pada sel SW480 dan juga pada HEK293 secara transien dengan membentuk mutasi aktif

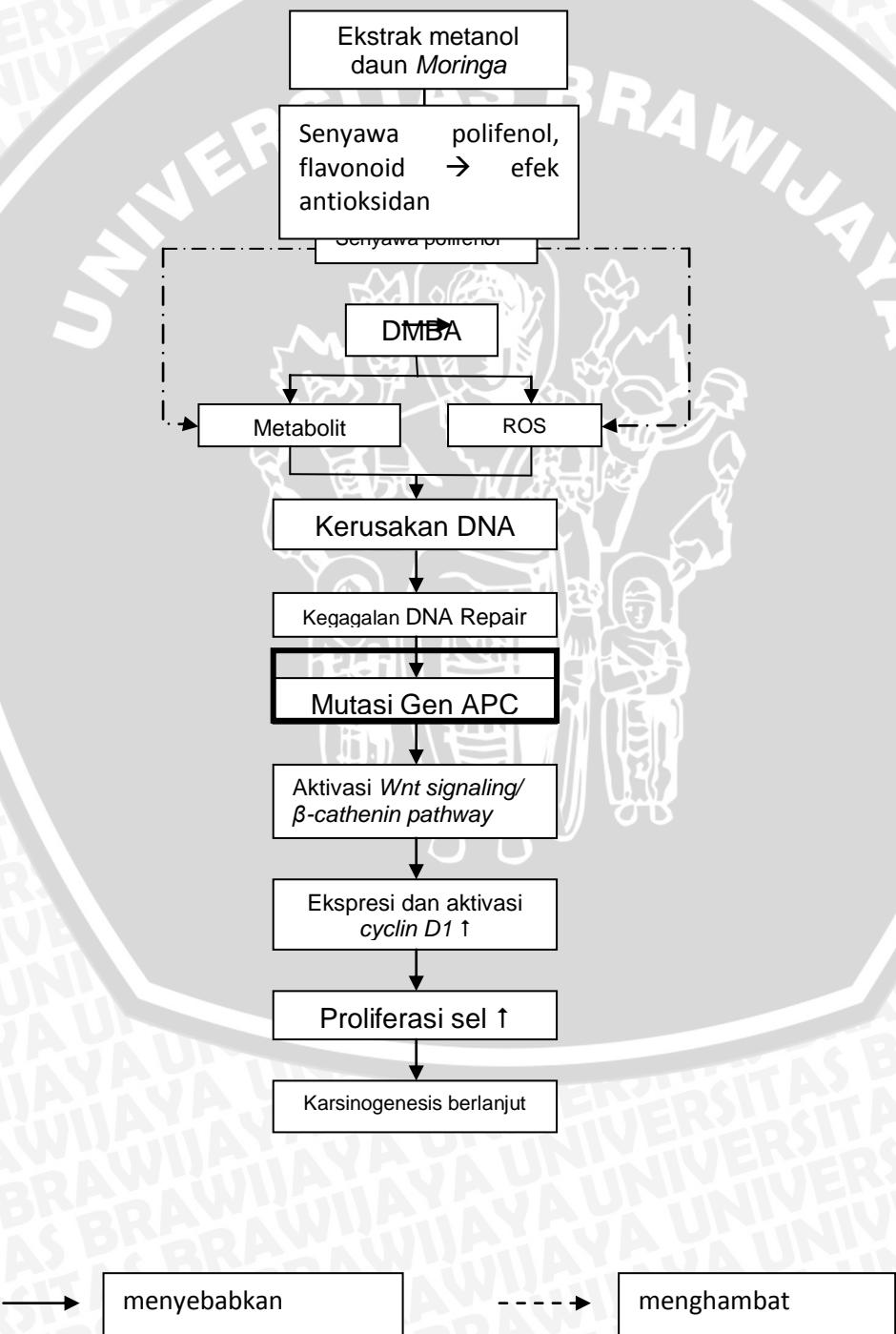
gen β -catenin. Quercetin adalah inhibitor ikatan β -catenin dengan Tcf yang sangat baik dan menurunkan aktivasi β -catenin karena penurunan inti β -catenin. Dengan pemberian ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) yang mengandung quercetin dalam jumlah cukup tinggi, diharapkan ikatan β -catenin/Tcf dapat dihambat sehingga transkripsi gen-gen penyebab proliferasi seperti *Cyclin D1* dapat dihambat, yang akhirnya dapat juga menghambat proliferasi sel dan berkembangnya kanker kolon pada tahapan lebih lanjut (Park *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2009).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



3.2 Penjelasan Kerangka Konsep

Apabila terkena paparan agen karsinogenik yang dalam penelitian ini digunakan DMBA (*7,12 dimethylbenz α anthracene*), maka menyebabkan perubahan berupa kerusakan DNA pada sel kolon. Mekanisme aktivasi DMBA melibatkan enzim sitokrom P-450 dan atau peroksidase menjadi intermediate reaktif yang dapat merusak DNA yaitu terbentuknya epoksida dihidrodiol (Melendez-Colon *et al.*, 1999). DMBA akan diubah oleh enzim fase I, sitokrom P450 (CYP) menjadi *ultimate carcinogen* berupa senyawa epoksida elektrofil yang merupakan metabolit aktifnya. Metabolit epoksida dapat membentuk DNA *adduct* dan menyebabkan mutasi yang berakibat terbentuk kanker (Weimer *et al.*, 2000).

DMBA menginduksi produksi ROS yang menyebabkan lipid peroksidasi, kerusakan DNA, dan penurunan sistem pertahanan antioksidan (Paliwal *et al.*, 2011). DMBA menyebabkan transformasi neoplastik dengan melalui kerusakan DNA, akumulasi ROS, dan memediasi inflamasi kronis (Manoharan *et al.*, 2009). ROS yang berlebihan juga dapat dihasilkan selama aktivasi metabolit DMBA (Das and Bhattacharya, 2004)

Kemudian timbul mutasi gen. Mutasi gen ini akan menyebabkan perubahan gen yang meregulasi apoptosis, menghilangnya tumor supresor gen dan mengaktifkan protoonkogen menjadi onkogen. Salah satu gen supresor tumor adalah APC. Hilangnya fungsi APC akan mengaktivasi transkripsi gen yang berperan dalam regulasi sel.

Protein APC yang berperan dalam tumor suppressor protein dapat menurunkan aktivasi transkripsi sel yang dimediasi Wnt/β-catenin. Namun, mutasi APC dapat menginaktivasi tumor suppressor gen sehingga mampu menginisiasi kanker kolorektal dan protein yang dihasilkannya dapat menghilangkan fungsi penurunan *signaling* Wnt yang normal. Jika *signaling* Wnt

teraktivasi, degradasi β -catenin akan terhambat karena penurunan kemampuan GSK-3 β untuk memfosforilasi β -catenin dan β -catenin akan translokasi ke nukleus untuk transaktivasi faktor transkripsi Tcf/Lef, sehingga meningkatkan regulasi gen yang bertanggungjawab untuk proliferasi sel. Sudah diketahui bahwa cyclin D1 adalah gen target dari β -catenin/Tcf. Quercetin menghambat *signaling* β -catenin/Tcf, sehingga dapat menghambat ekspresi cyclin D1 (Shan, et al., 2009).

Antioksidan adalah senyawa yang mampu menghambat oksidasi. Antioksidan merupakan senyawa pelindung sel melawan efek merusak dari Reactive Oxygen Species (ROS). Ketidakseimbangan antara antioksidan dengan ROS menimbulkan oxidative stress dan memicu kerusakan selular. Oxidative stress berhubungan dengan kanker, penuaan, atherosklerosis, dan inflamasi (Buhler dan Miranda, 2000). Menurut penilitian yang dilakukan Perumal Shidduraju, yang meniliti efek antioksidan, didapatkan bahwa pada ekstrak methanol, efek antioksidan dari daun moringa oleifera mempunyai potensi paling besar, dan didalamnya yang paling berperan adalah grup flavonoid (quercetin dan kaempferol) (Shidduraju dan Becker, 2003).

Dengan pemberian ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) yang mengandung flavonoid dan senyawa antioksidan, diharapkan dapat menurunkan regulasi ekspresi *cyclin D1* pada sel kanker kolon, sehingga dapat menghambat karsinogenesis kanker kolon.

3.3 Hipotesis Penelitian

Pemberian ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat menurunkan jumlah ekspresi cyclin D1 pada kolon tikus (*Rattus norvegicus*) wistar yang diinduksi DMBA (7,12 dimethylbenz α anthracene).



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. Kelompok I adalah tikus yang tidak diberi diet mengandung DMBA (kontrol negatif), kelompok II tikus diberi diet mengandung DMBA saja (kontrol positif), sedangkan kelompok III sampai dengan V (3 kelompok) diberi diet mengandung DMBA dengan ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dalam berbagai dosis.

4.2 Binatang Coba

4.2.1 Binatang Coba, Objek dan Teknik Randomisasi

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

Objek penelitian yang dipakai adalah tikus wistar jenis kelamin jantan, dewasa dengan umur \pm 2 bulan. Teknik randomisasi untuk pengelompokan perlakuan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) atau

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

4.2.2 Estimasi Jumlah Pengulangan

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

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

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

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

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

$$5n \geq 21$$

$$n \geq 4.2$$

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

4.2.3 Kriteria Inklusi

1. Strain Wistar
2. Umur 2 bulan
3. Berat badan ± 200 gr
4. Jenis kelamin jantan

5. Dalam keadaan sehat selama penelitian

4.2.4 Kriteria Eksklusi

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

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian per oral ekstrak metanol daun kelor dengan dosis 20, 40, 80 mg/kgBB/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 cyclin D1 pada 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 diet DMBA
3. Kondisi lingkungan kandang
4. Pemberian per oral ekstrak methanol daun kelor dengan sonde

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

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

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat

1. Alat Pemeliharaan Binatang Coba

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

2. Alat Pembuat Makanan Binatang Coba

Baskom plastik, timbangan, sarung tangan, gelas ukur.

3. Alat Pengambilan Sampel

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

4. Alat Pemeriksaan *Cyclin D1* adalah *Immunohistochemistry kit*, mikroskop

4.5.2 Bahan Penelitian

1. Bahan Makanan Tikus

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

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



2. Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*)

Proses ekstraksi menggunakan 42 gram dari tepung daun kelor (*Moringa oleifera*) yang disuspensikan dalam methanol 96%. Ekstrak kemudian diaduk secara mekanis selama 12 jam dalam temperatur ruangan (25°C). Solid kemudian dipindahkan dengan sentrifugasi (4,000 g, 10 min) dan supernatan diambil. Hasil ekstrak kemudian disimpan pada suhu 4°C untuk proses lebih lanjut (Mutusim et al., 2010).

3. Bahan Pemeriksaan Immunohistokimia

Jaringan dari kolon tikus, antibodi Cyclin D1, IHK kit unit.

4.6 Definisi Operasional

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

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

2. Model tikus wistar kanker kolon

Tikus wistar diberi 10 mg/kgBB/hari 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) per oral (sonde) selama 45 hari (Indra, 2011).

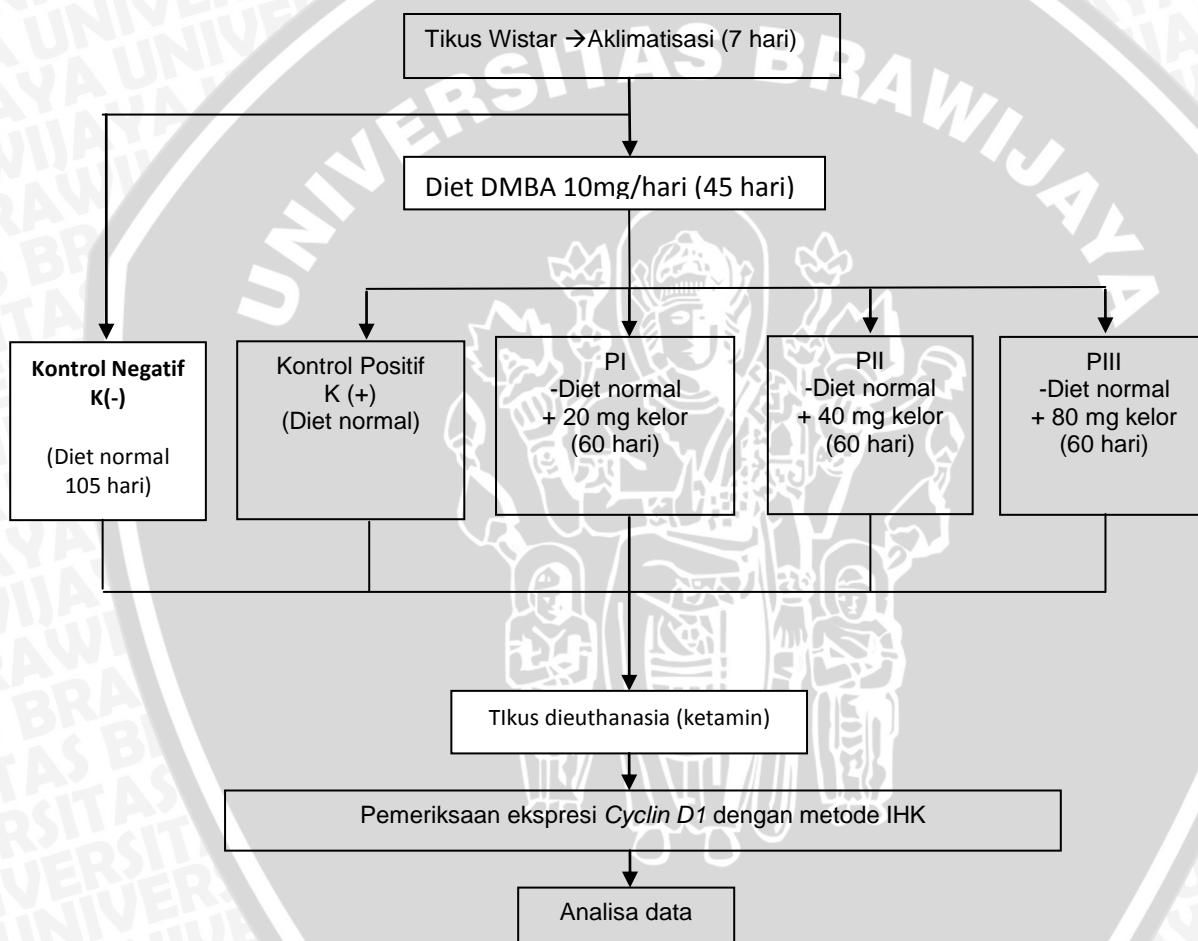
3. Ekspresi *Cyclin D1* dalam jaringan kolon.

Ekspresi *Cyclin D1* dihitung dengan metode IHK pada setiap kelompok tikus. Jumlah *Cyclin D1* dihitung dengan satuan sel dengan perbesaran mikroskop 400x sebanyak 10 lapangan pandang pada setiap tikus (Hui, 2000).

4.7 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh pengetahuan mengenai efek ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap ekspresi *Cyclin D1* dalam jaringan tikus (*Rattus norvegicus*) wistar dengan diet mengandung DMBA. Alur penelitian dapat dijelaskan melalui bagan berikut.

Skema 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 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* 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 (standar) saja. Kelompok perlakuan II hingga V diberi diet DMBA sebanyak 10 mg/hari dengan sonde. Selain itu, kelompok II diberi diet normal tanpa pemberian ekstrak methanol daun kelor. Sedangkan, kelompok III diberi ekstrak methanol daun kelor per oral dengan dosis 20 mg/kgBB/hari dengan sonde + diet normal. Kelompok IV diberi ekstrak methanol daun kelor per oral dengan dosis 40 mg/kgBB/hari + diet normal. Kelompok V diberi ekstrak methanol daun kelor per oral dengan dosis 80 mg/kgBB/hari + diet normal. Semua pakan di atas diberikan selama 60 hari (Indra, 2011).

4.7.3.2 Pembedahan

Pemeriksaan ekspresi *Cyclin D1* dalam jaringan kolon tikus wistar pada eksperimen ini memerlukan jaringan kolon. Penelitian ini merupakan penelitian payung, yang meneliti efek ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) pada tikus wistar model kanker kolon dan hepar dengan parameter yang berbeda-beda. Karena itu, setelah 60 hari pemberian ekstrak metanol daun *Moringa oleifera* per oral, tikus dieuthanasia dengan cara injeksi ketamin. Kemudian

abdomen dibuka, setelah itu sebagian jaringan kolon diambil untuk diperiksa jumlah ekspresi *Cyclin D1*. Setelah penelitian, tikus dikuburkan di tempat yang aman oleh petugas.

i.Cara Pemeriksaan Mikroskop

Untuk menghitung jumlah *cyclin D1* pada preparat jaringan kolon yang sudah diproses sebelumnya dengan metode immunohistokimia digunakan mikroskop protret di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Preparat diletakkan pada mikroskop dengan perbesaran okular 10x dan perbesaran obyektif 10x. Setelah terlihat jaringan kolon, maka perbesaran obyektif ditambah menjadi 40x. Pengamatan dilakukan pada 10 lapang pandang yang berbeda supaya hasil yang didapatkan bersifat obyektif.

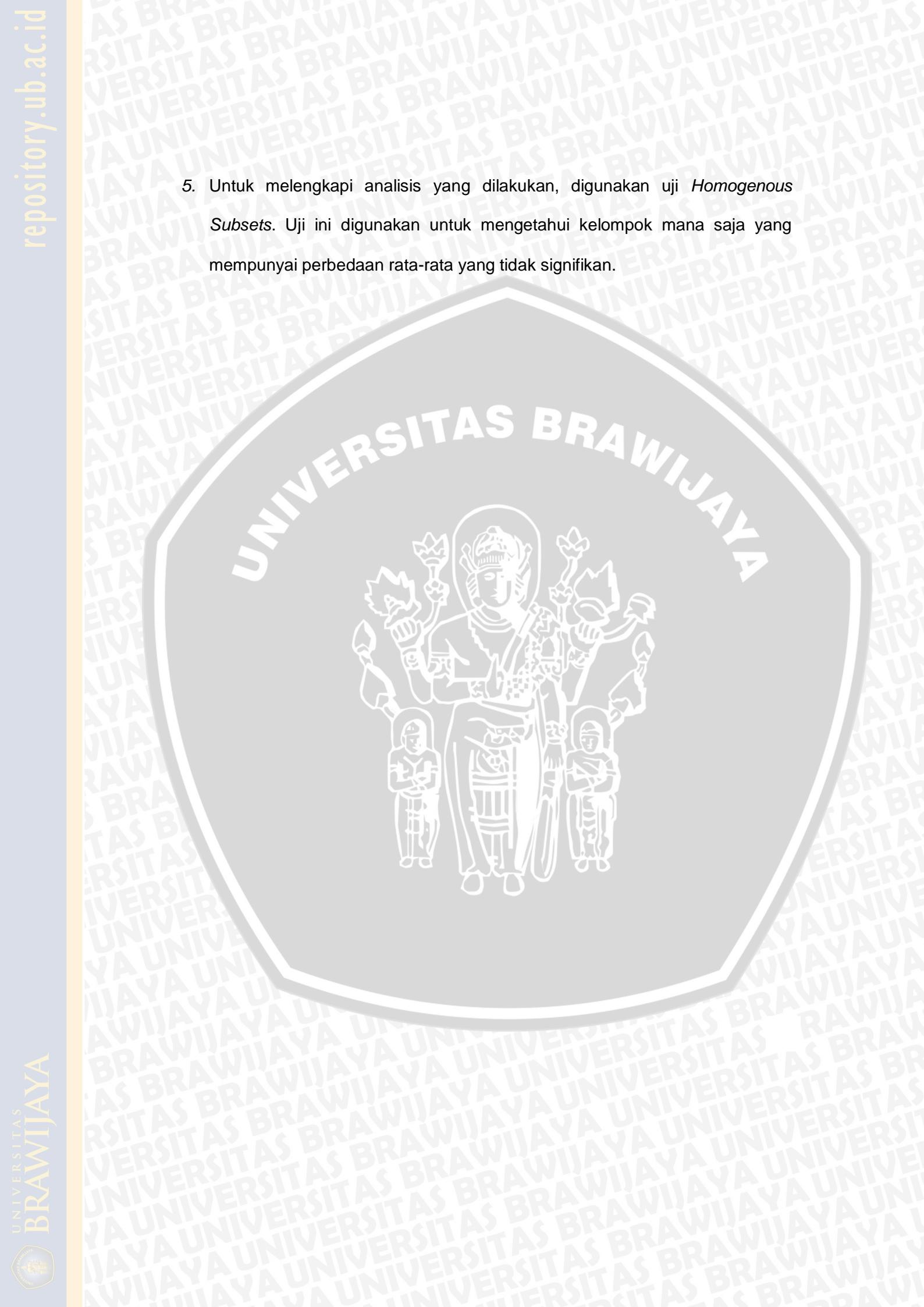
4.8 Pengolahan dan Analisis Data

Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif yaitu;

1. Uji normalitas data menunjukkan bahwa sebaran data penelitian ini normal ($p>0,05$).
2. Uji homogenitas varian yang menunjukkan bahwa data yang diperoleh memiliki varian yang homogen ($p>0,05$). Karena data normal dan homogen, analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.
3. Uji One-way ANOVA didapatkan nilai rata-rata jumlah ekspresi *Cyclin D1* 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 Tukey HSD), uji Post *Hoc* yang digunakan adalah uji Tukey HSD dengan tingkat kemaknaan 95% ($p <0,05$).



5. Untuk melengkapi analisis yang dilakukan, digunakan uji *Homogenous Subsets*. Uji ini digunakan untuk mengetahui kelompok mana saja yang mempunyai perbedaan rata-rata yang tidak signifikan.



UNIVERSITAS BRAWIJAYA

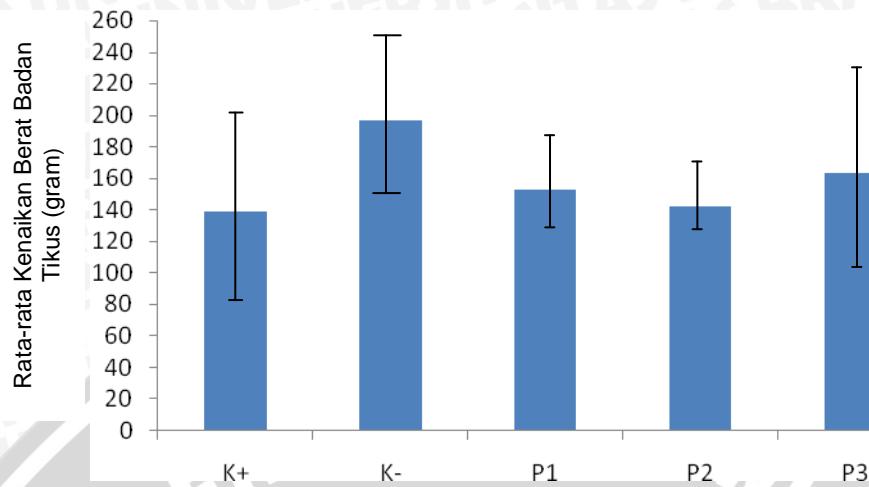


BAB 5**HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA****5.1 Hasil Penelitian**

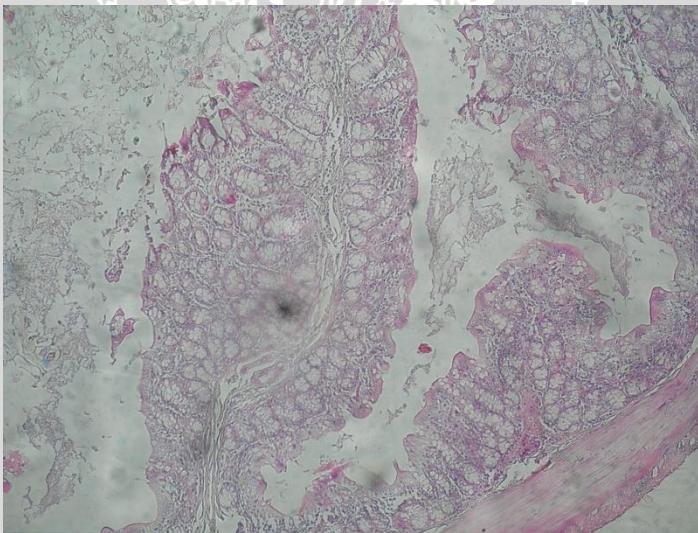
Pada penelitian ini didapatkan data hasil untuk masing-masing kelompok perlakuan. Penelitian ini terdiri dari lima macam perlakuan, yaitu kelompok I adalah tikus diberi diet normal saja (kontrol negatif), kelompok II tikus diberi diet normal dengan DMBA (kontrol positif), sedangkan kelompok III sampai dengan V (3 kelompok) diberi diet normal, asupan DMBA dan ekstrak methanol daun kelor dengan dosis berbeda (20, 40, 80 mg/kgBB/hari) secara per oral dengan sonde setiap hari sekali selama 60 hari. Perincian data hasil penelitian berupa kenaikan berat badan adalah sebagai berikut.

Tabel 5.1 Karakteristik Tikus Percobaan

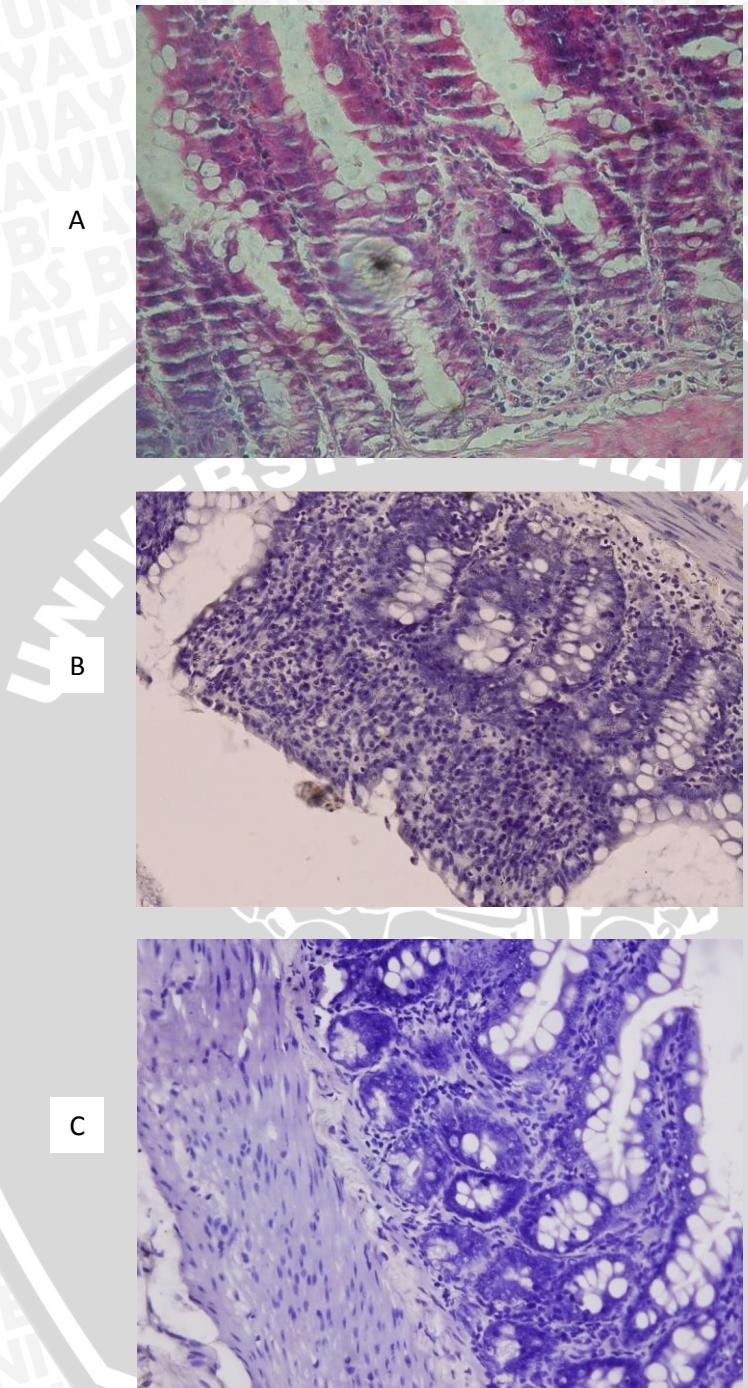
Kelompok perlakuan	I Tanpa Perlakuan (105 Hari Diet Normal)	II diet normal + DMBA 10 mg/kgBB/hari (45 hari dan diet normal 60 hari kemudian)	III Diet Normal + DMBA 10 mg/kgBB/hari (45 hari) dan diet normal + 20 mg/kgBB/hari kelor selama 60 hari)	IV Diet Normal+ DMBA 10 mg/kgBB/hari (45 hari) dan diet normal + 40 mg/kgBB/hari kelor selama 60 hari)	V Diet Normal + DMBA 10 mg/kgBB/hari (45 hari) dan diet normal + 80 mg/kgBB/hari kelor selama 60 hari)	P
n (jumlah)	4	4	4	4	4	
Rata-rata Berat Badan Awal (g)	164.75 ± 11.92	169.75 ± 10.24	170.00 ± 10.16	168.50 ± 16.09	161.00 ± 8.04	0.381
Rata-rata Berat Badan Akhir (g)	304.25 ± 49.22	366.25 ± 45.44	323.00 ± 30.16	311.25 ± 20.98	324.75 ± 50.58	0.287
Rata-rata Kenaikan Berat Badan (g)	139.07 ± 55.15	196.80 ± 52.06	152.95 ± 23.34	142.47 ± 13.76	163.45 ± 55.42	0.776



Gambar 5.1 Grafik Hubungan Antara Kelompok Perlakuan dan Rata-rata Kenaikan Berat Badan Tikus (g). Keterangan: K- (105 hari diet normal); K+ (45 hari diet normal dan DMBA kemudian diet normal selama 60 hari); P1 (45 hari diet normal dan DMBA kemudian diet normal dan 20 mg/kgBB/hari kelor selama 60 hari); P2 (45 hari diet normal dan DMBA kemudian diet normal dan 40 mg/kgBB/hari kelor selama 60 hari); P3 (45 hari diet normal dan DMBA kemudian diet normal + 80 mg/kgBB/hari kelor selama 60 hari).



Gambar 5.2 Potongan Gambaran Histologi Kolon Post-DMBA (45 Hari), pembesaran mikroskop 100x.

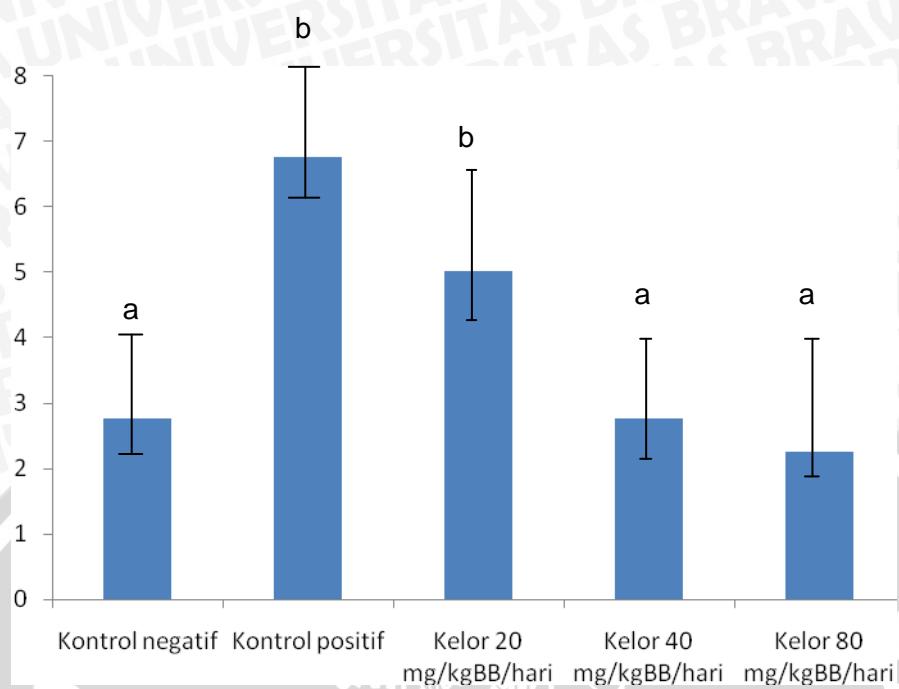


Gambar 5.3 Potongan Gambaran Histologi Kolon (perbesaran 400x). Keterangan: A. Potongan gambaran histologi kolon post-DMBA hari ke 45, menunjukkan adanya hiperplasia. B. Potongan gambaran histologi kolon hari ke 105, menunjukkan adanya hiperplasia. C. Potongan gambaran histologi kolon normal.

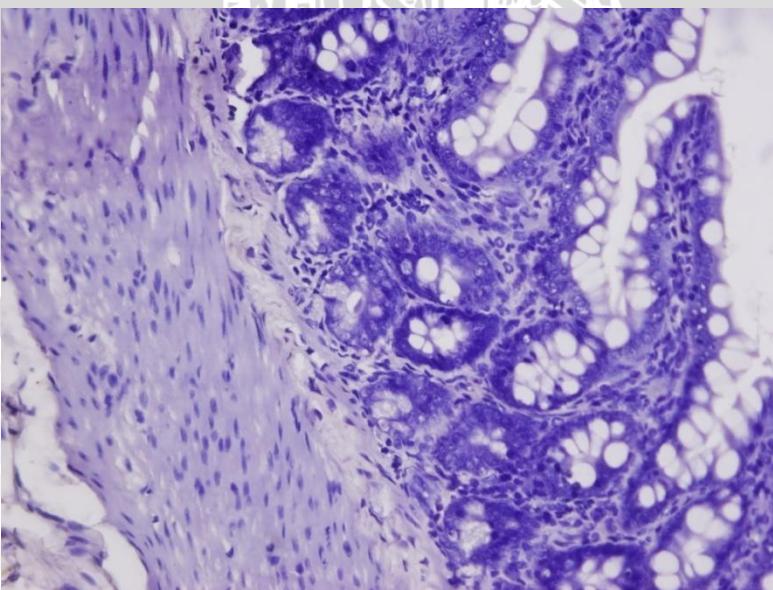
Pengukuran jumlah ekspresi *cyclin D1* menggunakan metode IHK dan dihitung di bawah mikroskop dilakukan terhadap semua kelompok dari jaringan kolon tikus Wistar yang diinduksi DMBA. Pengukuran rata-rata jumlah ekspresi *cyclin D1* dilakukan terhadap masing-masing kelompok perlakuan ditampilkan pada tabel 5.2 dan gambar 5.5. Dari setiap tikus dilihat 10 lapang pandang pada perbesaran 400x. Kemudian hasil dari setiap lapang pandang tersebut dijumlahkan. Rata-rata pada masing-masing perlakuan dihitung dengan cara menjumlahkan semua jumlah ekspresi *cyclin D1* pada tikus masing-masing kelompok perlakuan dibagi dengan jumlah sampel pada masing-masing kelompok perlakuan. Dari tiap perlakuan, diambil empat sampel karena jumlah pengulangan yang dibutuhkan untuk tiap-tiap kelompok perlakuan dalam penelitian ini adalah 4.

Tabel 5.2 Nilai Rata-rata Jumlah Ekspresi *Cyclin D1* per 10 Lapang Pandang

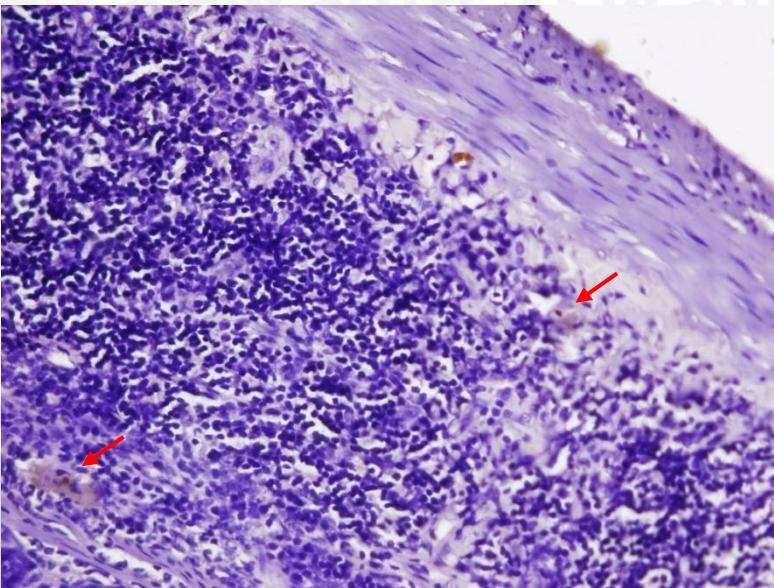
Perlakuan	Rerata
Kontrol negatif	2.75 ± 0.957
Kontrol positif	6.75 ± 0.957
Kelor 20 mg/kgBB/hari	5.00 ± 0.816
Kelor 40 mg/kgBB/hari	2.75 ± 0.957
Kelor 80 mg/kgBB/hari	2.25 ± 1.258
Total	3.90



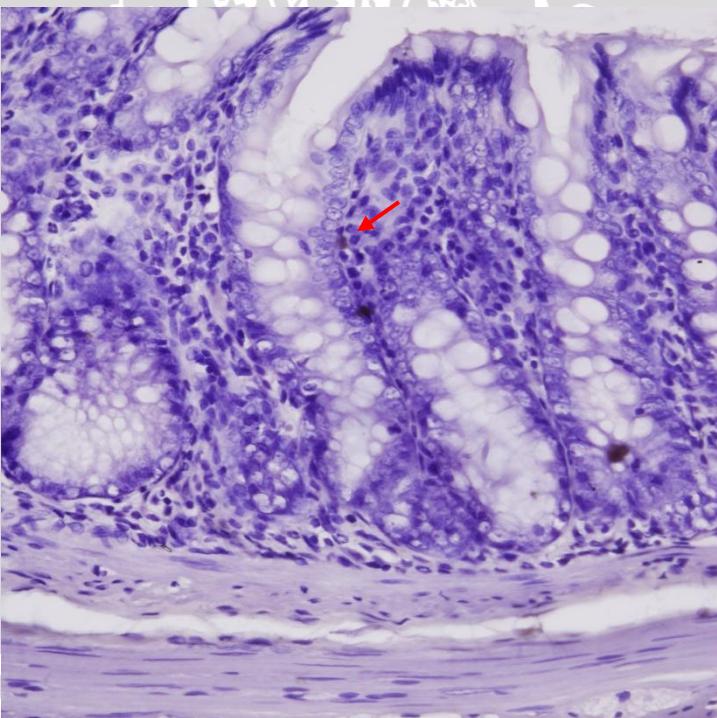
Gambar 5.4 Grafik Hubungan Antara Kelompok Perlakuan dan Rata-rata Jumlah *cyclin D1*. Keterangan: Kontrol negatif (105 hari diet normal); Kontrol positif (45 hari diet normal dan DMBA kemudian diet normal selama 60 hari); P I (45 hari diet normal dan DMBA kemudian diet normal dan 20 mg/kgBB/hari kelor selama 60 hari); P II (45 hari diet normal dan DMBA kemudian diet normal dan 40 mg/kgBB/hari kelor selama 60 hari); P III (45 hari diet normal dan DMBA kemudian diet normal + 80 mg/kgBB/hari kelor selama 60 hari).



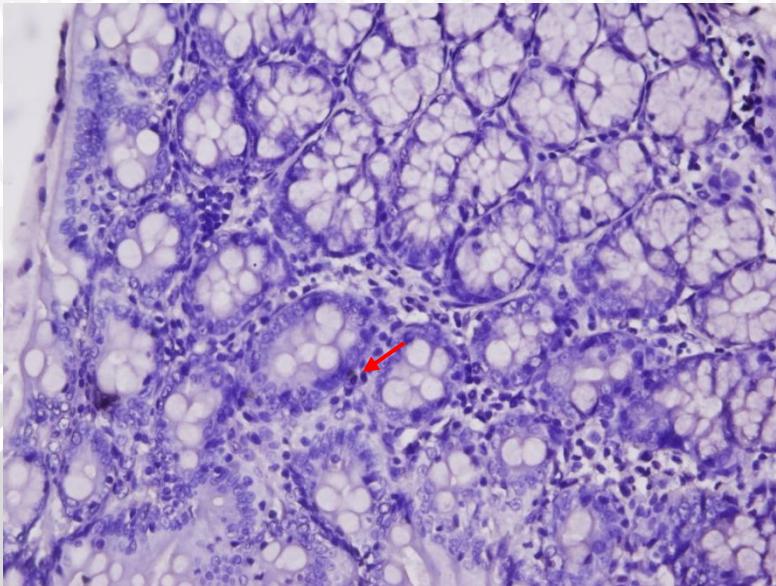
Gambar 5.5 Potongan Gambaran Histologi Kolon Kontrol Negatif (K-). Pengecetan imunohistokimia pembesaran mikroskop 400x. Keterangan: Gambaran histologi kolon normal



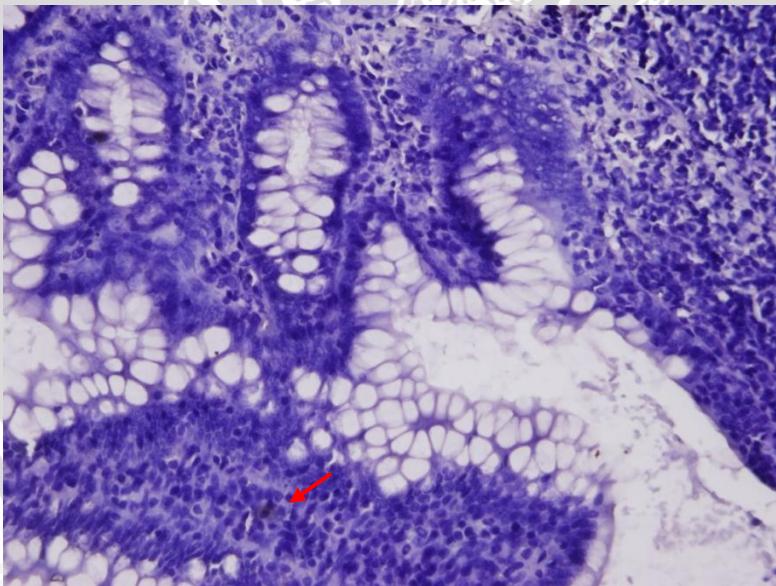
Gambar 5.6 Potongan Gambaran Histologi Kolon Kontrol Positif (K+). Pengecatan imunohistokimia pembesaran mikroskop 400x. Keterangan: terdapat ekspresi *cyclin D1*, sel berwarna coklat, seperti yang ditunjuk tanda panah



Gambar 5.7 Potongan Gambaran Histologi Kolon Perlakuan I (P I) : 45 hari diet normal dan DMBA kemudian diet normal dan 20 mg/kgBB/hari kelor selama 60 hari. Pengecatan imunohistokimia pembesaran mikroskop 400x. Keterangan: terdapat ekspresi *cyclin D1*, sel berwarna coklat, seperti yang ditunjuk tanda panah



Gambar 5.8 Potongan Gambaran Histologi Kolon Perlakuan II (P II) : 45 hari diet normal dan DMBA kemudian diet normal dan 40 mg/kgBB/hari kelor selama 60 hari. Pengecatan imunohistokimia pembesaran mikroskop 400x. Keterangan: terdapat ekspresi *cyclin D1*, sel berwarna coklat, seperti yang ditunjuk tanda panah



Gambar 5.9 Potongan Gambaran Histologi Kolon Perlakuan III (P III) : 45 hari diet normal dan DMBA kemudian diet normal dan 80 mg/kgBB/hari kelor selama 60 hari. Pengecatan imunohistokimia pembesaran mikroskop 400x. Keterangan: terdapat ekspresi *cyclin D1*, sel berwarna coklat, seperti yang ditunjuk tanda panah

5.2 Analisis Data

Dari tabel 5.2 dan gambar 5.5 terlihat rata-rata jumlah ekspresi *cyclin D1* terendah terdapat pada kelompok V (45 hari diet normal + DMBA dan 60 hari diet normal + 80 mg/kgBB/hari kelor) yaitu sebesar 2,25 sel per 10 lapang pandang (gambar 5.6). Sedangkan rata-rata jumlah ekspresi *cyclin D1* tertinggi pada kelompok II (kontrol positif) yaitu sebesar 6,75 sel per 10 lapang pandang (gambar 5.7). Rata-rata jumlah ekspresi *cyclin D1* berdasarkan tabel 5.2 dan gambar 5.5 menunjukkan bahwa pada kelompok III, IV, dan V yang mendapat diet normal, DMBA, dan kelor pada berbagai dosis memiliki jumlah ekspresi *cyclin D1* lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Jumlah ekspresi *cyclin D1* hanya didapatkan sedikit pada setiap jaringan kolon karena jaringan kolon tikus pada studi ini belum mengalami displasia, tetapi meskipun demikian telah terdapat peningkatan ekspresi *cyclin D1* yang dapat mengarah pada proses karsinogenesis.

Data yang didapatkan dari hasil penelitian ini dianalisis dengan menggunakan program komputer SPSS 16 untuk Windows 7. Dengan program ini pertama-tama dilakukan uji normalitas data (lampiran 2). Untuk menguji normalitas distribusi data digunakan Shapiro-Wilk karena sampel yang digunakan sedikit. Dipilih menggunakan metode Shapiro-Wilk (analitik) karena dibandingkan dengan metode deskriptif (menghitung koefisien varians, rasio skewness, rasio kurtosis, histogram, dan plot), metode Shapiro-Wilk jauh lebih sensitif (dibandingkan dengan koefisien varians) dan lebih obyektif (dibandingkan dengan plot dan histogram) sehingga mengurangi unsur subyektivitas pengamatan. Kemudian dari data di atas didapatkan bahwa distribusi data hasil penelitian pada semua kelompok $p > 0.05$, maka data ini normal.

Kemudian dilakukan uji homogenitas varian (lampiran 3) untuk mengetahui apakah varians data sama atau ada perbedaan varians antara kelompok data yang dibandingkan. Untuk menguji homogenitas varian ini digunakan *Levene test*. 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 4) dilakukan untuk menguji apakah kelima kelompok memiliki rata-rata yang sama. Dari hasil tes tersebut didapatkan nilai rata-rata jumlah ekspresi *cyclin D1* dari kelima populasi memang berbeda ($p=0,000$). Karena nilai $p<0,05$ maka dalam data penelitian ini terdapat minimal 2 kelompok yang berbeda signifikan.

Analisis dilanjutkan dengan *Post hoc test* yang bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA. Pada analisis ini digunakan *Tukey HSD test* (Lampiran 5). Pada hasil uji *Tukey HSD* terdapat perbedaan jumlah ekspresi *cyclin D1* pada jaringan kolontikus yang signifikan antara kelompok I (kontrol negatif) dengan kelompok II (kontrol positif), dan kelompok I (kontrol negatif) dengan kelompok III (dosis 20 mg/kgBB/hari). Kelompok II (kontrol positif) dengan kelompok IV (dosis 40 mg/kgBB/hari), dan kelompok II (kontrol positif) dengan kelompok V (dosis 80 mg/kgBB/hari). Pada kelompok III (dosis 20 mg/kgBB/hari) terdapat perbedaan yang signifikan dengan kelompok IV (dosis 40 mg/kgBB/hari) dan dengan kelompok V (dosis 80 mg/kgBB/hari). Sementara itu antar kelompok perlakuan IV dan V tidak terdapat perbedaan yang signifikan karena nilai $p>0,05$.

Untuk melengkapi hasil dari uji *Tukey* digunakan *Homogeneous Subsets* (Lampiran 6) yang digunakan untuk mencari grup atau subset mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata (*Mean Difference*) yang tidak berbeda secara signifikan. Pada subset 1 menunjukkan tiga kelompok, yaitu kelompok V (45 hari diet normal + DMBA kemudian 60 hari diet normal + 80 mg/kgBB/hari kelor) , kelompok I (kontrol negatif), dan kelompok IV (45 hari diet normal + DMBA kemudian 60 hari diet normal + 40 mg/kgBB/hari kelor). Pada subset 2 terdapat dua kelompok, yaitu kelompok III (45 hari diet normal + DMBA kemudian 60 hari diet normal + 20 mg/kgBB/hari kelor), dan kelompok II (kontrol positif). Namun dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara subset sesuai hasil uji *Tukey*.

Dari hasil-hasil tersebut dapat dilihat jumlah ekspresi *cyclin D1* pada kelompok III sampai V cenderung menurun. Oleh karena itu dapat diambil kesimpulan bahwa semua dosis tersebut merupakan dosis respon. Dosis respon adalah mulai dari dosis 20 mg/kgBB/hari, sedangkan dosis efektif pada studi ini yaitu dosis 40 mg/kgBB/hari.

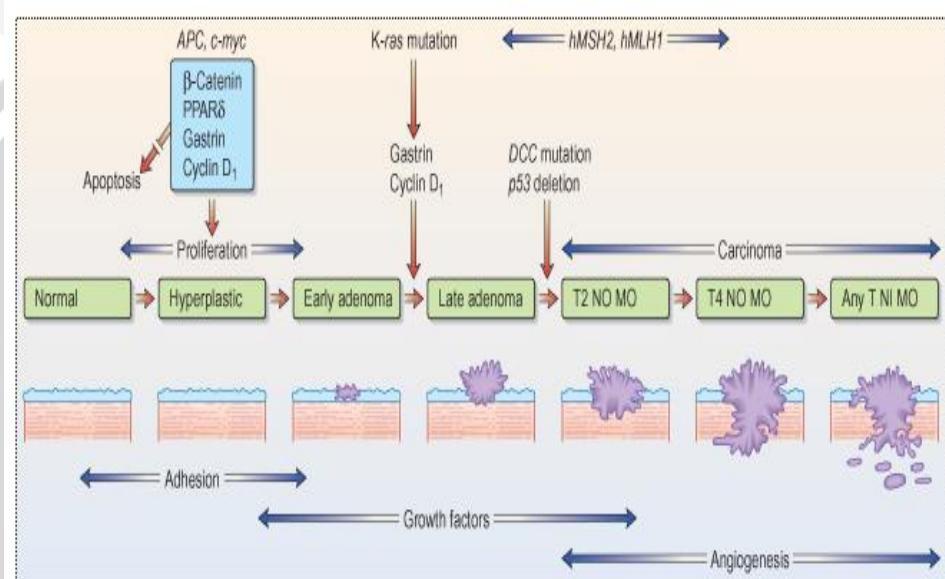
Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap ekspresi *cyclin D1* pada jaringan kolon tikus wistar yang diinduksi DMBA. Hasil pengukuran terhadap jumlah rata-rata ekspresi *cyclin D1* pada kelima kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok I (kontrol positif) dengan kelompok II (kontrol negatif) ($p=0,000$), dengan kelompok III (dosis 20mg/kgBB/hari ekstrak metanol daun kelor) ($p=0,042$), sedangkan dengan kelompok IV (dosis 40mg/kgBB/hari ekstrak metanol daun kelor) dan kelompok V (dosis 80mg/kgBB/hari ekstrak metanol daun kelor) ($p>0.05$, tidak signifikan). Pada studi ini didapatkan dosis respon untuk menurunkan jumlah rata-rata ekspresi *cyclin D1* pada jaringan kolon tikus wistar yang diinduksi DMBA adalah mulai dari dosis 20 mg/kgBB/hari ekstrak metanol daun kelor.

Pada studi kami belum terjadi kanker pada kolon. Meskipun demikian proses karsinogenesis telah terjadi, dilihat dari adanya peningkatan ekspresi *cyclin D1* dan terdapat peningkatan ekspresi P53 pada epitel mukosa kolon yang juga diteliti pada studi kami (Rahmahani, 2013). Karsinogenesis pada kolon merupakan hasil dari multi proses yang melibatkan sejumlah perubahan seperti mutasi gen yang spesifik, kemudian berubah dari normal menjadi prekanker dengan peningkatan ukuran dan menjadi displasia, kemudian menjadi kanker dan akhirnya bermetastasis (Sudhir *et al*, 2001). DMBA menginduksi produksi

BAB 6

PEMBAHASAN

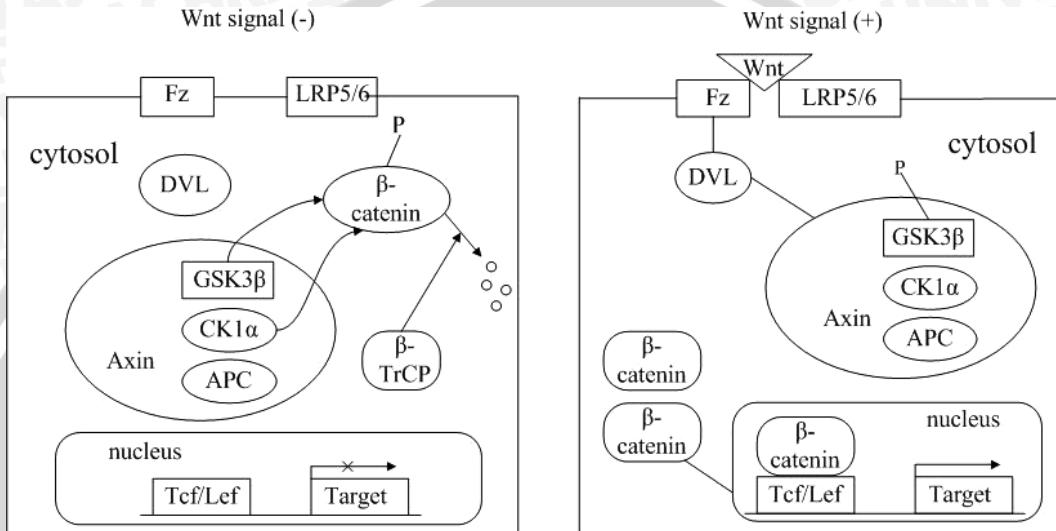
ROS yang menyebabkan lipid peroksidasi, kerusakan DNA, dan penurunan sistem pertahanan antioksidan (Paliwal *et al.*, 2011). DMBA menyebabkan transformasi neoplastik dengan melalui kerusakan DNA, akumulasi ROS, dan memediasi inflamasi kronis (Manoharan *et al.*, 2009). ROS siap menyerang dan menginduksi kerusakan di berbagai biomolekul termasuk protein, lipid, lipoprotein, dan DNA (Sreelatha and Padma, 2009).



Gambar 6.1. Progresi Kanker Kolon (Kumar dan Clark,2005)

Pada gambar 6.1 dapat dilihat bahwa peningkatan ekspresi *cyclin D1* pada kontrol positif terjadi karena pemberian diet DMBA akan menyebabkan peningkatan regulasi ekspresi gen APC juga menyebabkan terjadinya penyimpangan *Wnt signaling* yang berperan sebagai peran utama dalam regulasi proliferasi sel epitelial, apoptosis, diferensiasi dan invasi (Priyadarsini, 2011). Aktivasi *Wnt pathway* sering terjadi pada tumor yang diinduksi bahan karsinogen, terutama pada traktus gastrointestinal pada hewan penggerak (Takahashi and Wakabayashi, 2004). Adanya disregulasi jalur canonical Wnt/ β -catenin, kebanyakan karena terjadi mutasi tumor suppressor APC, atau mutasi

pada onkogenik β -catenin. Pada kondisi normal, β -catenin terdegradasi oleh protein APC, Axin atau GSK3 sehingga tidak bisa masuk ke inti sel (Qiu et al., 2010).



Gambar 6.2. Wnt canonical pathway (Xueling dan Wang, 2010)

Pada proses karsinogenesis Wnt berikatan dengan suatu reseptor yang memiliki protein *transmembrane frizzled* (Fz) (gambar 6.2). Aktivasi Fz menyebabkan inhibisi *glycogen synthase kinase 3 β* (GSK3 β) melalui *Disheveled protein* (Dvl). Inhibisi GSK3 β mencegah *N-terminal phosphorylation*, dan ubiquitinasi berikutnya dan degradasi β -catenin. Kegagalan degradasi β -catenin menyebabkan β -catenin jumlahnya banyak terakumulasi pada sitoplasma (stabil, tidak terdegradasi) sehingga bisa masuk ke inti sel, berikatan dengan *T cell families* (TCF) dan *lymphoid enhancing families* (LEF) kemudian mengaktifkan gen target seperti *cyclin D1* and *c-myc*, yang diyakini sebagai pusat tumorigenik yang potensial dari jalur *Wnt signaling* (Polakis,2000). *Cyclin D1* ini berperan dalam proliferasi sel, sehingga proliferasi sel semakin banyak dan tidak terkontrol menyebabkan kanker kolon (Xueling dan Wang, 2010).

Di dalam daun *Moringa oleifera* ditemukan berbagai jenis antioksidan, di antaranya flavonoid. Turunan flavonoid yang paling banyak ditemukan pada tanaman kelor adalah quersetin dan kaempferol (Pace, 2004). Dua turunan flavonoid ini telah diketahui memiliki peranan penting dalam patogenesis kanker kolon. Quercetin dan kaempferol adalah derivat flavonoid yang banyak ditemukan pada buah-buahan, sayur-sayuran, kacang-kacangan, dan anggur merah. Quercetin biasanya digunakan untuk antiinflamasi dan antiaktivitas karsinogenik (Russo, 2007). Menurut penelitian yang dilakukan Perumal Shidduraju, yang meniliti efek antioksidan dari daun moringa oleifera, didapatkan bahwa dengan ekstrak methanol, efek antioksidan mempunyai potensi paling besar, dan di dalamnya yang paling berperan adalah grup flavonoid (quersetin dan kaempferol) (Shidduraju and Becker, 2003).

Pada studi ini efek ekstrak metanol daun kelor terhadap penurunan ekspresi *cyclin D1* pada jaringan kolon tikus wistar yang diinduksi DMBA telah berhasil diteliti. Penurunan ekspresi *cyclin D1* ini akibat dari kandungan flavonoid pada ekstrak metanol daun kelor yang dapat menghambat proliferasi sel. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Kartikasari (2011) yang meneliti Ekstrak Methanol Daun Kelor (*Moringa Oleifera*) Menurunkan Jumlah PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) Pada Sel Kolon Tikus Wistar Yang Diinduksi DMBA (7,12 Dimethylbenz A Anthracene). Pada studi ini didapatkan kesimpulan ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) mampu menurunkan jumlah PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) pada tikus Wistar yang diinduksi DMBA (7,12 dimethylbenz a anthracene) pada dosis 20 mg/kgBB/hari. Peningkatan PCNA diakibatkan oleh meningkatnya gen yang berperan dalam proliferasi sel seperti c-myc dan *cyclin D1*.

Hasil penelitian menunjukkan kemampuan ekstrak metanol daun kelor sebagai substansi yang dapat menghambat perkembangan terjadinya karsinogenesis lebih lanjut dengan menghambat proliferasi sel kanker melalui hambatan terhadap regulator siklus sel *cyclin D1*. Namun, dalam penelitian ini masih belum diketahui bahan aktif yang menurunkan jumlah ekspresi *cyclin D1*, juga belum dapat ditentukan dosis toksis, dosis optimum, maupun efek samping dari pemberian ekstrak metanol daun kelor. Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih lanjut dengan lebih banyak variasi jumlah dosis ekstrak metanol daun kelor untuk dapat melihat jumlah ekspresi *cyclin D1* yang mendekati normal (kontrol negatif) sehingga dapat diketahui bahan aktif dari ekstrak metanol daun kelor dan efek samping dari pemberian ekstrak metanol daun kelor.



BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa:

1. Pemberian ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) mampu menurunkan jumlah ekspresi *cyclin D1* pada jaringan kolon tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar yang dipapar diet DMBA (7,12 dimethylbenz α anthracene).
2. Dosis respon ekstrak methanol daun kelor (*Moringa oleifera*) yang berefek menurunkan jumlah ekspresi *cyclin D1* pada jaringan kolon tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar dengan diet DMBA (7,12 dimethylbenz α anthracene) adalah mulai dari dosis 20 mg/kgBB/hari, sedangkan dosis efektif pada studi ini yaitu dosis 40 mg/kgBB/hari

7.2 Saran

Dari penelitian ini, saran yang dapat diajukan adalah:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek samping, dosis optimum dan/atau dosis efektif pemberian ekstrak methanol daun kelor pada variasi dosis yang lebih beragam.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui bahan aktif yang terkandung dalam ekstrak metanol daun kelor yang berpengaruh terhadap penurunan *cyclin D1*.

DAFTAR PUSTAKA

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1995. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*.USA.
- American Cancer Society. 2011. American Cancer Society. Colorectal Cancer Facts & Figures 2011-2013. Atlanta: American Cancer Society.
- American Cancer Society. 2005. *Colorectal Cancer Facts and Figures Special Edition 2005*. Atlanta: American Cancer Society
- Ayinde BA, Onwukaeme DN, Omogbai EKI, 2007. Isolation and Characterization of Two Phenolic Compounds from The Stem Bark of Musanga Cecropioides R. Brown (Moraceae). *Acta Pol. Pharm.*; 64 : 183-185
- Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. 1993. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev*; 7(5):812-21
- Beniston, R. G., and Campo, M. S. (2003) *Oncogene* 22; 5504–5514
- Bennett R., Mellon F., Pratt J., Dupont M., Pernins L., dan Kroon P. 2003. Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of multi-purpose trees *Moringa oleifera* L. (horseradish tree) and *Moringa stenopetal* L. *J. Agric. Food Che*; 51: 3546-5553
- Botteri E, Iodice S, Raimondi S, Bagnardi V, Lowenfels A, Maisonneuve P. 2008. Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology*; 2: 388-395
- Budi R.T., Widyarini S. 2010. Dampak Induksi Karsinogenesis Glandula Mammaria dengan 7, 12-dimetilbenz(α)antrasen terhadap Gambaran Histopatologis Lambung Tikus Sprague Dawley. *Jurnal Veteriner Maret*, 11 (1) : 17-23
- Buhler, D. and C. Miranda, 2000. Antioxidant Action of Flavonoids. Micronutrients Information Center, Linus Pauling Institute, London.
- Casciato DA, 2004. *Manual of Clinical Oncology* 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins.:p 201
- Catuogno M.S. Montenegro, M.A. Sánchez Negrette, M. Ramirez, G.V., 2011. Cáncer de colon en ratas. *Rev. vet.*; 22: 1, 13–18
- CDC, 2009. Risk Factors and Symptoms: Colorectal Cancer Screening Saves Lives. *CDC Publication*: 21-1029
- Das, R.K. and S. Bhattacharya, 2004. Inhibition of DMBA-croton oil two-stage mouse skin carcinogenesis by diphenylmethyl selenocyanate through modulation of cutaneous oxidative stress and inhibition of nitric oxide production. *Asian. Pac. J. Cancer. Prev*; 5: 151-158
- Deane NG, Parker MA, Aramandla R, Diehl L, Lee WJ, Washington MK, Nanney LB, Shyr Y and Beauchamp RD. 2001. *Cancer Res*; 61: 5389–5395.
- Departemen Kesehatan RI, 2006. *Gaya hidup penyebab kolorektal*. (Online) (<http://www.litbang.depkes.go.id/aktual/kliping/KankerUsus011106.htm>, diakses tanggal 10 Desember 2011)
- Devita, Vincent T, Lawrence, Theodore S, Rosenberg, Steven A, 2008. *Devita, Hellman and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 8th Edition. Wolter Kluer : Lippincott Williams and Wilkins

- Dhawan V. and Jain S. 2005. Garlic supplementation prevents oxidative DNA damage in essential hypertension. *Mol. Cell Biochem*; 275: 85-94.
- Diehl JA. 2002. Cycling to cancer with cyclin D1. *Cancer Biol Ther*; 1(3):226–31
- Erhart LM, Lankat-Buttgereit B, Schmidt H, Wenzel U, Daniel H, Göke R. 2005. Flavone initiates a hierarchical activation of the caspase-cascade in colon cancer cells. *Apoptosis*. May;10(3):611-7.
- Fahey,J.W. 2005. Moringa oleifera : A review of the Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophylactic Properties. *Trees for Life Journal*; 1:5
- Fauci A, Longo D, Kasper D, Hauser S, Jameson J, and Loscalzo J. 2008. *Harrison's Internal Medicine*, 17th ed. New York: McGraw-Hill Medical.
- Fu, M. Chenguang Wang, Zhiping Li, Toshiyuki Sakamaki, And Richard G. Pestell. 2004. Minireview: Cyclin D1: Normal and Abnormal Functions, *Endocrinology*; 145(12):5439–5447
- Ganiswara, S. G., 1995, *Farmakologi dan Terapi*, Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta : 686-687
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, et al. 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*; 281:1509-1512.
- Heavey PM, McKenna D, Rowland IR. 2004. Colorectal Cancer and the Relationship Between Genes and the Environment. *Nutrition and Cancer*; 2: 124-141.
- Hidayat, Saleh., 2006, *Pemberdayaan Masyarakat Bantaran Sungai Lematang dalam Menurunkan Kekeruhan Air dengan Biji Kelor (Moringa oleifera Lam.) sebagai Upaya Pengembangan Proses Penjernihan Air*, Disertasi tidak diterbitkan. Malang: Program Studi Setara Jurusan Pendidikan Biologi Universitas Negeri Malang.
- Hui AM, Li X, Shi YZ, Takayama T, Torzilli G, Makuuchi M. 2000. Cyclin D1 Overexpression Is a Critical Event in Gallbladder Carcinogenesis and Independently Predicts Decreased Survival for Patients with Gallbladder Carcinoma. *Clin Cancer Res*; 6:4272-4277.
- Indra M.R, Hernowati T E, Satuman, 2011. *Pengaruh Ekstrak Daun Kelor (Moringa Oleifera) Terhadap Efek Karsinogenik Polutan 7,12 Dimethyl Benz(A)Nthracene (Dmba) Pada Tikus Wistar Melalui Penghambatan Aktifitas Telomerase Dan Induksi Apoptosis*. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. 2008. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*; 58:71-96
- Jonni M.S, M.Sitorus, Nelly K., 2008. *Cegah Nutrisi Dengan Kelor*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius
- Kartikasari, D. 2011. *Ekstrak methanol daun kelor (moringa oleifera) menurunkan jumlah pcna (proliferating cell nuclear antigen) pada sel kolon tikus wistar yang diinduksi dmbo (7,12 dimethylbenz a anthracene)*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Kasolo, JN., Gabriel SB., Lonzy O., Joseph O., and Jasper WO. 2010. Phytochemicals and uses of *Moringa oleifera* leaves in Ugandan rural communities. *Journal of Medicinal Plants Research*; Vol. 4 No. 9: 753-757
- Kumar, Clark, 2005. *Clinical Medicine*. Inggris : Saunder Ltd.



- 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 Re*; 35: 57-68.
- Lukitaningsih E, Noegrohati S. 2000. Studi Pemisahan senyawa hidrokarbonpoliaromatik secara kromatografi gas kolom kapiler. *MFI*; 11(1): 31-38.
- Manoharan S, Panjamurthy K, Pugalendhi P, Balakrishnan S, Rajalingam K, Vellaichamy L, Mary. 2009. Protective role of withaferin-A on red blood cell integrity during 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced oral carcinogenesis. *Afr J Trad CAM* 2009;6:94-102
- Meiyanto E, Susilowati S, Taminatun S, Murwanti R, Sugiyanto. 2007. Efek kemopreventif ekstrak *Gynura procumbens* (Lour), Merr pada karsinogenesis kanker payudara tikus. *MFI* 2007; 18(3): 154-161.
- Melendez-Colon,V., Luch,A., Seidel, A., and Baird, W. M., 1999. Cancer Initiation by Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Results from Formation of Stable DNA Adducts rather than Apurinic Sites. *Carcinogenesis* 20; (10), 1885-1891
- Morikawa, K., Nonaka, M., Narahara, M., Torii, I., Kawaguchi, K., Yoshikawa, T., Kumazawa, Y., and Morikawa, S., 2003, Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sci*, 2003; 26(6): 709-21.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B and Kinzler KW (1997) Activation of b-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in b-catenin or APC. *Science (Washington DC)*; 275: 1787-1790
- Mulyadi. 1997, *Kanker Karsinogen, Karsinogenesis dan Antikanker*. Yogyakarta: Tiara Wacana
- Mutasim MK,, Eltayb A, Hussain MD, Amr AN, Khalid MA, Lightfoot, Fadl E E. and Hany A, 2010. Active principle from *Moringa oleifera* Lam leaves effective against two leukemias and a hepatocarcinoma. *African Journal of Biotechnology*; Vol. 9(49), pp. 8467-8471.
- Nandakuma V, Singh T, and Katuiyar S. 2008. Mult-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. *Cancer Lett*; 269: 378-387.
- Norat T, Bingham S, Ferrari P, Slimani N, Jenab M, Mazuir M, Overvad K, Olsen A, Tjønneland A, Clavel F, Boutron-Ruault MC, Kesse E, Boeing H, Bergmann MM, Nieters A, Linseisen J, A.Trichopoulou, D.Trichopoulos, Y.Tountas, F.Berrino, D.Palli, S.Panico, R.Tumino, P.Vineis, H.B.Bueno-de-Mesquita, P.H.Peeters, D.Engeset, E.Lund, G.Skeie, E.Ardanaz, C.Gonzalez, C.Navarro, J.R.Quiros, M.J.Sanchez, G.Berglund, I.Mattisson, G.Hallmans, R.Palmqvist, N.E.Day, K.T.Khaw, T.J.Key, M.San Joaquin, B.Hemon, R.Saracci, R.Kaaks, E.Riboli. 2005. Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition, *J.Natl.Cancer Inst*; 97: 906-916.
- Ozdemir, I., Z. Selamoglu, B. Ates, Y. Gok and I. Yilmaz, 2007. Modulation of DMBA-induced biochemical changes by organoselenium compounds in blood of rats. *Indian J. Biochem. Biophys*; 44: 257-259.
- 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

- Pan, M. H., Chen, W. J., Shiao, S.Y.L., Ho, C.T., Lin, J.K., 2002, Tangeretin Induces Cell Cycle G1 Arrest through Inhibiting Cyclin Dependent Kinases 2 and 4 Activities as well as Elevating Cdk Inhibitor p21 and p27 in Human Colorectal Carcinoma Cell, *Carcinogenesis*; vol. 23: 1677-1684.
- Park CH, Chang JY, Hahm ER, Park S, Kim HK, Yang CH, 2005. Quercetin, A Potent Inhibitor Against Beta-Catenin/Tcf Signaling in SW480 Colon Cancer Cell. *Biochem Biophys Res Commun*; 328(1):227-34.**
- Parrotta JA. 2009. *Moringa oleifera Lam.* Reseda, horseradish tree. *Moringaceae*. Horseradish tree family, Forest Service, International Institute of Tropical Forestry Publication, 1 – 4.
- 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 Research* 2; (1):44-50.
- Patwardhan M. B, Samsa G. P, Michael M. A, Prosnitz R. G, Fisher D. A, Mantyh C. R. and 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
- Peifer M , Pai LM, Orsulic S, Bejsovec A. 1997. Negative regulation of Armadillo, a Wingless effector in *Drosophila*. *Development*,124:2255-66.
- Penwarden, Linda, RN, MSN, AOCN and Brigle, Kevin PhD, ANP. 2004. *Colorectal Cancer. Current Treatment and Future Directions. Oncology Nurse Practitioner, Massey Cancer Center at Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia.*
- Phillips. D.H. 2002. *Smoking-related DNA and protein adducts in human tissues, Carcinogenesis*; 23, 1979-2004
- Polakis, P. 2000. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*; 14: 1837-1851.
- Priyadarsini R. V, Murugan R. S., Nagini S. 2011. Aberrant activation of Wnt/b-catenin signaling pathway contributes to the sequential progression of DMBA-induced HBP carcinomas. *Oral Oncology*; 48: 33–39
- Puslitbanghorti, 2011. *Kelor : Pohon Kehidupan, Memerangi Malnutrisi* (Online) (<http://www.litbang.deptan.go.id/berita/one/1049/>) diakses tanggal 7 Desember 2011)
- Qiu W, Wang X, Leibowitz B, Liu H, Barker N, Okada H, Oue N, Yasui W, Clevers H, Schoen R. E, Yu J, and Zhang L. 2010. Chemoprevention by nonsteroidal anti-inflammatory drugs eliminates oncogenic intestinal stem cells via SMAC-dependent apoptosis. *PNAS November 16*; vol. 107 no. 46 : 20027–20032
- Rahmahani FN, 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 α anthracene).* Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Robbins, Kumar, Cotran, 2004. *Buku Ajar Patologi Edisi 7.* Jakarta:ECG
- Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S and Polakis P. 1996. Binding of GSK3b to the APC-b-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science*; 272: 1023–1026

- Russo GL. 2007. Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. *Biochem Pharmacol.*;74:533–544.
- Russo IH, Russo J. 1996. Mammary gland neoplasia in long term rodent studies. *Environ Health Perspect*; 104 (9): 938-967.
- Sari, Puspita; Alam, Gemini; Sartini, 2011. *Analisis Kandungan Polifenol Dari Hasil Fermentasi Paecilomyces sp Isolat Fungi Endofit Kulit Buah Kakao (Theobroma cacao L.)*
- Schmalhausen, E. V., Zhlobek, E. B., Shalova, I. N., Firuzi, O., Saso, L., and Muronetz, V. I., 2007, Antioxidant and prooxidant effects of quercetin on glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase. *Food and Chemical Toxicology*; 45: 1988–93
- Shan Bao-En, Ming-Xia Wang, and Run-qing Li. 2009. Quercetin Inhibit Human SW480 Colon Cancer Growth in Association with Inhibition of Cyclin D1 and Survivin Expression through Wnt/β-Catenin Signaling Pathway *Cancer Investigation*; 27:604–612
- Siddhuraju P, Becker K. 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J Agric.Food. Chem.*; 51: 2144-2155.
- Sidow, A. 1992. Diversification of the *Wnt* gene family on the ancestral lineage of vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 89:5098–5102.
- Siregar, G. A. 2008. Deteksi Dini Dan Penatalaksanaan Kanker Usus Besar Soeripto, Indrawati, Indrayanti, 2003. Gastro-intestinal Cancer in Indonesia. *Asian Pac J Cancer Prev. Aug-Dec*; 4(4):289-96.
- Solimun. 2001. *Diktat Metodologi Penelitian LKIP dan PKM Kelompok Agrokopleks*. Malang: Universitas Brawijaya
- Sreelatha S, Jeyachitra A, Padma PR. 2011. *Antiproliferation and induction of apoptosis by Moringa oleifera leaf extract on human cancer cells*. Faculty of Science, National University of Singapore. *Food Chem Toxicol*; 49(6):1270-5.
- Sudhir S, Mukesh V and Donald EH. 2001. Biomarkers for Early Detection of Colon Cancer. *Clin Cancer Res*;7:1118-1126.
- Susilowati S, Meiyanto E, Taminatun S, Murwanti R, Sugiyanto. 2007. Efek kemopreventif ekstrak *Gynura procumbens* (Lour), Merr pada karsinogenesis kanker payudara tikus. *MFI*; 18(3): 154-161.
- Takahashi M, Wakabayashi H. 2004. Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci*; 95: 475-480.
- Tetsu O, McCormick F. 1999. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, 398:422-426.
- Van Nostrand Reinhold Co. 1981. *Genetics and Breast Cancer*, 1st ed. New York
- Weimer, T. L., Reddy, A. P., Harttig, U., Alexander, D., Stamm, S. C., Miller, M. R., Baird, W., Hendricks, J., and Bailey, G., 2000. Influence of b-Naphthoflavone on 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene Metabolism, DNA Adduction, and Tumorigenicity in Rainbow Trout. *Toxicological Sciences*; 57: 217-228.

- WHO, 2003. Case-Study Indonesia (Online) (http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9241562498_Indonesia.pdf, diakses tanggal 1 Januari 2012)
- WHO, 2012. Cancer ,(online), (<http://www.who.int/cancer/en/>, diakses tanggal 5 Desember 2011)
- Xueling, Wang, 2010. Role of Wnt Canonical Pathway in Hematological Malignancies. *Journal of Hematology and Oncology*; 3:33.



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



LAMPIRAN

Lampiran 1: Metode IHK

Bahan :

- Xylene
- Ethanol 100%
- Ethanol 90%
- Ethanol 80%
- Ethanol 70%
- 1x PBS (*Phosphate Buffer Saline*) pH 7,4
- 3% H₂O₂
- Akuades / *distilled* H₂O
- BSA 1%
- Antibody
- DAB
- H₂O₂
- counterstain
- Air kran / H₂O
- Entelan
- Sampel Jaringan

Alat :

- Mikropipet
- Blue tip, yellow tip, white tip
- Tissue
- Falcon 15ml, tube 2ml
- Cover glass
- Mikroskop
- Vortex

Langkah - langkah :

Deparafinasi dan rehidrasi



- Xylol selama 5 menit
- Alkohol 100% selama 5 menit
- Alkohol 90% selama 3 menit
- Alkohol 80% selama 3 menit
- Alkohol 70% selama 3 menit

- Cuci dengan PBS (3 x 5 menit)
- ↓
- H₂O₂ 3% selama 20 menit
- ↓
- Bilas dengan 1x PBS, buang sisa cairan dan keringkan slide di sekitar specimen dengan hati-hati
- ↓
- Blocking dengan BSA 1% selama 30 menit
- ↓
- Bilas dengan PBS (3 x 5 menit)
- ↓
- Segera beri antibodi primer *cyclin D1* pada suhu 37⁰C selama 1 jam
- ↓
- Bilas dengan PBS (3 x 5 menit), buang sisa cairan dan keringkan slide di sekitar specimen dengan hati-hati
- ↓
- Segera beri Antibody Sekunder selama 1 jam
- ↓
- Bilas dengan PBS (2 x 5 menit), buang sisa cairan dan keringkan slide di sekitar specimen dengan hati-hati
- ↓
- SA-HRP 60 menit
- ↓
- Bilas dengan PBS (2 x 5 menit),,, buang sisa cairan dan keringkan slide di sekitar specimen dengan hati-hati
- ↓
- DAB Solution (DAB + H₂O₂ / Urea) selama 20 menit
- ↓
- Bilas slide dengan H₂O dan keringkan
- ↓
- Control staining mayer, hematoxilen selama 10 detik
- ↓
- Bilas dengan air

Keringkan slide dengan tissue



Mounting dengan entelan.

Lampiran 2 : Tabel Rata-rata Jumlah Ekspresi Cyclin D1

Report

Jumlah_Cyclin_D1

Perlakuan	Mean	Std. Deviation
Kontrol negatif	2.75	.957
Kontrol positif	6.75	.957
Kelor 20 mg/kgBB/hari	5.00	.816
Kelor 40 mg/kgBB/hari	2.75	.957
Kelor 80 mg/kgBB/hari	2.25	1.258
Total	3.90	1.971

Lampiran 3 : Tabel Uji Normalitas

Tests of Normality

Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Jumlah_Cyclin_D1 Kontrol negatif	.283	4	.	.863	4	.272
Kontrol positif	.283	4	.	.863	4	.272
Kelor 20 mg/kgBB/hari	.250	4	.	.945	4	.683
Kelor 40 mg/kgBB/hari	.283	4	.	.863	4	.272
Kelor 80 mg/kgBB/hari	.329	4	.	.895	4	.406

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 4 : Tabel Uji Homogenitas Varian**Test of Homogeneity of Variances**

Jumlah_Cyclin_D1

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.269	4	15	.894

Lampiran 5 : Tabel Uji ANOVA**ANOVA**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	58.800	4	14.700	14.700	.000
Within Groups	15.000	15	1.000		
Total	73.800	19			

Lampiran 6 : Tabel Uji Tukey HSD**Multiple Comparisons**

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol negatif	Kontrol positif	-4.000*	.707	.000	-6.18	-1.82
	Kelor 20 mg/kgBB/hari	-2.250*	.707	.042	-4.43	-.07
	Kelor 40 mg/kgBB/hari	.000	.707	1.000	-2.18	2.18
	Kelor 80 mg/kgBB/hari	.500	.707	.952	-1.68	2.68
Kontrol positif	Kontrol negatif	4.000*	.707	.000	1.82	6.18
	Kelor 20 mg/kgBB/hari	1.750	.707	.149	-.43	3.93



Kelor	40	4.000*	.707	.000	1.82	6.18		
Kelor	80	4.500*	.707	.000	2.32	6.68		
Kelor	20	Kontrol negatif	2.250*	.707	.042	.07	4.43	
mg/kgBB/hari		Kontrol positif	-1.750	.707	.149	-3.93	.43	
Kelor	40	2.250*	.707	.042	.07	4.43		
mg/kgBB/hari		Kelor	80	2.750*	.707	.011	.57	4.93
Kelor	40	Kontrol negatif	.000	.707	1.000	-2.18	2.18	
mg/kgBB/hari		Kontrol positif	-4.000*	.707	.000	-6.18	-1.82	
Kelor	20	2.250*	.707	.042	-4.43	-.07		
mg/kgBB/hari		Kelor	80	.500	.707	.952	-1.68	2.68
Kelor	80	Kontrol negatif	-.500	.707	.952	-2.68	1.68	
mg/kgBB/hari		Kontrol positif	-4.500*	.707	.000	-6.68	-2.32	
Kelor	20	2.750*	.707	.011	-4.93	-.57		
mg/kgBB/hari		Kelor	40	-.500	.707	.952	-2.68	1.68

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

Lampiran 7 : Tabel Uji *Homogenous Subsets***Jumlah_Cyclin_D1**

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Kelor 80 mg/kgBB/hari	4	2.25	
Kontrol negatif	4	2.75	
Kelor 40 mg/kgBB/hari	4	2.75	
Kelor 20 mg/kgBB/hari	4		5.00
Kontrol positif	4		6.75
Sig.		.952	.149

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Edah Humaidah

NIM : 0910710062

Program Studi : Program Studi Pendidikan Dokter

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya,

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 18 Februari 2013

Yang membuat pernyataan

(Edah Humaidah)

NIM. 0910710062