



**PENGARUH SARI KEDELAI (*Glycine max* L.) TERHADAP APOPTOSIS  
SEL KANKER HEPAR PADA TIKUS WISTAR (*Rattus norvegicus*)  
YANG DIINDUKSI 7,12-Dimetilbenz(a)antrasen (DMBA)**

**SKRIPSI**

Oleh

**Mochamad Faliqul Ishbah**

**NIM 082010101019**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2012**



**PENGARUH SARI KEDELAI (*Glycine max* L.) TERHADAP APOPTOSIS  
SEL KANKER HEPAR PADA TIKUS WISTAR (*Rattus norvegicus*)  
YANG DIINDUKSI 7,12-Dimetilbenz(a)antrasen (DMBA)**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk  
menyelesaikan Program Studi Ilmu Kedokteran (S1)  
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

**Mochamad Faliqul Ishbah**  
**NIM 082010101019**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**  
**UNIVERSITAS JEMBER**  
**2012**

## **PERSEMBAHAN**

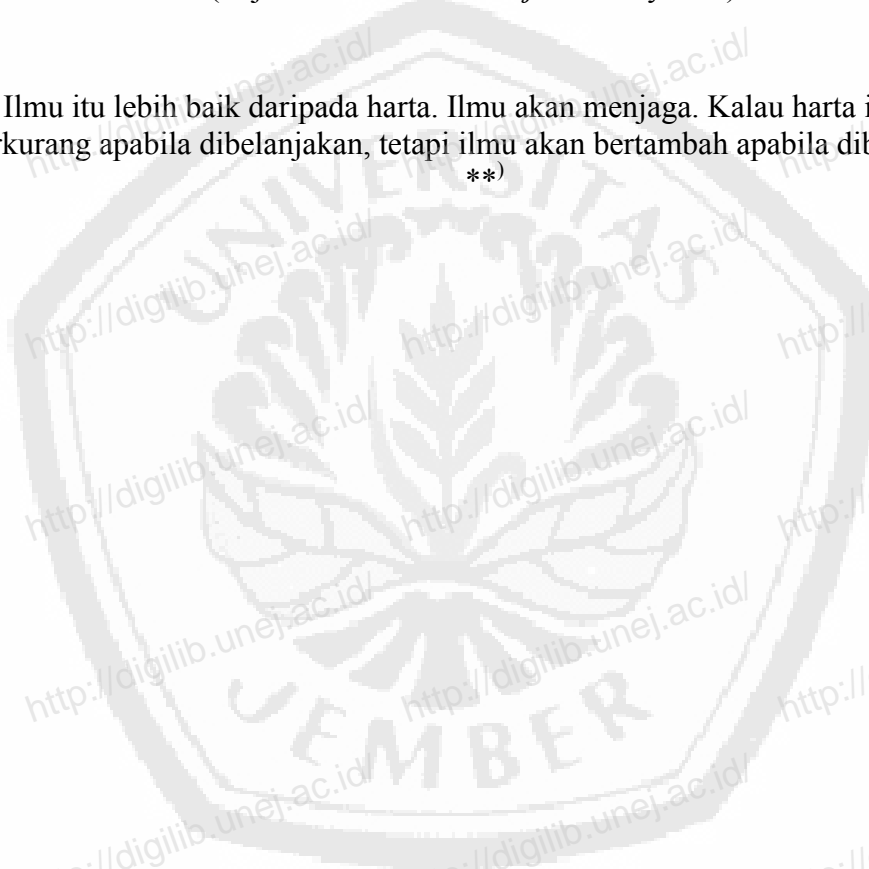
Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT, atas ridho dan amanah-Nya sehingga saya bisa mendapatkan kesempatan untuk belajar semua ilmu yang luar biasa ini. Semoga barokah atas semua yang saya kerjakan selama ini;
2. Ibunda Dwi Setyowati tercinta yang senantiasa memberikan do'a, dukungan, bimbingan dan kasih sayang tiada henti, serta pengorbanan yang telah dilakukan untukku setiap waktu;
3. Bapakku Mislan yang telah memberikan pengorbanan dan pengalaman hidup berharga selama ini;
4. Adikku Meida Irbah F. yang selalu memberiku semangat dan senyum setiap saat;
5. Arini Tri Kusumawati yang telah memberiku pengertian dan semangat;
6. Guru-guruku tercinta, yang telah memberikan ilmu dan mendidikku dengan susah dan penuh kesabaran untuk menjadikanku manusia yang berilmu dan bertakwa;
7. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas seluruh kesempatan menimba ilmu yang berharga ini;
8. Saudara sejawat 2008 untuk suka duka, kekompakan dan keceriaan bersama.

## MOTO

Niscaya Allah akan mengangkat (derajat) orang-orang yang beriman di antaramu dan orang-orang yang diberi ilmu beberapa derajat. (terjemahan Surat *Al-Mujadalah* ayat 11)\*)

Ilmu itu lebih baik daripada harta. Ilmu akan menjaga. Kalau harta itu akan berkurang apabila dibelanjakan, tetapi ilmu akan bertambah apabila dibelanjakan. (\*\*)



---

\*<sup>)</sup>Departemen Agama RI Al-Hikmah. 2005. *Al-Quran dan Terjemahnya*.  
Bandung: Diponegoro.

\*\*<sup>)</sup> Sayidina Ali bin Abi Thalib

## PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Mochamad Faliqul Ishbah

NIM : 082010101019

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah saya yang berjudul “Pengaruh Sari Kedelai (*Glycine max* L.) terhadap Apoptosis Sel Kanker Hepar pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi 7,12-Dimetilbenz(a)antracen (DMBA)” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata pernyataan ini tidak benar.

Jember, 7 Juni 2012

Yang menyatakan,

Mochamad Faliqul Ishbah

NIM 082010101019

**SKRIPSI**

**PENGARUH SARI KEDELAI (*Glycine max*) TERHADAP APOPTOSIS  
SEL KANKER HEPAR PADA TIKUS WISTAR (*Rattus norvegicus*)  
YANG DIINDUKSI 7,12-Dimetilbenz(a)antrasen (DMBA)**

Oleh

Mochamad Faliqul Ishbah  
NIM 082010101019

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : dr. Heni Fatmawati, M. Kes.

Dosen Pembimbing Anggota : dr. M. Ihwan Narwanto, M.Sc.

## PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pengaruh Sari Kedelai (*Glycine max* L.) terhadap Apoptosis Sel Kanker Hepar pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi 7,12-Dimetilbenz(a)antrasen (DMBA)” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Universitas Jember pada:

hari, tanggal : 7 Juni 2012

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Penguji I,

dr. Dina Helianti, M. Kes  
NIP.19741104 200012 2 001

Penguji III,

dr. Heni Fatmawati, M.Kes.  
NIP.19760212 200501 2 001

Penguji II,

dr. Nindya Shinta R.,M.Ked  
NIP.19780831 200501 2 001

Penguji IV,

dr. M. Ihwan Narwanto,M.Sc.  
NIP.19800218 200501 1 001

Mengesahkan,  
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember

dr. Enny Suswati, M.Kes  
NIP. 19700214 199903 2 001

## RINGKASAN

**Pengaruh Sari Kedelai (*Glycine max L.*) terhadap Apoptosis Sel Kanker Hepar pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi 7,12 Dimetilbenz(a) antrasen (DMBA); Mochamad Faliqul Ishbah; 082010101019; 2012: 66 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.**

Kanker hati adalah tumor ganas yang menyebabkan kerusakan bentuk dan fungsi organ hati (Depkes RI, 2006). Penemuan suatu agen pencegah kanker yang berasal dari alam kian diminati oleh masyarakat karena bahan alam tidak berbahaya bagi tubuh mengingat terapi kanker yang selama ini memiliki efek samping yang sangat berbahaya terhadap tubuh kita. Untuk itu diperlukan suatu usaha dalam rangka menggali potensi alam khususnya di Indonesia sebagai alternatif pengobatan kanker terutama sebagai agen kemopreventif (Molteni, 1995).

Salah satu komponen yang terdapat dalam kedelai yang bersifat anti kanker yaitu isoflavon. Mekanisme anti kanker dari isoflavon adalah menghambat aktivitas enzim penyebab kanker, aktivitas anti oksidan dan meningkatkan fungsi kekebalan sel (Koswara, 2006). Berdasarkan hal tersebut, kedelai berpotensi sebagai agen kemopreventif baru untuk kanker hepar, maka dilakukan penelitian ilmiah lebih lanjut untuk mengetahui apakah sari kedelai (*Glycine max L.*) mempunyai pengaruh terhadap apoptosis sel kanker hepar pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi 7,12-Dimetilbenz (a)antrasen (DMBA).

Jenis penelitian ini adalah *true experimental laboratories* (Pratiknya, 2003) dengan desain *Post Test Only Control Group Design*. Sebanyak 25 sampel dikelompokkan dengan menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) (Notoatmodjo, 2002) menjadi 5 kelompok, yaitu kontrol negatif (pur dan aquadest) dan kontrol positif (DMBA), P<sub>1</sub> (sari kedelai dosis 5 mg/hari), P<sub>2</sub> (sari kedelai dosis 10 mg/hari), dan P<sub>3</sub>(sari kedelai dosis 20 mg/hari).



Data hasil penelitian didapatkan rerata kelompok K- adalah 15,60 dan kelompok K+ adalah 23,80. Sedangkan untuk kelompok P<sub>1</sub> rerata sebesar 26,80 kemudian untuk kelompok P<sub>2</sub> rerata sebesar 29,80 dan kelompok P<sub>3</sub> rerata sebesar 45,60.

Berdasarkan penelitian ini sari kedelai (*Glycine max* L.) terbukti mempunyai pengaruh terhadap apoptosis sel kanker hepar, yaitu dapat meningkatkan apoptosis sel kanker hepar pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA dan didapatkan adanya pengaruh pemberian dosis sari kedelai terhadap apoptosis sel kanker hepar yang paling efektif dalam penelitian ini adalah sebesar 20 mg/hari.



## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat ALLAH SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Sari Kedelai (*Glycine max* L.) terhadap Apoptosis Sel Kanker Hepar pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi 7,12-Dimetilbenz(a)antrasen (DMBA)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

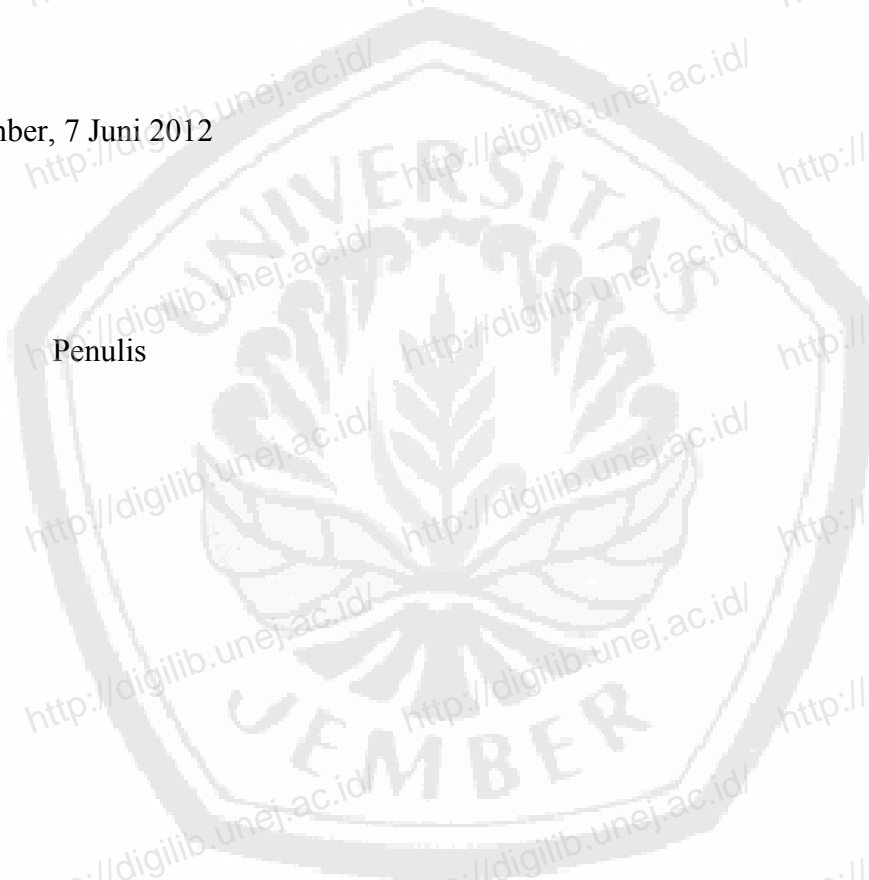
1. dr. Enny Suswati, M. Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas segala fasilitas dan kesempatan yang diberikan selama menempuh pendidikan kedokteran di Universitas Jember;
2. dr. Heni Fatmawati, M. Kes selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. M. Ihwan Narwanto, M. Sc selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan perhatiannya dalam penulisan tugas akhir ini;
3. dr. Dina Helianti, M. Kes selaku Dosen Penguji I dan dr. Nindya Shinta Rumastika, M. Ked selaku Dosen Penguji II yang telah memberikan nasihat dan koreksi yang membangun dalam penulisan tugas akhir ini;
4. Rekan kerjaku, Delina, Marsel, Dhea, Yudha, Raras, Natha, Alfa, Ellen, Taufiq, Amin, dan Rahde yang telah telah membantu dan selalu memberikan dorongan serta semangat;
5. Teman-teman angkatan 2008 tercinta yang telah berjuang bersama-sama demi sebuah gelar Sarjana Kedokteran;
6. Sahabat – sahabatku MABES 08 Mastrip II 73 yang selalu berbagi tawa dan canda serta kekeluargaan yang hebat;

7. Analis Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Gigi Univeritas Jember, Mas Agus, terima kasih atas bantuan dan kerjasamanya, dukungan serta masukan selama penelitian skripsi ini;
8. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 7 Juni 2012

Penulis



## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	i
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	v
<b>HALAMAN BIMBINGAN</b> .....	vi
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>PRAKATA</b> .....	x
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xvi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	2
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	2
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
<b>2.1 Hepar</b> .....	4
2.1.1 Anatomi Hepar.....	4
2.1.2 Vaskularisasi, Inervasi, dan Aliran Limfatik Hepar..	5
2.1.3 Histologi Hepar.....	6
2.1.4 Fisiologi Hepar.....	9
2.1.5 Anatomi <i>Rattus norvegicus</i> .....	9
<b>2.2 Kanker Hepar</b> .....	13
2.2.1 Epidemiologi.....	13
2.2.2 Etiologi dan Faktor Resiko.....	14
2.2.3 Klasifikasi dan Karakteristik.....	16
2.2.4 Manifestasi Klinis.....	17
2.2.5 Standart Diagnosis, stadium klinis dan prognosis.....	18
<b>2.3 DMBA(7,12–dimethylbenz(a)anthracene)</b> .....	19
2.3.1 Definisi DMBA.....	19
2.3.2 Mekanisme kerja DMBA.....	19
<b>2.4 Tanaman Kedelai (<i>Glycine max L.</i>)</b> .....	20

2.4.1	Taksonomi Kedelai .....	21
2.4.2	Deskripsi Tanaman Kedelai .....	21
<b>2.5</b>	<b>Kandungan dan Manfaat Kedelai pada Kanker Hepar...</b>	<b>22</b>
<b>2.6</b>	<b>Apoptosis Sel Abnormal</b> .....	<b>25</b>
<b>2.7</b>	<b>Kerangka Konseptual</b> .....	<b>30</b>
<b>2.8</b>	<b>Hipotesis Penelitian</b> .....	<b>31</b>
<b>BAB 3.</b>	<b>METODE PENELITIAN</b> .....	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>Jenis Penelitian</b> .....	<b>32</b>
<b>3.2</b>	<b>Rancangan Penelitian</b> .....	<b>32</b>
<b>3.3</b>	<b>Estimasi Jumlah Subjek Penelitian</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4</b>	<b>Tempat dan Waktu Penelitian</b> .....	<b>34</b>
3.4.1	Tempat Penelitian.....	34
3.4.2	Waktu Penelitian .....	34
<b>3.5</b>	<b>Variabel Penelitian</b> .....	<b>35</b>
<b>3.6</b>	<b>Definisi Operasional Variabel</b> .....	<b>35</b>
<b>3.7</b>	<b>Alat dan Bahan</b> .....	<b>36</b>
3.7.1	Alat .....	36
3.7.2	Bahan .....	36
<b>3.8</b>	<b>Prosedur Penelitian</b> .....	<b>36</b>
3.8.1	Pemeliharaan Hewan Coba.....	36
3.8.2	Perlakuan Hewan Coba.....	37
3.8.3	Pengambilan dan Penyimpanan Jaringan Hepar.....	38
3.8.4	Pembuatan Sediaan Apoptosis Jaringan Hepar.....	38
3.8.5	Pewarnaan Sel Apoptosis dengan <i>Terminal</i> <i>Transferase and Biotin-16-dUTP (TUNEL</i> <i>Fluorescent Method)</i> .....	38
3.8.6	Pengamatan dan Penghitungan Apoptosis Jaringan Hepar.....	39
<b>3.9</b>	<b>Analisis Data Penelitian</b> .....	<b>40</b>
<b>3.10</b>	<b>Alur Penelitian</b> .....	<b>41</b>
<b>BAB 4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>Hasil Penelitian</b> .....	<b>42</b>
4.1.1	Data Hasil Penelitian.....	42
4.1.2	Hasil Uji Analisis.....	45
<b>4.2</b>	<b>Pembahasan</b> .....	<b>48</b>
<b>BAB 5.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	<b>54</b>
<b>5.1</b>	<b>Kesimpulan</b> .....	<b>54</b>
<b>5.2</b>	<b>Saran</b> .....	<b>54</b>
	<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	<b>55</b>
	<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>60</b>

## DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Klasifikasi Ilmiah <i>Rattus norvegicus</i> .....	11
2.2 Karakteristik klinis dan patologi karsinoma hepatoselular dan karsinoma kolangioselular.....	17
2.3 Komposisi Kedelai per 100 gram Bahan.....	22
2.4 Perbandingan Protein Kedelai dengan Beberapa Bahan Makanan Lain.....	23
2.5 Perbedaan Sel Akibat Apoptosis dan Nekrosis.....	29
3.1 Kelompok Perlakuan Sampel dalam Penelitian.....	37
4.1 Rerata jumlah gambaran apoptosis sel kanker hepar pada tiap Kelompok.....	42
4.2 Tes Normalitas.....	45
4.3 Tes Homogenitas.....	46
4.4 Uji Anova.....	46
4.5 Uji <i>Post Hoc</i> -Tukey HSD.....	47

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Anatomi Hepar .....	4
2.2 Histologi Hepar secara Mikros perbesaran 100 .....	8
2.3 Anatomi <i>Rattus norvegicus</i> .....	12
2.4 Anatomi <i>Rattus norvegicus</i> .....	13
2.5 Apoptosis Sel Hepatosit .....	26
2.6 Apoptosis <i>Pathways</i> .....	28
3.1 Skema Rancangan Penelitian .....	33
3.2 Skema Alur Penelitian .....	41
4.1 Diagram Rerata Gambaran Apoptosis Sel Kanker Hepar .....	43
4.2 Gambaran histopatologi hasil pewarnaan imunohistokimia, metode TUNEL dari sel hepar <i>Rattus norvegicus</i> .....	44

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Cara Pewarnaan Sel Apoptosis dengan <i>Terminal Transferase and Biotin-16-dUTP (TUNEL Fluorescent Method)</i> .....	60
B. Hasil Tes Normalitas Sampel ( <i>One-Sample Kolmogorov-Smirnov</i> ) Test.....	61
C. Hasil Tes Homogenitas Sampel ( <i>Levene Statistic</i> ).....	62
D. Uji Analisis Variansi Satu Arah ( <i>One Way ANOVA</i> ).....	63
E. Uji <i>Post Hoc (Tukey-HSD)</i> .....	64
F. Hasil Penghitungan Apoptosis.....	65
G. Foto Dokumentasi Penelitian.....	66



## **BAB 1. PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Sel kanker adalah sel yang tumbuh secara tidak teratur, abnormal, tumbuh tidak terkontrol, dan dapat bermetastasis dari tempatnya tumbuh ke jaringan di dekatnya dan membentuk massa pada daerah baru di dalam tubuh (Rochestry Sofyan, 2000). Kanker hati adalah tumor ganas yang menyebabkan kerusakan bentuk dan fungsi organ hati. *Incidence rate* (IR) kanker hati di dunia tahun 2000 yaitu 9 per 100.000 penduduk dengan CFR 96,85%. IR kanker hati di Indonesia tahun 2002 pada pria 20 per 100.000 penduduk sedangkan pada wanita IR 6 per 100.000 penduduk. Di Indonesia, pada tahun 2002 IR kanker hati di Indonesia pada pria 20 per 100.000 penduduk dengan *Sex Spesific Death Rate* (SSDR) 17 per 100.000 penduduk sedangkan pada wanita IR 6 per 100.000 penduduk dengan SSDR 5 per 100.000 penduduk. Berdasarkan sepuluh peringkat utama penyakit kanker di beberapa rumah sakit di Indonesia tahun 2005, pada pasien rawat inap kanker hati berada di urutan ketiga dengan jumlah penderita kanker hati 4.177 orang (12,22%) sedangkan pada pasien rawat jalan kanker hati berada di urutan kelima dengan jumlah penderita 1364 orang (4,55%) (Depkes RI, 2006).

Upaya pengobatan untuk penyakit kanker sudah dilakukan oleh sebagian masyarakat untuk mengobati kanker seperti dengan pembedahan, radiasi, maupun kemoterapi. Penemuan suatu agen pencegah kanker yang berasal dari alam kian diminati oleh masyarakat karena bahan alam tidak berbahaya bagi tubuh mengingat terapi kanker yang selama ini memiliki efek samping yang sangat berbahaya terhadap tubuh kita. Untuk itu diperlukan suatu usaha dalam rangka menggali potensi alam khususnya Indonesia sebagai alternatif pengobatan kanker terutama sebagai agen kemopreventif (Molteni, 1995).

Kedelai mengandung isoflavon yang diyakini dapat digunakan dalam pengobatan kanker. Isoflavon yang termasuk senyawa fitoestrogen dalam kedelai berfungsi sebagai regulator signal transduksi menghambat enzim 5-alfa reduktase,

menaikkan *Sex Hormone Binding Globulin* (SHBG), mengurangi tirosin yang bekerja spesifik terhadap aktivitas protein kinase, dan mengurangi aktivitas P450 aromatase (Molteni, 1995). Mekanisme yang banyak diketahui sebagai anti kanker dari isoflavon adalah aktivitas anti estrogen, menghambat aktivitas enzim penyebab kanker, aktivitas anti oksidan dan meningkatkan fungsi kekebalan sel (Koswara, 2006).

Berdasarkan hal tersebut, penulis ingin melakukan penelitian mengenai “Pengaruh Sari Kedelai (*Glycine max* L.) terhadap Apoptosis Sel Kanker Hepar pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi 7,12 Dimetilbenz(a) antrasen (DMBA)”.

### 1.2 Rumusan Masalah

- a. Bagaimana pengaruh sari kedelai (*Glycine max* L.) terhadap apoptosis sel kanker hepar pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA?
- b. Bagaimana pengaruh perbedaan pemberian dosis sari kedelai (*Glycine max* L.) 5 mg/hari, 10 mg/hari, dan 20 mg/hari terhadap apoptosis sel kanker hepar pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA?

### 1.3 Tujuan Penelitian

- a. Untuk mengetahui pengaruh sari kedelai (*Glycine max* L.) terhadap apoptosis sel kanker hepar pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA.
- b. Untuk mengetahui pengaruh perbedaan pemberian dosis sari kedelai (*Glycine max* L.) 5 mg/hari, 10 mg/hari, dan 20 mg/hari terhadap apoptosis sel kanker hepar pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA.

#### 1.4 Manfaat Penelitian

- a. Hasil penelitian ini dapat menjadi pertimbangan pemilihan sari kedelai (*Glycine max* L.) sebagai agen kemopreventif alami untuk kanker hepar.
- b. Memberikan sumbangan terhadap ilmu pengetahuan dan teknologi kedokteran tentang efek antikanker sari kedelai (*Glycine max* L.).
- c. Dapat digunakan sebagai dasar penelitian lebih lanjut tentang pengaruh antikanker sari kedelai (*Glycine max* L.).
- d. Memberikan informasi dan pengetahuan untuk masyarakat mengenai kanker hepar dan cara pencegahannya.

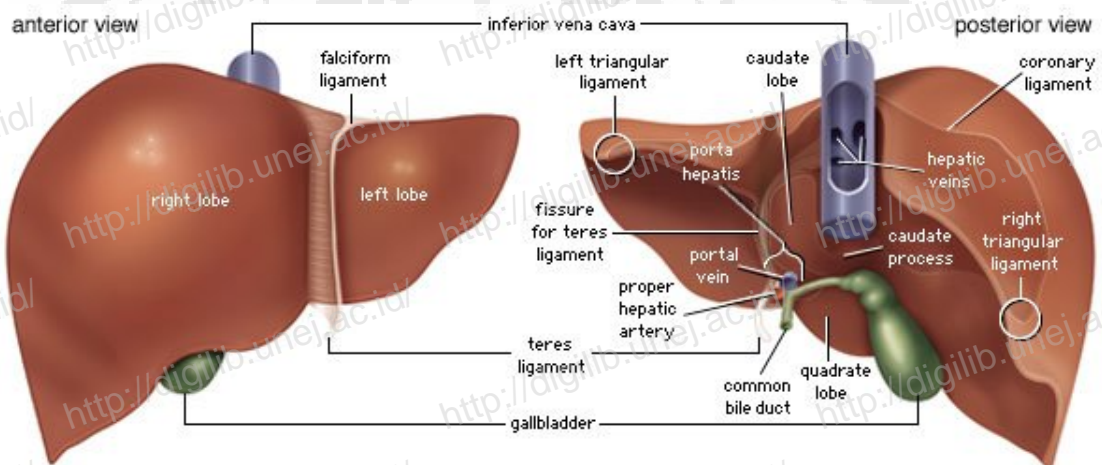


## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Hepar

Hepar atau hati adalah kelenjar tubuh manusia terbesar yang beratnya sekitar 2 % berat badan pada orang dewasa dan 5 % berat badan pada bayi. Pada kebanyakan orang hidup organ ini merupakan organ lunak yang berwarna kemerahan (Tanudjaja dan George, 2008). Hepar adalah kelenjar besar berwarna merah gelap terletak di bagian atas abdomen sisi kanan (Dorland, 2002).

#### 2.1.1 Anatomi Hepar



Gambar 2.1 Anatomy of Liver (Sumber: *Encyclopædia Britannica*, 2003)

Hepar merupakan kelenjar yang terbesar dalam tubuh manusia. Hepar pada manusia terletak pada bagian atas *cavum abdominis*, di bawah diafragma, di kedua sisi kuadran atas, yang sebagian besar terdapat pada sebelah kanan. Beratnya 1200 – 1800 gram, dengan permukaan atas terletak bersentuhan di bawah diafragma, permukaan bawah terletak bersentuhan di atas organ-organ abdomen. Batas atas hati berada sejajar dengan ruang interkosta V kanan dan batas bawah menyerong ke atas dari iga IX kanan ke iga VIII kiri (Amirudin, 2007).

Permukaan anterior yang cembung pada hepar dibagi menjadi 2 lobus oleh adanya perlekatan ligament falsiform yaitu lobus kiri dan lobus kanan yang berukuran kira – kira 2 kali lobus kiri. Pada daerah antara ligamentum falsiform dengan kandung empedu di lobus kanan kadang – kadang dapat ditemukan lobus kaudatus yang biasanya tertutup oleh vena kava inferior dan ligamentum venosum pada permukaan posterior (Amirudin, 2007).

Hepar difiksasi secara erat oleh tekanan intraabdominal dan dibungkus oleh peritoneum kecuali di daerah posterior-superior yang berdekatan dengan vena kava inferior dan mengadakan kontak langsung dengan diafragma. Bagian yang tidak diliputi oleh peritoneum disebut *bare area*. Terdapat refleksi peritoneum dari dinding abdomen anterior, diafragma dan organ-organ abdomen ke hepar berupa ligamen (Tortora, 2006).

#### 2.1.2 Vaskularisasi, Inervasi dan Aliran Limfatik Hepar

Hepar mendapat pasokan darah ganda dari arteri hepatica (30 %) dan vena porta (70 %). Arteri hepatica berisikan darah arterial yang mengandung oksigen, sedang vena porta mengangkut darah venosa yang mengandung hasil – hasil pencernaan yang diabsorpsi dari traktus gastrointestinalis. Darah arterial diangkut ke vena sentralis dari masing – masing lobules hepatis. Venae sentralis mengalirkan darahnya ke dalam venae hepatica yang bermuara ke dalam vena inferior. Arteri hepatica (*propria*) adalah salah satu cabang arteri hepatica komunis yang berasal dari trunkus koeliakus yang adalah salah satu cabang aorta abdominalis untuk organ traktus gastrointestinalis yang asalnya dari bagian kranial usus (Tanudjaja N, George, 2008).

Di dekat porta hepatis arteri hepatica *propria* membagi diri menjadi cabang – cabang terminal kiri dan kanan yang disebut arteri hepatica sinistra dan arteri hepatica dextra. Vena porta dibentuk oleh persatuan vena mesenterika superior dan vena lienalis di posterior collum pankreatis. Pada ujung kanan porta hepatis vena porta berakhir dengan membagi diri menjadi dua buah trunkus sinistra dan trunkus dextra. Vena hepatica yang mengalirkan darah dari hepar dibentuk oleh persatuan vv. Sentralis lobuli hepatis, lalu bermuara ke dalam vena kava inferior

tepat di kaudal diaphragm. Ada dua kelompok vv. hepatica yaitu kelompok superior vv. Hepatica terdiri atas hanya vena kanan dan vena kiri, tetapi biasanya ada vena tengah yang asalnya dari lobules kaudatus. Kelompok inferior terdiri atas 6 – 18 venae kecil yang mengalirkan darah dari lobus hepatis dexter dan juga sebagian kaudatus (Tanudjaja dan George, 2008).

Aliran limfe hepar dalam beberapa jurusan, yaitu:

1. Bagian cranial dan anterior facies diaphragmatica hepatis melalui ligamentum falciforme menuju caudal ke lymphonodi parasternales.
2. Facies viceralis hepatis dan bagian – bagian dalam hepar mengalir ke dalam lymphonodi hepatic pada porta hepatis, ke dalam lymphonodi gastric melalui omentum minus.
3. Area nuda hepatis mengalir ke dalam lymphonodi diaphragmatici medii pada facies superior diaphragmatici, dan juga ke dalam lymphonodi.

Kebanyakan limfe dari hepar akhirnya mengalir ke dalam ductus thoracicus. Diperkirakan sampai separuh dari limfe yang masuk ke dalam ductus thoracicus asalnya dari hepar (Tanudjaja dan George, 2008).

Saraf – saraf yang menuju ke hepar mengandung serabut – serabut simpatis maupun serabut – serabut parasimpatis (nervus vagus). Saraf ini mencapai hepar melalui plexus nervosus hepaticus, yang derifat terbesarnya adalah plexus coeliacus, yang juga menerima serabut – serabut halus (filament) dari nervus vagus ( N.X) sinister, N.X dexter dan nervus phrenicus dexter (Tanudjaja dan George, 2008).

### 2.1.3 Histologi Hepar

Hepar secara mikroskopis terdiri atas bermacam–macam sel, hepatosit meliputi 60% sel hati, sedangkan sisanya terdiri atas sel–sel epitelial sistem empedu dalam jumlah yang bermakna dan sel–sel non–parenkimal yang termasuk di dalamnya endotelium, sel kupffer, dan sel steallata yang berbentuk seperti bintang (Amirudin, 2007).

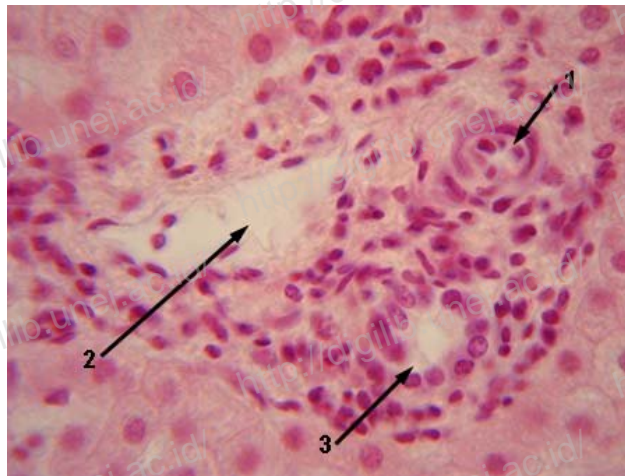
Pembungkus hepar atau yang disebut stroma terdiri atas simpai yang tebal, berasal dari serabut kolagen dan jaringan elastis yang disebut kapsul Glisson.

Kapsul Glisson ini menebal di hilus, tempat vena porta dan arteri hepatica memasuki hati dan keluarnya duktus hepatica kiri dan kanan serta pembuluh limfe dari hati (Junqueira, 2007).

Komponen utama struktural hati adalah sel-sel hati atau hepatosit. Sel-sel epitelnya berkelompok membentuk lempeng-lempeng yang saling berhubungan dan tampak struktur lobulus hati dengan menggunakan mikroskop cahaya. Lobulus hati dibentuk oleh masa poligonal jaringan dan pada daerah perifer masing-masing lobulus dipisahkan oleh jaringan ikat yang mengandung duktus biliaris, pembuluh limfe, saraf, dan pembuluh darah. Daerah ini disebut celah portal yang dijumpai pada sudut-sudut lobulus hati. Hepar manusia memiliki 3-6 celah portal per lobulus, dengan masing-masing terdiri dari venula, arteriol, sebuah duktus (bagian dari sistem duktus biliaris), dan pembuluh limfe (Junqueira, 2007).

Dibagian tepi di antara lobuli-lobuli terhadap tumpukan jaringan ikat yang disebut traktus portalis/triad yaitu traktus portalis yang mengandung cabang-cabang vena porta, arteri hepatica, duktus biliaris. Cabang dari vena porta dan arteri hepatica akan mengeluarkan isinya langsung ke dalam sinusoid setelah banyak percabangan. Sistem bilier dimulai dari kanalikuli biliaris yang halus yang terletak di antara sel-sel hepar dan bahkan turut membentuk dinding sel. Kanalikuli akan mengeluarkan isinya ke dalam intralobularis, dibawa ke dalam empedu yang lebih besar, empedu keluar dari saluran empedu menuju kandung empedu (Junqueira, 2007).





Gambar 2.2 Histologi Hepar 1.hepatic artery 2.portal vien 3.bile duct (sumber: [www.histol.chuvashia.com](http://www.histol.chuvashia.com))

Hepatosit tersusun secara radier, seperti susunan batu bata pada dinding yang tersusun dari perifer lobulus ke pusatnya, dan beranastomosis secara bebas dengan membentuk struktur yang menyerupai labirin dan busa. Setiap hepatosit dipisahkan oleh celah sinusoid yang tersusun melingkar. Kapiler sinusoid adalah pembuluh darah yang lebar yang tidak teratur, dan hanya terdiri atas lapisan tidak utuh dari endotel berfenestra. Terdapat celah Disse sebagai celah tempat berkontakannya masing-masing permukaan hepatosit dan kapiler sinusoid. Pada saat berkontak dengan sesama hepatosit, akan terbentuk suatu celah tubular di antara kedua sel yang disebut kanalikulus biliaris (Junqueira, 2007).

Hepatosit memiliki satu atau dua inti bulat dengan satu atau dua anak inti. Sebagian intinya polipoid, yaitu mengandung perkalian genap dari jumlah kromosom haploid. Hepatosit memiliki banyak retikulum endoplasma baik yang halus maupun kasar. Retikulum endoplasma yang kasar membentuk agregat yang tersebar dalam sitoplasma, dan agregat ini disebut badan basofilik. Retikulum endoplasma halus merupakan sistem labil yang segera bereaksi terhadap molekul yang diterima hepatosit.

Selain sel-sel endotel, sinusoid juga mengandung sel kupffer. Sel – sel ini ditemukan pada permukaan laminal sel-sel endotel. Fungsi utamanya adalah memetabolisme eritrosit tua, mencerna hemoglobin, mensekresi protein yang berhubungan dengan proses imunologis, dan menghancurkan bakteri yang berhasil masuk ke darah portal melalui usus besar. Sel – sel kupffer mencakup 15% dari



populasi sel hati, dan banyak terdapat di daerah periportal di lobulus hati, tempat berlangsungnya fagositosis yang sangat aktif (Junqueira, 2007).

#### 2.1.4 Fisiologi Hepar

Hati selain salah satu organ terbesar, juga sebagai organ yang memiliki fungsi yang terbanyak. Mulai dari fungsi keseluruhan dan fungsi masing – masing sel penyusunnya (Hadi, 2002).

Fungsi hati sebagai organ keseluruhan diantaranya, adalah :

1. Ikut mengatur keseimbangan cairan dan elektrolit, karena semua cairan dan garam akan melewati hati sebelum ke jaringan ekstraseluler lainnya.
2. Hati bersifat sebagai *spons* akan ikut mengatur volume darah, misalnya pada dekompensasi kordis kanan maka hati akan membesar.
3. Sebagai alat saringan, semua makanan dan berbagai macam substansia yang telah diserap oleh *intestine* akan dialirkan ke organ melalui sistem portal.

Fungsi dari sel–sel hati dapat dibagi :

- a. Fungsi dari sel epitel, sebagai pusat metabolisme hidrat arang, protein, lemak, dan empedu. Tempat penyimpanan bagi vitamin dan sebagai tempat berlangsungnya detoksifikasi.
- b. Sel kupffer, berfungsi sebagai pengurai Hb menjadi bilirubin, membentuk aglobulin, dan sebagai alat fagositosis terhadap bakteri serta elemen korpuskuler atau makromolekuler.

Dalam proses metabolisme bilirubin, hati menjalankan 3 tahap yaitu *hepatic uptake*, konjugasi, dan ekskresi. Bilirubin sendiri merupakan hasil akhir dari pemecahan heme yang berasal dari hemoglobin dan mioglobin dari enzim – enzim respirasi. Namun sumber yang paling banyak diperoleh dari pemecahan eritrosit (Hadi, 2002).

#### 2.1.5 Anatomi *Rattus norvegicus*

Tikus (*Rattus sp*) termasuk dalam subfilum Vertebrata. Secara umum morfologi tubuh tikus dapat dibagi menjadi dua bagian, yaitu kepala dan badan beserta bagian-bagiannya. Bentuk kepala tikus adalah kerucut atau kerucut

terpton, dengan misai (kumis) pada ujung moncongnya yang berfungsi sebagai alat peraba. Mata terletak di bagian tepi dari kepala dan letaknya agak menonjol keluar, sehingga mempunyai sudut pandang yang lebar. Gigi tikus terdiri dari gigi seri dan geraham, tidak mempunyai gigi taring sehingga terdapat celah di antara gigi seri dan geraham yang berfungsi untuk mengeluarkan kotoran yang terbawa bersama makanannya, atau untuk mengeluarkan makan yang tidak disukainya. Gigi seri tikus selalu mengalami perpanjangan, sehingga perlu dikurangi dengan jalan mengeratkan gigi serinya pada benda-benda yang keras. Tidak heran bila ada benda-benda yang tidak biasa dimakan tetapi digigit oleh tikus, hal itu untuk mengurani pertumbuhan gigi serinya. Gigi seri berfungsi untuk memotong makanan, sedangkan geraham untuk mengunyah makanan.

Bentuk badan tikus adalah silindris memanjang kebelakang. Batas antara kepala dan badan tidak begitu jelas sehingga dalam identifikasi jenis-jenis tikus, kepala dan badan digabung dan dipisahkan dengan ekor. Badan (dan juga kepala) ditutupi oleh rambut yang warnanya berbeda-beda tergantung jenisnya. Pada bagian bawah badan tikus betina yang sudah dewasa terdapat puting susu yang jumlahnya bervariasi antara 2-6 pasang, tergantung dari jenisnya. Pada bagian ujung belakang badan bagian bawah terdapat alat kelamin dan anus. Pada tikus jantan dewasa terdapat organ kelamin berupa kantung yang merupakan tempat dihasilkannya sperma. Pada saat tikus belum dewasa kantung tersebut berada di dalam tubuh, kemudian berangsur-angsur keluar sesuai dengan umur tikus. Pada badan tikus terdapat anggota badan berupa 2 pasang kaki (tungkai) dan ekor. Pada telapak kaki terdapat tonjolan-tonjolan yang berfungsi untuk membantu tikus dalam memanjat. Ekor tikus gundul (tidak berambut), merupakan ciri yang membedakannya dengan bajing (ekor berambut tebal) dan landak (ekor berduri) (Fatmal, 2009).

Klasifikasi tikus putih (*Rattus norvegicus*), dapat dilihat pada Tabel 2.1 berikut ini.

Tabel 2.1 Klasifikasi Ilmiah *Rattus norvegicus*

Tingkatan	Klasifikasi ilmiah <i>Rattus norvegicus</i>
Kingdom	Animalia
Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Class	Mammalia
Order	Rodentia
Family	Muridae
Genus	<i>Rattus</i>
Spesies	<i>Norvegicus</i>

Sumber: Sowash, J. R (2009).

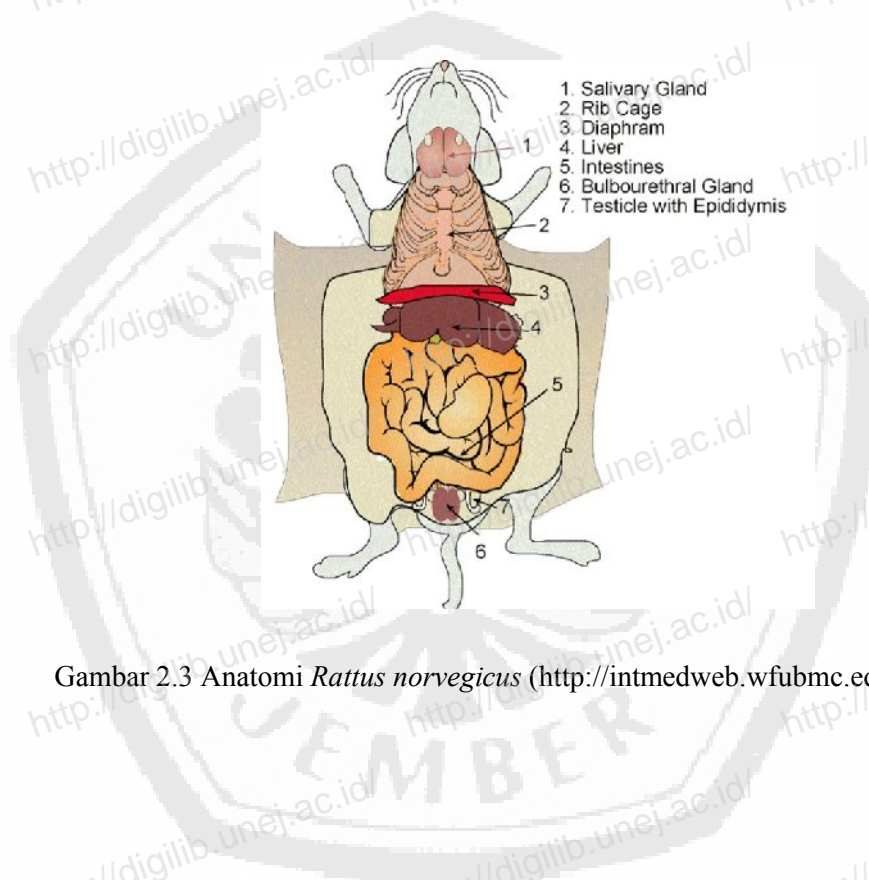
Organ internal *Rattus norvegicus* ini tersusun atas beberapa sistem antara lain:

Sistem digestorium terdiri dari mulut, rongga mulut, faring, esofagus, perut, usus kecil, usus besar, dan rektum serta berakhir di anus. Esophagus berupa pipa silindris yang utama dari faring menuju perut dan memasuki bagian perut yang berkelok-kelok. Kelokan perut besar menuju ke permukaan lateral yang cembung dan besar. Perut berada di antara hati pada bagian kiri abdomen dan terdiri atas tiga bagian yaitu perut terluar (fundus) yang berfungsi sebagai penyimpanan makanan sementara., bagian tengah adalah kelenjar yang mensekresikan mukus, asam hidrokloric, dan pepsin, serta bagian belakang yang kecil (daerah *pyloric*) dengan klep *pyloric* yang mengontrol bahan makanan yang masuk ke dalam usus kecil (Lytle dan Meyer, 2005).

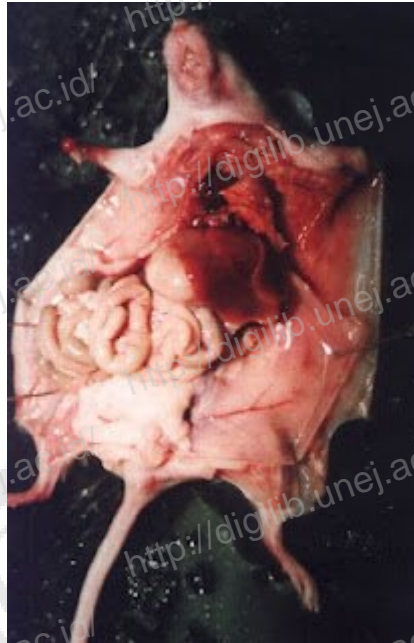
Usus kecil terdiri dari tiga daerah khusus yaitu duodenum yang merupakan bagian awal usus kecil dan sebagai saluran dari hati dan pankreas, jejunum merupakan usus terpendek, dan ileum yang merupakan bagian belakang usus kecil. Sari-sari makanan dari ileum masuk ke dalam usus besar (kolon). Pada batas antara ileum dan kolon terdapat caecum. Caecum dan kolon penting dalam

penyerapan kembali ion dan air. Bagian akhir dari kolon adalah otot rektum yang menuju ke anus (Lytle dan Meyer, 2005).

Hati tikus terdiri dari 4 lobus utama yang saling berhubungan di sebelah belakang. Lobus tengah dibagi menjadi kanan dan kiri oleh bifurcartio yang dalam. Lobus sebelah kiri tidak terbagi sedangkan lobus sebelah kanan terbagi secara horizontal menjadi bagian anterior dan posterior. Lobus belakang terdiri dari 2 lobus. Tikus tidak punya kantung empedu (Hebel, 1989).



Gambar 2.3 Anatomi *Rattus norvegicus* (<http://intmedweb.wfubmc.edu>)



Gambar 2.4 Anatomi *Rattus norvegicus* (<http://nutritionandhalalfood.blogspot.com>)

## 2.2 Kanker Hepar

### 2.2.1 Epidemiologi

*Hepatocellular carcinoma* ( HCC ) atau disebut juga hepatoma atau kanker hati primer atau Karsinoma Hepato Selular ( KHS ) adalah satu dari jenis kanker yang berasal dari sel hati menempati urutan nomor sepuluh tersering di dunia dan nomor lima di Indonesia (Rasyid, 2006).

Menurut WHO tahun 2007, hepatoma menduduki urutan ketiga penyebab kematian di seluruh dunia dari semua jenis kanker dengan 653.000 kematian setelah kanker paru – paru dan kanker lambung. *American Cancer Society* 2008, berdasarkan penelitian Rebecca L, dkk di Amerika Serikat ditemukan bahwa angka kematian akibat hepatoma terus meningkat dari tahun 1992 – 2004 . CSDR pada tahun 1996 sebesar 5,4 per 100.000 penduduk, tahun 1997 sebesar 5,4 per 100.000 penduduk, tahun 1998 sebesar 5,5 per 100.000 penduduk, tahun 1999 sebesar 5,8 per 100.000 penduduk, tahun 2000 sebesar 5,6 per 100.000 penduduk, tahun 2001 sebesar 5,6 per 100.000 penduduk, tahun 2002 sebesar 5,7 per 100.000 penduduk, tahun 2003 sebesar 6,2 per 100.000 penduduk, tahun 2004 sebesar 6,4 per 100.000 penduduk (Elisabet, 2009).

### 2.2.2 Etiologi dan Faktor Resiko

Etiologi hepatoma belum jelas, menurut data yang ada, virus hepatitis, aflatoksin dan pencemaran air minum merupakan 3 faktor utama yang terkait dengan timbulnya hepatoma (Desen, 2008).

#### a. Virus hepatitis

Hubungan antara virus hepatitis khususnya HBV dan kanker hepar sudah sejak awal menjadi perhatian, banyak data klinis menunjukkan HBV dan kanker hepar berkaitan erat:

1. Pasien hepatoma dengan petanda HBV serum positif secara mencolok lebih tinggi dari kelompok orang normal, angka positif HbsAg mereka mencapai 90% lebih. Karier HBV memiliki angka kejadian hepatoma secara mencolok lebih tinggi dari kelompok orang normal. Muir mengestimasi di kalangan karier HbsAg resiko menderita hepatoma setidaknya dibanding orang normal lebih besar 100x lipat.

2. Di dalam silsilah keluarga penderita hepatoma terdapat agregasi infeksi HBV, ratio positif HbsAg di kalangan pasien hepatoma secara jelas lebih tinggi dari anggota keluarganya, sedangkan anggota keluarga hepatoma secara jelas lebih tinggi dari kelompok orang biasa.

3. Di dalam sel hepatoma terkandung integrasi DNA HBV.

HBV menimbulkan hepatitis akut dan kronis, sirosis hati, dan atas dasar itu serta dengan efek sinergis dari faktor pemicu karsinogenesis lain, pada akhirnya menimbulkan hepatoma. Secara klinis sering ditemukan pasien hepatoma mengalami proses timbulnya mengalami proses timbulnya penyakit dari hepatitis akut – hepatitis kronik – sirosis hati – hepatoma.

Kejadian karsinoma hepatoseluler bersama dengan sirosis hati relatif tinggi, sekitar 80-90% lebih. Karsinoma kolangioseluler jarang sekali atau tidak disertai sirosis hati (sekitar 0-33,3%). Pasien dengan sirosis hati berpeluang menderita hepatoma lebih tinggi dari pasien tanpa sirosis hati.

Hubungan antara virus hepatitis C (HCV) dan kejadian hepatoma, dewasa ini dianggap HCV adalah salah satu etiologi utama hepatoma di negara maju, angka anti-HCV positif dalam serum pasien di negara maju

mencapai 50%, sedangkan di kalangan pasien hepatoma negara berkembang berkisar 8,0-38,5% (Desen, 2008).

b. Aflatoksin

Keamanan makanan merupakan suatu kondisi dan upaya yang diperlukan untuk mencegahnya dari kemungkinan cemaran biologis, kimia dan benda lain yang dapat mengganggu, merugikan dan membahayakan kesehatan manusia. Aflatoksin merupakan golongan senyawa toksik (mikotoksin, toksin yang berasal dari fungi) yang dikenal mematikan dan karsinogenik bagi manusia dan hewan (Balai POM RI, 2003).

Berdasarkan struktur kimianya, Aflatoksin B1 merupakan aflatoksin yang paling kuat daya racunnya dan dapat berubah menjadi jenis aflatoksin lain yang daya racunnya sudah jauh berkurang. Aflatoksin B1 termasuk dalam kategori 1 senyawa karsinogenik aktif (Fillaeli, 2010).

Aflatoksin B1 memiliki rumus molekul  $C_{17}H_{12}O_6$ . Bentuknya kristal putih pucat hingga kekuningan dengan berat molekul 312. Meleleh pada  $268 - 269^\circ C$  (dekomposisi). Berfluoresensi biru kuat dari pendaran sinar UV pada panjang gelombang 425 nm. Larut dalam metanol, kloroform, asetonitril dan aseton (Freddy dan Waliyar, 2000).

c. Pencemaran air minum

Dari hasil epidemiologi di China ditemukan pencemaran air minum dan kejadian hepatoma berkaitan erat, di area insiden tinggi hepatoma seperti kecamatan Qidong di propinsi Jiangshu, menunjukkan peminum air kolam memiliki mortalitas hepatoma secara jelas lebih tinggi dari peminum air sumur dalam. Dengan beralih ke minum air sumur dalam, mortalitas hepatoma penduduk cenderung turun. Algae biru hijau dalam air saluran perumahan dan air kolam dianggap sebagai salah satu karsinogen utama. Menurut berbagai hasil survei epidemiologi, di beberapa daerah dengan insiden hepatoma tinggi setelah air minum diganti dari air kolam menjadi air sumur dalam, mengubah makanan dari jagung menjadi beras, serta meningkatkan taraf hidup, mortalitas hepatoma tampak berhenti meningkat (Desen, 2008).

Beberapa faktor resiko terjadinya kanker hepar,yaitu:

1. Usia rata-rata resiko tinggi terkena Hepatoma adalah usia 66 tahun, dimana mungkin menjelaskan waktu perkembangan tumor yang lama dibawah pengaruh penyakit hepar. Tumor ini jarang menyerang seseorang dengan usia di bawah 45 tahun pada daerah yang memiliki resiko rendah infeksi HBV. Pada daerah dengan prevalensi HBV tinggi, distribusi usia seseorang dengan hepatoma meningkat pada usia antara 45-65 tahun (Desen, 2008).
2. Faktor resiko dari jenis kelamin perkembangan Hepatoma lebih tinggi pada pria , hal ini dibuktikan dengan fakta bahwa pria lebih sering sebagai karier HBV daripada wanita. Faktor resiko HBV lebih tinggi daripada HCV dengan perbandingan antara pria dan wanita yaitu 1,2:1 dibandingkan dengan 1,9:1 pada HBV. Alasan untuk ini masih belum jelas (Desen, 2008).

### 2.2.3 Klasifikasi dan Karakteristik

Secara histologis kanker hepar dibagi menjadi 3 jenis, yaitu karsinoma hepatoselular, karsinoma kolangioselular dan karsinoma campuran. Tipe tumor massif : diameter > 5 cm, massa soliter atau nodul multipel yang menyatu menjadi tumor massif, jika diameter massa kanker > 10 cm disebut makromassif.

#### a. Karsinoma hepatoselular

Kanker sel hati di RRC menempati 95% lebih dari hepatoma primer, berasal dari hepatosit.

#### b. Karsinoma kolangioselular

Di RRC menempati sekitar 3% , berasal dari epitel saluran empedu intrahepatik.

#### c. Karsinoma campuran

Mencakup dua komponen, yaitu karsinoma hepatoselular dan karsinoma kolangioselular.



Karsinoma hepatoselular dan karsinoma kolangioselular dalam hal kekhasan klinik maupun patologik memiliki perbedaan besar, seperti yang tampak pada tabel 2.2 dibawah ini.

Tabel 2.2 karakteristik dan patologik karsinoma hepatoselular dan karsinoma kolangioselular

	<b>Karsinoma hepatoselular</b>	<b>Karsinoma kolangioselular</b>
Jenis kelamin	Lebih banyak pada pria	Lebih banyak pada wanita
Latar belakang penyakit hati	Infeksi hepatitis virus, sirosis	Kolangitis, skistosomiasis hati
Konsistensi tumor	Lunak	Keras
Emboli tumor di vena porta	Sering	Jarang
Cara metastasis	Intra hepatic	Ke kalenjar limfe portal
Vaskularisasi	Umumnya kaya vaskular	Avaskular
CT dengan kontras	Isodens atau hipodens	Sangat hipodens
Petanda tumor	AFP	CEA, CA 19-9
Disertai sirosis	Sering, berat	Jarang, ringan
Kemoterapi embolisasi	Dapat efektif	Tidak efektif

Sumber: Desen (2008).

#### 2.2.4 Manifestasi Klinis

##### a) Fase subklinis

Stadium dini dimana pasien yang tanpa gejala dan tanda fisik hepatoma yang jelas, biasanya ditemukan melalui pemeriksaan AFP

##### b) Fase klinis

Fase ini tergolong fase sedang, lanjut, manifestasi utama yang sering adalah :

1. Nyeri abdomen kanan atas bersifat tumpul atau menusuk intermitten atau kontinu
2. Massa abdomen atas: hepatoma lobus kanan dapat menyebabkan batas atas hati bergeser ke atas.
3. Perut kembung, anoreksia, letih, kurus, demam, ikterus dan asites (Ryder, 2003).

## 2.2.5 Standard diagnosis, Stadium klinis dan Prognosis

### 1. Standar diagnosis klinis

- a. AFP  $\geq$  400  $\mu\text{g/L}$ , dapat menyingkirkan kehamilan, tumor embrional sistem reproduksi, penyakit hati aktif, hepatoma metastatik, selain itu teraba hati membesar, keras dan bermassa nodular besar atau pemeriksaan pencitraan menunjukkan lesi penempat ruang karakteristik hepatoma
- b. AFP  $<$  400  $\mu\text{g/L}$ , dapat menyingkirkan kehamilan, tumor embrional sistem reproduksi, penyakit hati aktif, hepatoma metastatik, selain itu terdapat dua jenis pemeriksaan pencitraan menunjukkan lesi penempat ruang karakteristik hepatoma atau terdapat dua petanda hepatoma positif serta satu pemeriksaan pencitraan menunjukkan lesi penempat ruang karakteristik hepatoma
- c. Menunjukkan manifestasi klinis hepatoma dan terdapat kepastian lesi metastatik ekstrahepatik (termasuk asites hemoragik makroskopis atau di dalamnya ditemukan sel ganas) serta dapat menyingkirkan hepatoma metastatik

### 2. Standar klasifikasi stadium klinis hepatoma

- a. Ia : tumor tunggal berdiameter  $\leq$  3 cm, tanpa emboli tumor, tanpa metastasis kalenjar limfe peritoneal ataupun jauh.
- b. Ib : tumor tunggal atau dua tumor dengan diameter gabungan  $\leq$  5 cm, di separuh hati, tanpa emboli tumor, tanpa metastasis kalenjar limfe peritoneal ataupun jauh.
- c. IIa : tumor tunggal atau dua tumor dengan diameter gabungan  $\leq$  10 cm, di separuh hati, atau dua tumor dengan diameter gabungan  $\leq$  5 cm, di kedua belahan hati kiri dan kanan, tanpa emboli tumor, tanpa metastasis kalenjar limfe peritoneal ataupun jauh.
- d. IIb : tumor tunggal atau multipel dengan diameter gabungan  $>$  10 cm, di separuh hati, atau tumor multipel dengan diameter gabungan  $>$  5 cm, di kedua belahan hati kiri dan kanan, tanpa emboli tumor, tanpa

metastasis kelenjar limfe peritoneal ataupun jauh. Terdapat emboli tumor di percabangan vena portal, vena hepatic atau saluran empedu.

e. IIIa :tidak peduli kondisi tumor, terdapat emboli tumor di pembuluh utama vena porta atau vena kava inferior, metastasis kelenjar limfe peritoneal atau jauh.

f. IIIb : tidak peduli kondisi tumor, tidak peduli emboli tumor, metastasis (Ryder, 2003).

### 3. Prognosis hepatoma

jika tidak diterapi, survival rata – rata alamiah adalah 4,3 bulan. Kausa kematian umumnya adalah kegagalan sistemik, perdarahan saluran cerna atas, koma hepatic dan rupture hati (Ryder, 2003).

## 2.3 DMBA (7,12–dimethylbenz(a)anthracene)

### 2.3.1 Definisi DMBA

7,12-Dimethylbenz (a) antrasena (DMBA) adalah salah satu turunan dari kelompok kimia polisiklik hidrokarbon aromatik (PAH). Hidrokarbon aromatik polisiklik (PAH) merupakan polutan organik yang dilepaskan ke lingkungan dalam jumlah besar, terutama akibat aktivitas manusia. PAH merupakan komponen dari minyak mentah dan batubara. PAH adalah salah satu agen karsinogenik yang potensial. Kebanyakan PAH ditemukan di lingkungan selama pembakaran tidak lengkap dari bahan organik pada suhu tinggi. PAH yang dihasilkan dibebaskan ke lingkungan lewat partikel udara, atau dalam bentuk padat dan cair (Attar, 2004).

### 2.3.2 Mekanisme Kerja DMBA

DMBA adalah bahan karsinogen yang kuat dan spesifik yang banyak digunakan dalam laboratorium penelitian kanker. DMBA berfungsi sebagai inisiator tumor melalui proses mutasi yang proses promosi tumor diinduksi oleh 12-O-tetradecanoylphorbol-13-asetat sehingga membuat pertumbuhan tumor menjadi cepat (Miyata *et al*, 2001). DMBA yang dikenal sebagai sitotoksik,

karsinogenik, dan mutagenik sebagai analog dari PAH akan mengaktivasi sitokrom P 450 yang bisa menyebabkan mutasi DNA dan menyebabkan terjadinya kanker (Buters et al, 2003).

Mekanisme aktivasi DMBA melibatkan enzim sitokrom P-450 dan atau peroksidase menjadi intermediate reaktif yang dapat merusak DNA yaitu terbentuknya epoksid dihidrodiool. DMBA akan diubah oleh enzim fase I, sitokrom P450 (CYP) menjadi ultimate carcinogen berupa senyawa epoksida elektrofilyang merupakan metabolit aktifnya. Metabolit epoksida dapat membentuk DNA adduct dan menyebabkan mutasi, akibatnya terbentuklah kanker (Rowlands *et al*, 2001).

#### **2.4 Tanaman Kedelai (*Glycine max* L.)**

Menurut sumber informasi dari Kantor Deputi Menegristek Bidang Pendayagunaan dan Pemasyarakatan Ilmu Pengetahuan bersama Teknologi MIG Corp, kedelai merupakan tanaman pangan berupa semak yang tumbuh tegak. Kedelai jenis liar *Glycine ururiencis*, merupakan kedelai yang menurunkan berbagai kedelai yang kita kenal sekarang (*Glycine max* (L) Merrill). Berasal dari daerah Manshukuo (Cina Utara). Di Indonesia, yang dibudidayakan mulai abad ke-17 sebagai tanaman makanan dan pupuk hijau. Penyebaran tanaman kedelai ke Indonesia berasal dari daerah Manshukuo menyebar ke daerah Mansyuria: Jepang (Asia Timur) dan ke negara-negara lain di Amerika dan Afrika.

Kedelai yang tumbuh secara liar di Asia Tenggara meliputi sekitar 40 jenis. Penyebaran geografis dari kedelai mempengaruhi jenis tipenya. Terdapat 4 tipe kedelai yakni: tipe Mansyuria, Jepang, India, dan Cina. Dasar-dasar penentuan varietas kedelai adalah menurut: umur, warna biji dan tipe batang. Varietas kedelai yang dianjurkan yaitu: *Otan*, *No. 27*, *No.29*, *Ringgit 317*, *Sumbing 452*, *Merapi 520*, *Shakti 945*, *Davros*, *Economic Garden*, *Taichung 1290*, *TKG 1291*, *Clark 1293*, *Orba 1343*, *Galunggung*, *Lokon*, *Guntur*, *Wilis*, *Dempo*, *Kerinci*, *Raung*, *Merbabu*, *Muria* dan *Tidar*.

#### 2.4.1 Taksonomi Kedelai

Tanaman kedelai diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Plantae

Divisio : Spermatophyta

Subdivisio : Angiospermae

Class : Dicotyledoneae

Ordo : Polypetales

Family : Leguminosae

Genus : Glycine

Species : *Glycine max* (L.) (Harahap, 2011)

#### 2.4.2 Deskripsi Tanaman Kedelai

Susunan akar kedelai pada umumnya sangat baik. Pertumbuhan akar tunggang lurus masuk kedalam tanah dan mempunyai banyak akar cabang. Pada akar – akar cabang banyak terdapat bintil – bintil akar berisi bakteri *Rhizobium japonicum*, yang mempunyai kemampuan mengikat zat lemas bebas (N<sub>2</sub>) dari udara yang kemudian dipergunakan untuk menyuburkan tanah.

Waktu tanaman kedelai masih sangat muda, atau setelah fase menjadi kecambah dan saat keping biji belum jatuh, batang dapat dibedakan menjadi dua. Bagian batang di bawah keping biji yang belum lepas disebut hipokotil, sedangkan bagian di atas keping biji disebut epikotil. Batang kedelai tersebut berwarna ungu atau hijau (Andrianto dan Indarto, 2004).

Umumnya, bentuk daun kedelai ada dua, yaitu bulat (oval) dan lancip (lanceolate). Kedua bentuk daun tersebut dipengaruhi oleh faktor genetik. Bentuk daun diperkirakan mempunyai korelasi yang sangat erat dengan potensi biji. Umumnya, daerah yang mempunyai tingkat kesuburan tanah tinggi sangat cocok untuk varietas kedelai yang mempunyai bentuk daun lebar. Daun mempunyai stomata antara 190-320 buah/m<sup>2</sup> (Irwan, 2006).

Bunga kedelai disebut bunga kupu-kupu dan mempunyai dua mahkota dan dua kelopak bunga. Warna bunga putih bersih atau ungu muda. Bunga tumbuh pada ketiak daun dan berkembang dari bawah lalu menyembul ke atas. Pada setiap ketiak daun umumnya terdapat 3-15 kuntum bunga, namun, sebagian besar bunga rontok, hanya beberapa bunga yang dapat membentuk polong (Andrianto dan Indarto, 2004).

Di dalam polong terdapat biji yang berjumlah 2-3 biji. Setiap biji kedelai mempunyai ukuran bervariasi, mulai dari kecil (sekitar 7-9 g/100 biji), sedang (10-13 g/100 biji), dan besar (> 13 g/100 biji). Bentuk biji bervariasi, tergantung pada varietas tanaman, yaitu bulat, agak gepeng, dan bulat telur (Irwan, 2006).

### 2.5 Kandungan dan Manfaat Kedelai pada Kanker Hepar

Kacang kedelai merupakan bahan pangan sumber protein dan lemak nabati yang sangat penting peranannya dalam kehidupan. Walaupun asam amino yang terkandung dalam proteinnya tidak selengkap protein hewani, namun penambahan bahan lain seperti wijen, jagung atau menir sangat baik untuk menjaga keseimbangan asam amino tersebut.

Kedelai mengandung protein 35 % bahkan pada varietas unggul kadar proteinnya dapat mencapai 40 - 43 %. Dibandingkan dengan beras, jagung, tepung singkong, kacang hijau, daging, ikan segar, dan telur ayam, kedelai mempunyai kandungan protein yang lebih tinggi, hampir menyamai kadar protein susu skim kering (Margono *et al*, 2000). Bila seseorang tidak boleh atau tidak dapat makan daging atau sumber protein hewani lainnya, kebutuhan protein sebesar 55 gram per hari dapat dipenuhi dengan makanan yang berasal dari 157,14 gram kedelai.

Tabel 2.3 Komposisi Kedelai per 100 gram Bahan

KOMPONEN	KADAR (%)
Protein	34-45
Lemak	18-32
Karbohidrat	12-30
Air	7

Sumber : Esti (2000).

Tabel 2.4 Perbandingan Antara Protein Kedelai dengan Beberapa Bahan Makanan Lain

Bahan Makanan	Protein (%)
Susu skim kering	36,00
Kedelai	35,00
Kacang hijau	22,00
Daging	19,00
Ikan segar	17,00
Telur ayam	13,00
Jagung	9,20
Beras	6,80
Tepung singkong	1,10

Sumber : Esti (2000).

Kedelai mengandung senyawa-senyawa antioksidan di antaranya adalah vitamin E, vitamin A, provitamin A, vitamin C dan senyawa flavonoid golongan isoflavon. Flavonoid adalah sejenis pigmen, seperti halnya zat hijau daun yang terdapat pada tanaman yang berwarna hijau. Senyawa ini biasanya memiliki ciri khas, yaitu mengeluarkan bau tertentu. Bau langu yang terdapat pada biji kedelai adalah salah satu tanda bahwa dalam biji tersebut terdapat flavonoid. Secara ilmiah, flavonoid sudah dibuktikan mampu mencegah dan mengobati berbagai penyakit. Salah satu jenis flavonoid yang sangat banyak terdapat pada biji kedelai dan sangat bermanfaat bagi kesehatan adalah isoflavon. Pada tanaman kedelai, kandungan isoflavon yang lebih tinggi terdapat pada biji kedelai, khususnya pada bagian hipokotil (germ) yang akan tumbuh menjadi tanaman. Sebagian lagi terdapat pada kotiledon yang akan menjadi daun pertama dari tanaman (Rahma, 2010).

Kandungan isoflavon pada kedelai berkisar 2 - 4 mg/g kedelai. Pada umumnya senyawa isoflavon ini berupa senyawa kompleks atau terkonjugasi dengan senyawa gula melalui ikatan glukosida. Jenis senyawa isoflavon ini terutama adalah genistin, daidzin, dan glisitin. Selama proses pengolahan, baik melalui proses fermentasi maupun proses non-fermentasi, senyawa isoflavon dapat mengalami transformasi, terutama melalui proses hidrolisa sehingga dapat diperoleh senyawa isoflavon bebas yang disebut aglikon yang lebih tinggi

aktivitasnya. Senyawa aglikon tersebut adalah genistein, glisitein, dan daidzein (Ayuningtias, 2009).

Keistimewaan isoflavon yang telah diketahui sampai saat ini ialah kemampuan sebagai antioksidan dan antikanker (Pawiharsono, 2008). Studi epidemiologi telah membuktikan bahwa masyarakat yang secara teratur mengkonsumsi makanan dari kedelai, memiliki kasus kanker payudara, kolon dan prostat yang lebih rendah. Isoflavon kedelai juga terbukti, melalui penelitian in vitro dapat menghambat enzim tirosin kinase dan juga menghambat DNA topoisomerase, oleh karena itu dapat menghambat perkembangan sel-sel kanker dan angiogenesis (Ayuningtias, 2009).

Detoksifikasi senyawa karsinogen atau *ultimate carcinogen* oleh enzim-enzim pemetabolisme terutama pada fase II yaitu enzim glutathion S-transferase (GST). Kemampuan detoksifikasi akan meningkat apabila ada peningkatan aktivitas (induksi) enzim-enzim ini. Peningkatan detoksifikasi menyebabkan senyawa reaktif menjadi tidak aktif dan mudah diekskresikan keluar tubuh. Aktifitas selanjutnya terjadi penurunan *DNA adduct* (kerusakan DNA) dan proses inisiasi karsinogen dihambat. Kandungan isoflavon dalam flavonoid yang sangat tinggi pada sari kedelai mampu meningkatkan ekspresi enzim *glutathion S-transferase* (GST) yang dapat mendetoksifikasi karsinogen reaktif menjadi tidak reaktif dan lebih polar sehingga cepat dieliminasi dari tubuh, selain itu isoflavon juga dapat mengikat senyawa karsinogen sehingga mencegah ikatan dengan DNA (Susilowati, 2010).

Dari sejumlah senyawa flavonoida dan isoflavonoida tersebut, yang banyak disebut - sebut berpotensi sebagai antitumor / antikanker adalah genistein. Penghambatan sel kanker oleh senyawa flavon/isoflavon ini terjadi khususnya pada fase promosi (Fujiki *et al.*, 1986).

Penghambatan sel kanker oleh genistein dijelaskan melalui mekanisme sebagai berikut:

- a. Penghambatan pembelahan/proliferasi sel (baik sel normal, sel yang terinduksi oleh faktor pertumbuhan sitokin, maupun sel kanker kolon yang terinduksi nonil-fenol atau bi-fenol A) yang diakibatkan oleh



- penghambatan pembentukan membran sel, khususnya penghambatan pembentukan protein yang mengandung tirosin (Yoshida *et al.*, 2000)
- b. Penghambatan regulasi siklus sel yang menyebabkan ekspresi gen abnormal menurun sehingga menginduksi apoptosis sel abnormal.
  - c. Penghambatan aktivitas enzim DNA isomerase II
  - d. Sifat antioksidan dan anti-angiogenik yang disebabkan oleh sifat reaktif terhadap senyawa radikal bebas
  - e. Sifat mutagenik pada gen endoglin (gen transforman faktor pertumbuhan betha atau TGF $\beta$ ) (Peterson, *et al.*, 1997)

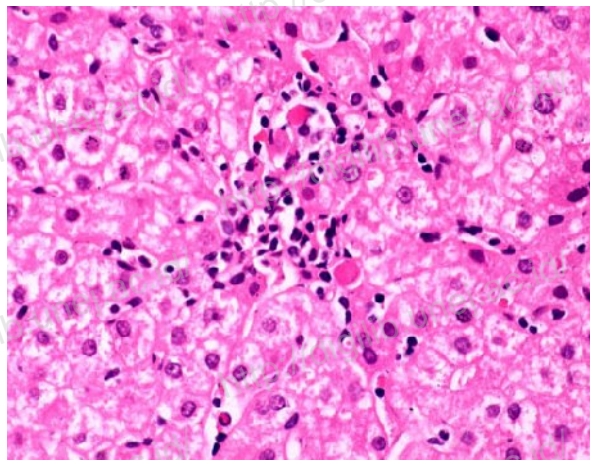
Mekanisme ini dapat berlangsung apabila konsentrasi genistein lebih besar dari 5  $\mu$ M. Mekanisme kerja dari genistein yang menginduksi apoptosis sel mengindikasikan genistein sebagai agen kemopreventif.

## 2.6 Apoptosis Sel Abnormal

Apoptosis berasal dari bahasa Greek, yang artinya gugurnya putik bunga ataupun daun dari batangnya. Pada tahun 1972, Kerr J.F, Wyllie A.H, Currie A.R mempublikasikan artikel dalam *British Journal Of Cancer* dengan judul *Apoptosis a basic biological phenomen with wide ranging implication in Issue kinetic*. Artikel ini menjelaskan tentang proses kematian normal pada sel yang disebut dengan apoptosis (Lumongga, 2008).

Proses apoptosis dikendalikan oleh berbagai tingkat sinyal sel, yang dapat berasal dari pencetus ekstrinsik maupun intrinsik. Yang termasuk pada sinyal ekstrinsik antara lain hormon, faktor pertumbuhan, nitric oxide dan cytokine. Sinyal tersebut harus dapat menembus membrane plasma ataupun transduksi untuk dapat menimbulkan respon (Lumongga, 2008).

Sinyal intrinsik apoptosis merupakan suatu respon yang diinisiasi oleh sel sebagai respon terhadap stress dan akhirnya dapat mengakibatkan kematian sel. Pengikatan reseptor nuklear oleh glukokortikoid, panas, radiasi, kekurangan nutrisi, infeksi virus dan hipoksia merupakan keadaan yang dapat menimbulkan pelepasan sinyal apoptosis intrinsik melalui kerusakan sel (Lumongga, 2008).



Gambar 2.5 Apoptosis sel Hepatosit (sumber: <http://altair.chonn.ac./pathology/liver.html>)

Sebelum terjadi proses kematian sel melalui enzyme, sinyal apoptosis harus dihubungkan dengan pathway kematian sel melalui regulasi protein. Pada regulasi ini terdapat dua metode yang telah dikenali untuk mekanisme apoptosis, yaitu : melalui mitokondria dan penghantaran sinyal secara langsung melalui adapter protein.

### 3. Ekstrinsik Pathway ( di inisiasi oleh kematian receptor )

Pathway ini diinisiasi oleh pengikatan receptor kematian pada permukaan sel pada berbagai sel. Receptor kematian merupakan bagian dari receptor tumor nekrosis factor yang terdiri dari cytoplasmic domain, berfungsi untuk mengirim sinyal apoptosis. Reseptor kematian yang diketahui antara lain TNF reseptor tipe 1 yang dihubungkan dengan protein Fas (CD95). Pada saat Fas berikatan dengan ligandnya, membrane menuju ligand (FasL). Tiga atau lebih molekul Fas bergabung dan cytoplasmic death domain membentuk binding site untuk adapter protein, FADD ( Fas-associated death domain ). FADD ini melekat pada reseptor kematian dan mulai berikatan dengan bentuk inaktif dari caspase 8. Molekul caspase 8 ini kemudian dibawa ke atas dan kemudian pecah menjadi caspase 8 aktif.

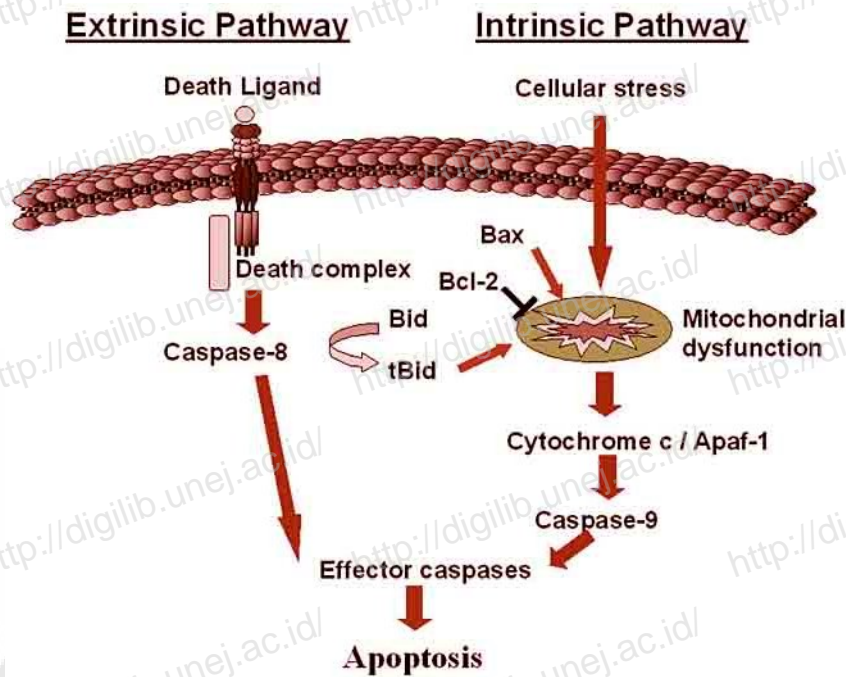
Enzyme ini kemudian mencetuskan cascade aktivasi caspase dan kemudian mengaktifkan procaspase lainnya dan mengaktifkan enzim untuk mediator pada fase eksekusi.

Pathway ini dapat dihambat oleh protein FLIP, tidak menyebabkan pecahnya enzyme procaspase 8 dan tidak menjadi aktif.

#### 4. Intrinsik ( Mitokondrial ) Pathway

Pathway ini terjadi karena adanya permeabilitas mitokondria dan pelepasan molekul pro-apoptosis ke dalam sitoplasma, tanpa memerlukan reseptor kematian. Faktor pertumbuhan dan sinyal lainnya dapat merangsang pembentukan protein antiapoptosis Bcl2, yang berfungsi sebagai regulasi apoptosis. Protein antiapoptosis yang utama adalah : Bcl-2 dan Bcl-x, yang pada keadaan normal terdapat pada membrane mitokondria dan sitoplasma.

Pada saat sel mengalami stress, Bcl-2 dan Bcl-x menghilang dari membrane mitokondria dan digantikan oleh pro-apoptosis protein, seperti Bak, Bax, Bim. Sewaktu kadar Bcl-2, Bcl-x menurun permeabilitas membrane mitokondria meningkat, beberapa protein dapat mengaktifkan cascade caspase. Salah satu protein tersebut adalah cytochrom-c berikatan dengan protein Apaf-1 ( apoptosis activating factor-1 ) dan mengaktifasi caspase-9. Protein mitokondria lainnya, seperti Apoptosis Inducing Factor ( AIF ) memasuki sitoplasma dengan berbagai inhibitor apoptosis yang pada keadaan normal untuk menghambat aktivasi caspase (Lumongga, 2008).



Gambar 2.6 Apoptosis pathways (Sumber: Feldstein, Gores, 2005)

Fase eksekusi setelah sel menerima sinyal yang sesuai untuk apoptosis, selanjutnya organela – organela sel akan mengalami degradasi yang diaktifasi oleh caspase proteolitik.

Sel yang mulai apoptosis, secara mikroskopis akan mengalami perubahan:

- Sel mengerut dan lebih bulat, karena pemecahan proteinaceous sitoskeleton oleh caspase.
- Sitoplasma tampak lebih padat.
- Kromatin menjadi kondensasi dan fragmentasi yang padat pada membrane inti ( pyknotik )
- Membrane inti menjadi discontinue dan DNA yang ada didalamnya pecah menjadi fragmen – fragmen ( karyoheksis )
- Membrane sel memperlihatkan tonjolan – tonjolan yang irregular / blebs pada sitoplasma.
- Sel terpecah menjadi beberapa fragmen, yang disebut dengan *apoptotic bodies*.

g. *Apoptotic bodies* ini akan difagosit oleh sel yang ada di sekitarnya. (Lumongga, 2008).

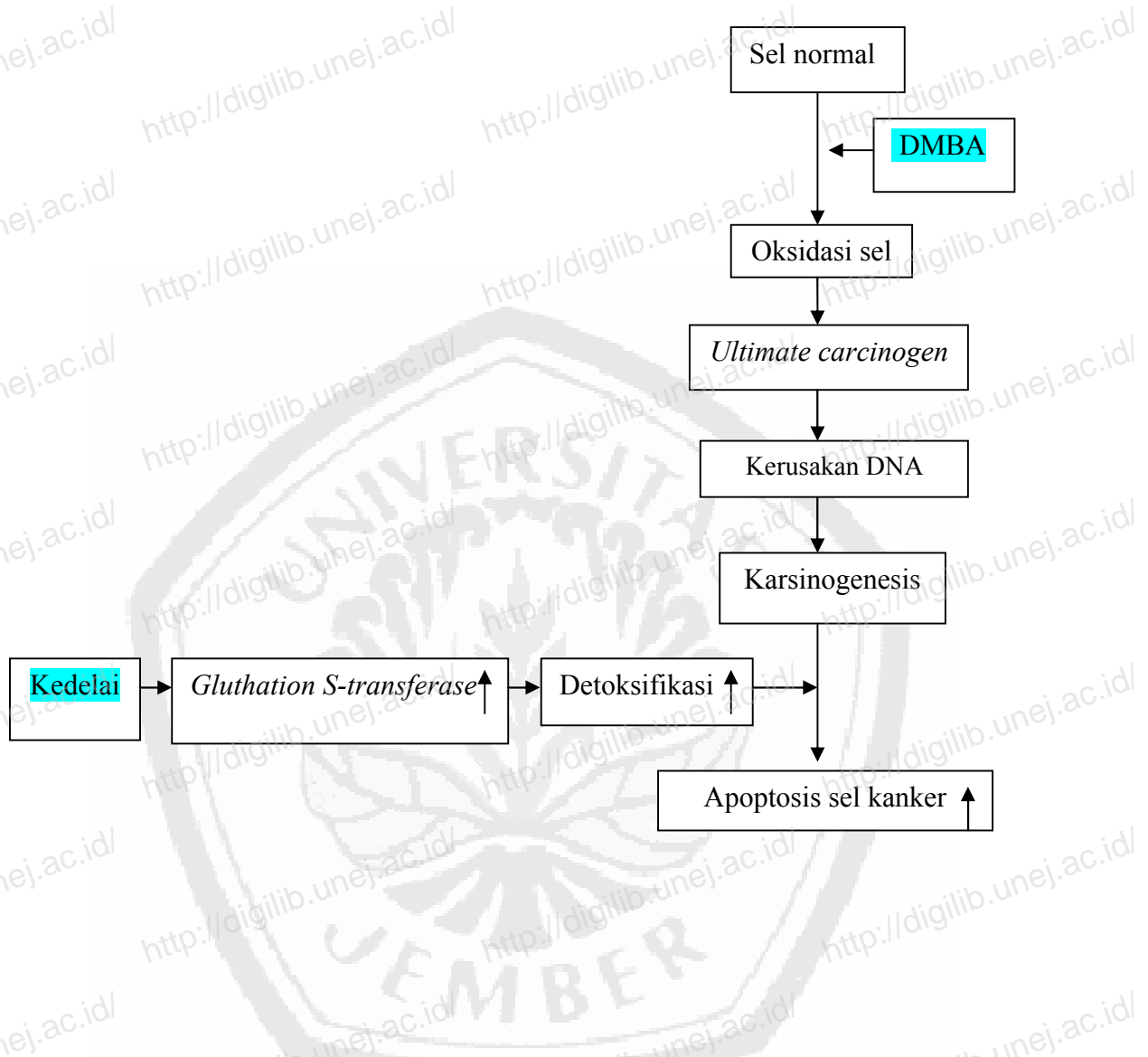
Di samping apoptosis dikenal cara kematian yang lain yaitu nekrosis yang terjadi oleh karena kegagalan sintesis ATP oleh mitokondria. Nekrosis merupakan kematian sel secara patologis dengan penyebab utama gangguan produksi ATP. Pada setiap kerusakan jaringan misalnya akibat radikal bebas, bahan toksik, atau bahan infeksius, kedua proses ini berjalan bersama dengan proporsi yang berbeda dan saling berkaitan (Andriana, 2009). Perbedaan antara apoptosis dan nekrosis seperti pada tabel 2.5:

Tabel 2.5 Perbedaan Sel Akibat Apoptosis dan Nekrosis

	<b>Apoptosis</b>	<b>Nekrosis</b>
Peran sel	Aktif	Pasif
Distribusi	Tersebar	Terkonsentrasi pada satu daerah atau menyebar dari satu titik (contiguous)
Morfologi	Volume sel menyusut	Volume sel mengembang
Membran sel	Dipertahankan	Rusak
Induksi	Perlahan (jam)	Cepat (detik- menit)
Pembersihan sel mati	Cepat	Lambat
Inflamasi	Tidak ada	Ada

Sumber: Andriana (2009).

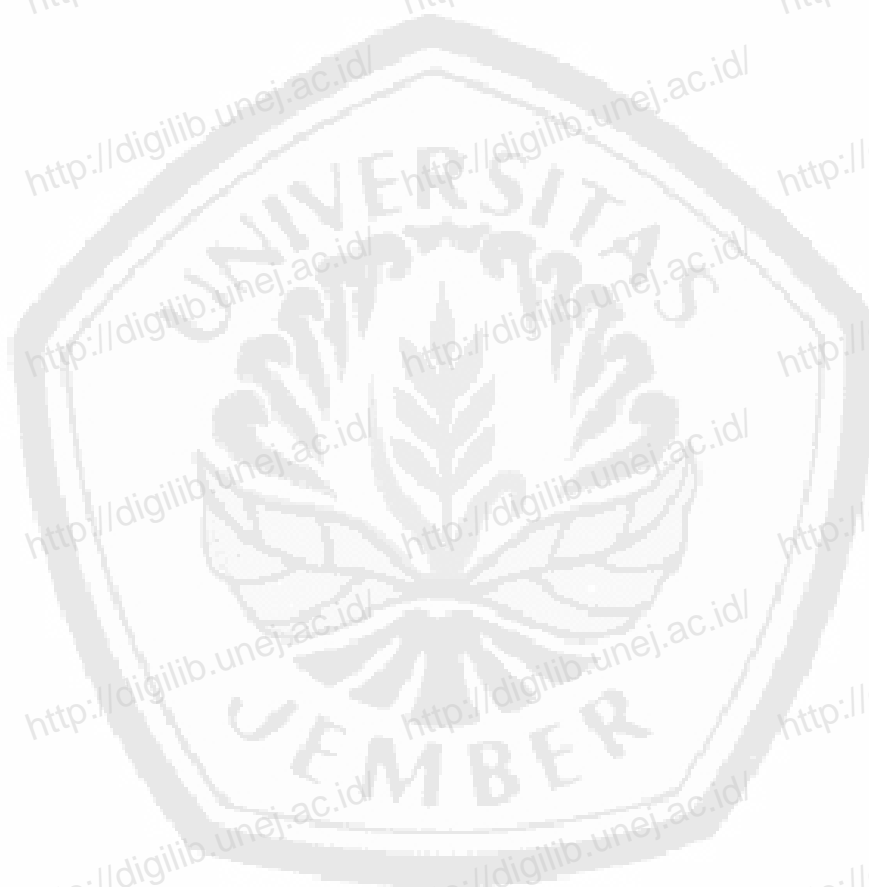
## 2.7 Kerangka Konseptual



Tranformasi kimiawi dari DMBA menghasilkan metabolit *ultimate carcinogen* kemudian akan berikatan dengan elektron DNA yang dapat menyebabkan kerusakan DNA. Detoksifikasi senyawa karsinogen atau *ultimate carcinogen* dilakukan oleh enzim *glutathion S-transferase* (GST). Isoflavon meningkatkan kemampuan detoksifikasi enzim *glutathion S-transferase* (GST) sehingga menginduksi apoptosis sel kanker.

## 2.8 Hipotesis Penelitian

- a) Sari kedelai (*Glycine max* L.) dapat menginduksi apoptosis sel kanker hepar pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi 7,12-Dimetilbenz(a) antrasen (DMBA).
- b) Ada pengaruh perbedaan dosis sari kedelai (*Glycine max* L.) 5 mg/hari, 10 mg/hari, dan 20 mg/hari terhadap apoptosis sel kanker hepar pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA.





## **BAB 3. METODE PENELITIAN**

### **3.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris (Pratiknya, 2003). Penelitian eksperimen merupakan kegiatan percobaan (*experiment*) yang bertujuan untuk mengetahui suatu pengaruh yang timbul akibat dari adanya perlakuan tertentu (Notoatmodjo, 2002).

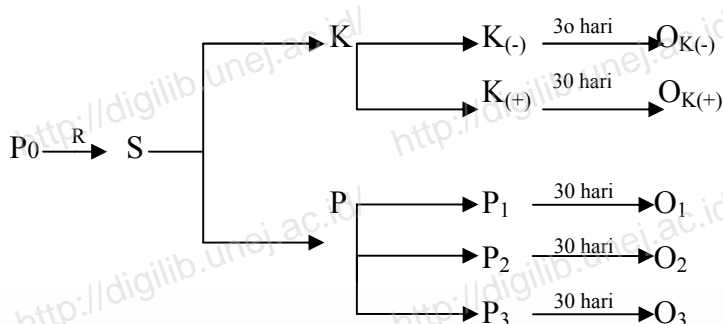
### **3.2 Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Post Test Only Control Group Design*. Rancangan tersebut dipilih dengan asumsi bahwa pada tiap unit sampel adalah homogen, yaitu karakteristik semua sampel adalah sama. Pengukuran awal tidak dilakukan karena dianggap sama untuk semua kelompok, sehingga dapat dikembangkan rancangan eksperimental tanpa ada pengukuran awal (*pretest*), tetapi hanya pengukuran akhir (*post test*) (Pratiknya, 2003).

Pemilihan subjek penelitian untuk pengelompokan dan pemberian perlakuan dengan menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) / randomisasi. Rancangan ini diperluas dengan melibatkan lebih dari satu variabel bebas, dengan kata lain perlakuan dilakukan pada lebih dari satu kelompok dengan bentuk perlakuan yang berbeda. Setelah semua perlakuan selesai, dilakukan observasi (*posttest*) pada semua kelompok untuk diperoleh kesimpulan mengenai perbedaan diantaranya melalui analisis data tertentu (Notoatmodjo, 2002).



Secara sistematis rancangan penelitian digambarkan sebagai berikut:



Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

Keterangan :

P0 : Populasi tikus

S : Sampel

R : *Simple random sampling*

K(-) : Kelompok kontrol negatif dengan pemberian pur dan aquadest biasa

K(+) : Kelompok kontrol positif dengan pemberian 4,2 mg DMBA per hari dalam 0,5 ml minyak wijen per ekor

P1 : Kelompok perlakuan 1 dengan pemberian 4,2 mg DMBA per hari dalam 0,5 ml minyak wijen dan sari kedelai 5 mg/hari per ekor

P2 : Kelompok perlakuan 2 dengan pemberian 4,2 mg DMBA per hari dalam 0,5 ml minyak wijen dan sari kedelai 10 mg/hari per ekor

P3 : Kelompok perlakuan 3 dengan pemberian 4,2 mg DMBA per hari dalam 0,5 ml minyak wijen dan sari kedelai 20 mg/hari per ekor

OK(-) : Data hasil pengamatan apoptosis hepar tikus dengan pur dan aquadest biasa setelah masa penelitian selesai

OK(+) : Data hasil pengamatan apoptosis hepar tikus dengan pemberian 4,2 mg DMBA dalam 0,5 ml minyak wijen per ekor setelah masa penelitian selesai

O1 : Data hasil pengamatan apoptosis hepar tikus dengan pemberian 4,2 mg DMBA dalam 0,5 ml minyak wijen dan sari kedelai 5 mg/hari per ekor setelah masa penelitian selesai

O2 : Data hasil pengamatan apoptosis hepar tikus dengan pemberian 4,2 mg DMBA dalam 0,5 ml minyak wijen dan sari kedelai 10 mg/hari per ekor setelah masa penelitian selesai

O3 : Data hasil pengamatan apoptosis hepar tikus dengan pemberian 4,2 mg DMBA dalam 0,5 ml minyak wijen dan sari kedelai 20mg/hari per ekor setelah masa penelitian selesai.

### 3.3 Estimasi Jumlah Subjek Penelitian

Jumlah hewan uji ditetapkan menurut rumus Federer yaitu (Hanafiah, 2001):

$$(k-1)(n-1) > 15$$

Keterangan :

k = jumlah kelompok

n = jumlah sampel dalam tiap kelompok

15 = nilai deviasi

Dalam penelitian ini terdapat 5 kelompok ( $k=5$ ), sehingga:

$$(5-1)(n-1) > 15$$

$$4(n-1) > 15$$

$$4n - 4 > 15$$

$$4n > 15 + 4$$

$$n > 4,75 (= 5)$$

Jadi peneliti menggunakan 25 ekor tikus yang dibagi dalam 5 kelompok, yaitu 2 kelompok kontrol (kontrol negatif dan kontrol positif) dan 3 kelompok perlakuan. Perbedaan 3 kelompok perlakuan ini adalah dosis sari kedelai sebesar 5mg/hari, 10mg/hari, dan 20mg/hari, namun ketiganya mendapat perlakuan yang sama yaitu diberi DMBA setiap hari dengan dosis tunggal 4,2 mg/hari bersamaan dengan pemberian kedelai selama 30 hari.

### 3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

#### 3.4.1 Tempat Penelitian

Perlakuan hewan coba dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, pembuatan sediaan apoptosis hepar hewan coba dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, sedangkan untuk penghitungan apoptosis sel kanker dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

#### 3.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian dan pengumpulan data dilaksanakan mulai bulan Mei 2011 sampai bulan Maret 2012.

### 3.5 Variabel Penelitian

#### 3.5.1 Variabel Bebas

- a. DMBA dengan dosis tunggal yaitu 4,2 mg (Manikandan *et al*, 2007).
- b. Sari kedelai dengan dosis masing-masing 5 mg/hari, 10 mg/hari, dan 20 mg/hari untuk kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 (Stubert dan Gerber, 2009).

#### 3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah gambaran apoptosis sel kanker hepar tikus.

#### 3.5.3 Variabel Terkendali

- a. Umur hewan coba
- b. Berat badan hewan coba
- c. Waktu dan lama perlakuan
- d. Pemeliharaan dan perlakuan hewan coba
- e. Ketepatan dosis DMBA dan sari kedelai

### 3.6 Definisi Operasional Variabel

- a. DMBA (7,12-dimetilbenz(a)antrasen) dengan dosis tunggal sebesar 4,2 mg/hari merupakan dosis yang efektif untuk menimbulkan efek karsinogenik. Pemberian DMBA dilakukan bersamaan dengan sari kedelai.
- b. Sari kedelai dengan dosis bertingkat masing-masing sebesar 5 mg/hari, 10 mg/hari, dan 20 mg/hari untuk kelompok perlakuan 1, 2, dan 3. Dosis ini adalah batasan dosis yang paling efektif untuk dapat menginduksi apoptosis sel kanker hepar. Sari kedelai diberikan melalui sonde setiap hari selama 30 hari.
- c. Jumlah apoptosis sel kanker hepar tikus adalah jumlah total yang didapatkan pada sel dengan adanya inti berwarna coklat yang mengalami penyusutan sel (*shrinkage*), fragmentasi nukleus dan dikelilingi oleh halo yang jernih. Dihitung melalui mikroskop dengan pembesaran 400 kali dan dinyatakan dalam satuan N (angka) sel per 10 lapang pandang. Metode

pewarnaan yang digunakan yaitu pengecatan imunohistokimia, sedangkan indeks apoptosis dievaluasi dengan metode TUNEL (Liu, 2001).

### 3.7 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.7.1 Alat

Alat untuk pemeliharaan dan perlakuan hewan coba antara lain adalah rak besi, kandang hewan coba dari kotak plastik, botol minuman hewan coba, kawat penutup kandang, sekam untuk alas kandang, sonde, spuit, dan pengaduk.

Alat untuk pengambilan organ hepar hewan coba serta mengamati sediaan apoptosis sel kanker hepar hewan coba meliputi seperangkat alat bedah steril (gunting bedah, pinset, scalpel), termos berisi es, refrigerator, mikrotom, papan fiksasi, jarum pentul, mikroskop, *object glass*, dan *cover glass*.

#### 3.7.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah organ hepar tikus, sari kedelai, DMBA, minyak wijen, larutan eter, formalin 10%, *xylene*, *ethanol*, *proteinase-K*, *hydrogen peroxidase 3%*, *phosphate buffer saline (PBS)*, *tris-HCl (MW 157.6)*, *sodium cacodylate, trihydrate (MW 214.0)*, *cobalt chloride, hexahydrate (MW 237.9)*, *TdT reaction buffer*, *TdT buffer stock solution*, *biotin-16-dUTP*, *NaCl*, *sodium citrate*, *distilled water*, entelan, dan minyak emersi.

### 3.8 Prosedur Penelitian

#### 3.8.1 Pemeliharaan Hewan Coba

##### a. Persiapan Kandang

Menyiapkan rak besi untuk penempatan kandang tikus, menyiapkan kandang dari kotak plastik dengan tutup terbuat dari ram kawat, dan di dalamnya diberi sekam dan menyiapkan tempat minum tikus.

##### b. Persiapan Hewan Coba

Pengambilan sampel dengan metode *simple random sampling*. Adaptasi hewan coba dilakukan selama 3 hari dengan pemberian pakan dan minum biasa

dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

### 3.8.2 Perlakuan Hewan Coba

Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Kelompok kontrol negatif ( $K_{(-)}$ ) adalah kelompok kontrol yang diberi makan dan minum biasa (tanpa perlakuan). Kelompok kontrol positif ( $K_{(+)}$ ) adalah kelompok kontrol yang diberi makan dan minum biasa, dilanjutkan dengan pemberian DMBA 4,2 mg melalui sonde. Kelompok perlakuan 1 (P1) diberi sari kedelai 5mg/hari, dilanjutkan dengan pemberian DMBA, kelompok P2 diberi sari kedelai 10mg/hari, dilanjutkan dengan pemberian DMBA, sedangkan kelompok P3 diberi sari kedelai 20mg/hari, dilanjutkan dengan pemberian DMBA 4,2 mg untuk masing-masing kelompok perlakuan.

Tabel 3.1 Kelompok Perlakuan Sampel dalam Penelitian

Kelompok perlakuan	Diet	Dosis Karsinogen (DMBA)	Dosis Sari Kedelai
Kontrol (-)	Normal	-	-
Kontrol (+)	Normal	4,2mg DMBA dalam 0,5 ml minyak wijen	-
1	Normal	4,2mg DMBA dalam 0,5 ml minyak wijen	5mg/hari
2	Normal	4,2mg DMBA dalam 0,5 ml minyak wijen	10mg/hari
3	Normal	4,2mg DMBA dalam 0,5 ml minyak wijen	20mg/hari

Pemberian DMBA dan sari kedelai dilakukan per oral dengan menggunakan alat bantu sonde lambung, yang bertujuan mencegah bahan tersebut dimuntahkan dari jumlah yang telah ditetapkan. Pemberian sari kedelai dan induksi DMBA dilakukan 1x/hari selama 30 hari per sonde. Berat badan tikus ditimbang setiap minggu dimulai dari minggu pertama penelitian sampai minggu terakhir, sebelum dilakukan diseksi.

### 3.8.3 Pengambilan dan Penyimpanan Jaringan Hepar

Tikus dibius dengan eter kemudian dibedah secara aseptis. Dalam proses diseksi, alas yang digunakan adalah papan fiksasi dan tikus difiksasi menggunakan jarum pentul yang ditusukkan pada ujung keempat ekstremitasnya. Setelah itu abdomen hewan coba dibedah dan jaringan hepar diambil. Jaringan hepar dibagi menjadi 2 bagian. Bagian yang pertama diletakkan pada toples yang berisi formalin 10%, kemudian ditutup rapat. Sedangkan bagian ke-2 dibersihkan dengan PBS steril kemudian diletakkan dalam wadah untuk segera disimpan dalam lemari es sampai siap dianalisis. Wadah yang berisi spesimen jaringan hepar hewan coba dibawa ke Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk dijadikan sediaan apoptosis.

### 3.8.4 Pembuatan Sediaan Histopatologi Jaringan Hepar

Pembuatan sediaan apoptosis jaringan hepar dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan langkah kerja sebagai berikut: 1) Isolasi, 2) Fiksasi (*Fixation*), 3) Dehidrasi (*Dehydration*), 4) Pembeningan (*Clearing*), 5) Pembenaman (*Impregnasi/Embedding*), 6) Pengecoran (*Blocking*), 7) Pematangan jaringan (*Sectioning*), 8) Pewarnaan (*Staining*), 9) Perekatan (*Mounting*), 10) Pelabelan (*Labelling*).

### 3.8.5 Pewarnaan Sel Apoptosis dengan *Terminal Transferase and Biotin-16-dUTP (TUNEL Fluorescent Method)*

Spesimen jaringan hepar diambil secukupnya dan ditempatkan di atas *object glass*, dipastikan tidak ada sisa air bekas penyimpanan. Ditambahkan suspensi *proteinase K* 100 ml selama 20 menit pada spesimen. Tujuan penambahan enzim ini adalah untuk mendegradasi protein, terutama protein yang terdapat pada membran. Spesimen dibilas dengan larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) 1 kali dan dikeringkan menggunakan *tissue*. Dengan menempelkan *tissue* pada *object glass*, sehingga larutan PBS akan terserap dengan sendirinya.

Setelah spesimen dikeringkan, ditambahkan *Hydrogen Peroxidase* (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3% sebanyak 100 ml, spesimen diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit.

Spesimen dibilas dengan larutan PBS lalu dikeringkan. Spesimen diberikan *reaction buffer* 100  $\mu\text{L}$  kemudian diinkubasi selama 30 menit, ditambahkan lagi *reaction buffer* 100  $\mu\text{L}$  dan *complete labeling reaction mixture* secukupnya. Spesimen ditutup dengan parafilm atau taperware untuk segera dimasukkan ke dalam inkubator. Spesimen diinkubasi dengan suhu 37° C selama 1 jam kemudian dicuci dengan larutan PBS, dan di seka dengan *tissue* sampai kering.

Dilakukan pengeblokan dengan *Blocking Buffer* sebanyak 100  $\mu\text{L}$  lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Tanpa dicuci, spesimen langsung berikan *Antibody Solution* sebanyak 100  $\mu\text{L}$ , kemudian diinkubasi selama 1 jam dan dicuci dengan larutan PBS. Dilakukan pengeblokan kedua dengan reagen dan jumlah yang sama, kemudian dicampur dengan larutan *conjugated* yang sudah tersedia. Dilakukan pengeblokan ketiga dengan reagen dan jumlah yang sama, kemudian diinkubasi selama 30 menit. Sisa pembuatan preparat dibuang tanpa dicuci dan ditunggu selama 30 menit. Setelah bersih, ditambahkan *DAB solution* sampai spesimen berwarna coklat. Hati-hati dalam menambahkan *DAB solution* karena larutan ini bersifat karsinogenik. Spesimen dicuci dengan larutan PBS 1 kali, kemudian langkah terakhir adalah diberi entelan untuk menutup *object glass* dengan *cover glass*.

### 3.8.6 Pengamatan dan Penghitungan Apoptosis Jaringan Hepar

Preparat yang dihasilkan dibawa kembali ke Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk dilakukan penghitungan apoptosis sel kanker hepar dari setiap kelompok sampel. Jumlah apoptosis sel kanker hepar tikus adalah hasil total yang didapatkan pada sel dengan adanya pewarnaan coklat pada inti yang mengalami penyusutan sel (*shrinkage*), fragmentasi nukleus dan dikelilingi oleh halo yang jernih. Dihitung melalui mikroskop dengan pembesaran 400 kali dan dinyatakan dalam satuan N sel per 10 lapang pandang.

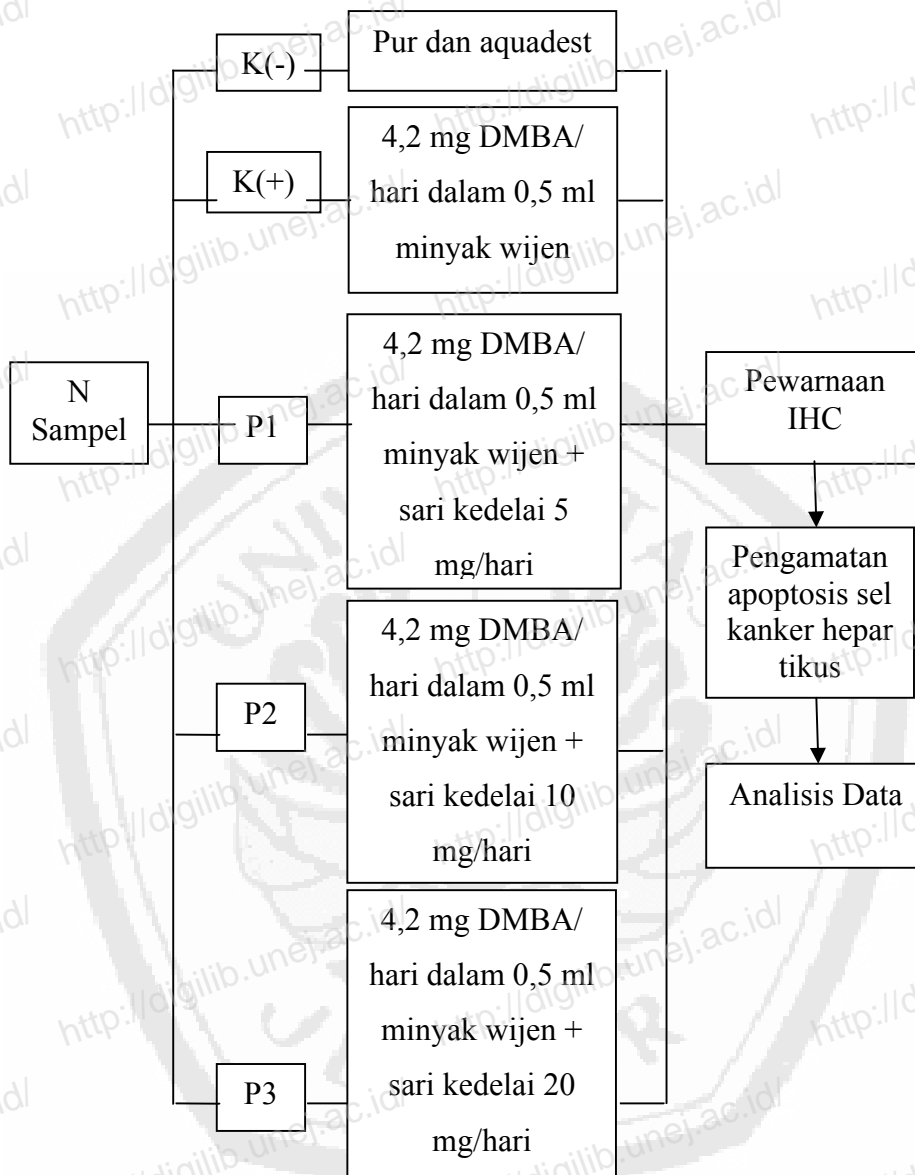
### 3.9 Analisis Data Penelitian

Data hasil penelitian akan disajikan dalam  $\text{mean} \pm \text{SD}$  (Standar Deviasi). Data yang didapat dari kelima kelompok dianalisis secara statistik dengan uji normalitas dan uji homogenitas kemudian dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA* untuk membandingkan rata-rata data. Kemudian dilanjutkan dengan uji *LSD (Post Hoc Test)* untuk mengetahui letak perbedaan terkecil antar variabel pada masing-masing perlakuan, dengan syarat mempunyai distribusi yang normal dan kesamaan varian yang dapat diperiksa dengan uji normalitas dan uji homogenitas. Data akan diolah dengan menggunakan program *IBM Statistical Product and Service Solution (SPSS)* versi 19.





### 3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Skema Alur Penelitian

## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil Penelitian

#### 4.1.1 Data Hasil Penelitian

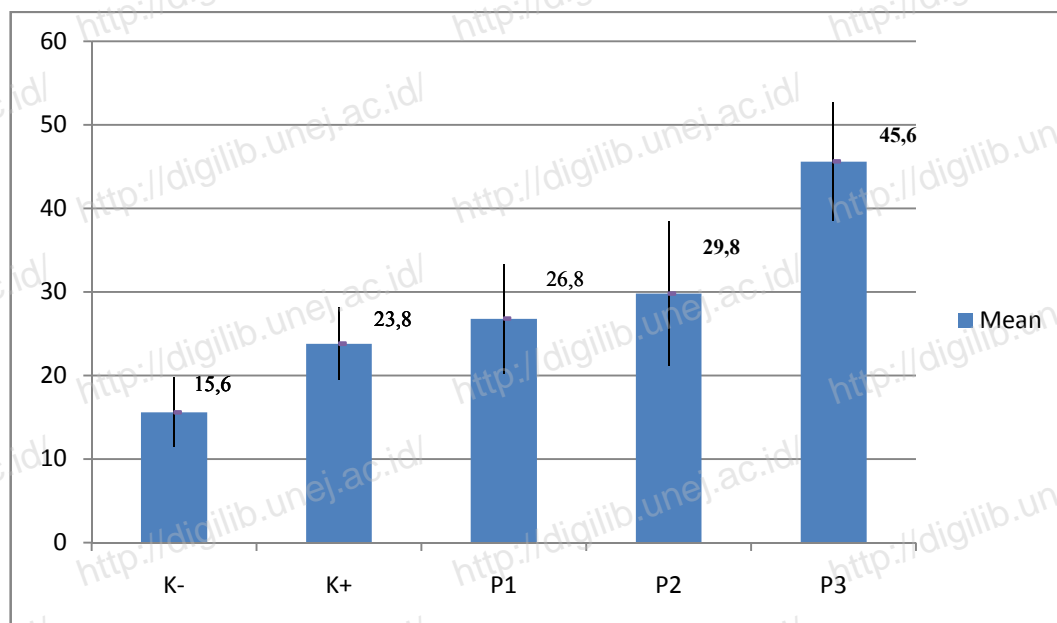
Tikus ditimbang setiap minggu selama 30 hari untuk mengetahui perkembangan berat badan. Pengamatan apoptosis sel kanker hepar dilakukan dengan pemeriksaan histopatologi dengan menghitung jumlah apoptosis sel kanker hepar melalui mikroskop dengan perbesaran 400 kali dalam 10 lapang pandang. Sampel yang digunakan adalah lima kelompok sampel (K-, K+, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>) setelah 30 hari post induksi.

Pemeriksaan histopatologi tersebut menggunakan pewarnaan imunohistokimia dengan *Terminal Transferase and Biotin-16-dUTP (TUNEL Fluorescent Method)*, didapatkan hasil sebagai berikut:

Tabel 4.1 Rerata apoptosis sel kanker hepar pada tiap kelompok

No	Kelompok	Mean	Std Deviasi
1	K-	15,60	4,15
2	K+	23,80	4,32
3	P1	26,80	6,57
4	P2	29,80	8,64
5	P3	45,60	7,12
total	25	28,32	11,62

- 1 = Kelompok kontrol negatif (placebo)
- 2 = Kelompok kontrol positif (placebo + DMBA 4,2 mg/hari)
- 3 = Kelompok perlakuan 1 (DMBA 4,2 mg/hari + sari kedelai 5 mg/hari)
- 4 = Kelompok perlakuan 2 (DMBA 4,2 mg/hari + sari kedelai 10 mg/hari)
- 5 = Kelompok perlakuan 3 (DMBA 4,2 mg/hari + sari kedelai 20 mg/hari)



Gambar 4.1 Diagram gambar rerata apoptosis sel kanker hepar pada tiap kelompok

Keterangan:

K<sub>(-)</sub> = Kelompok kontrol negatif (tanpa induksi DMBA dan pemberian sari kedelai)

K<sub>(+)</sub> = Kelompok kontrol positif (DMBA 4,2 mg/hari)

P<sub>1</sub> = Kelompok perlakuan I (DMBA 4,2 mg/hari + sari kedelai 5 mg/hari)

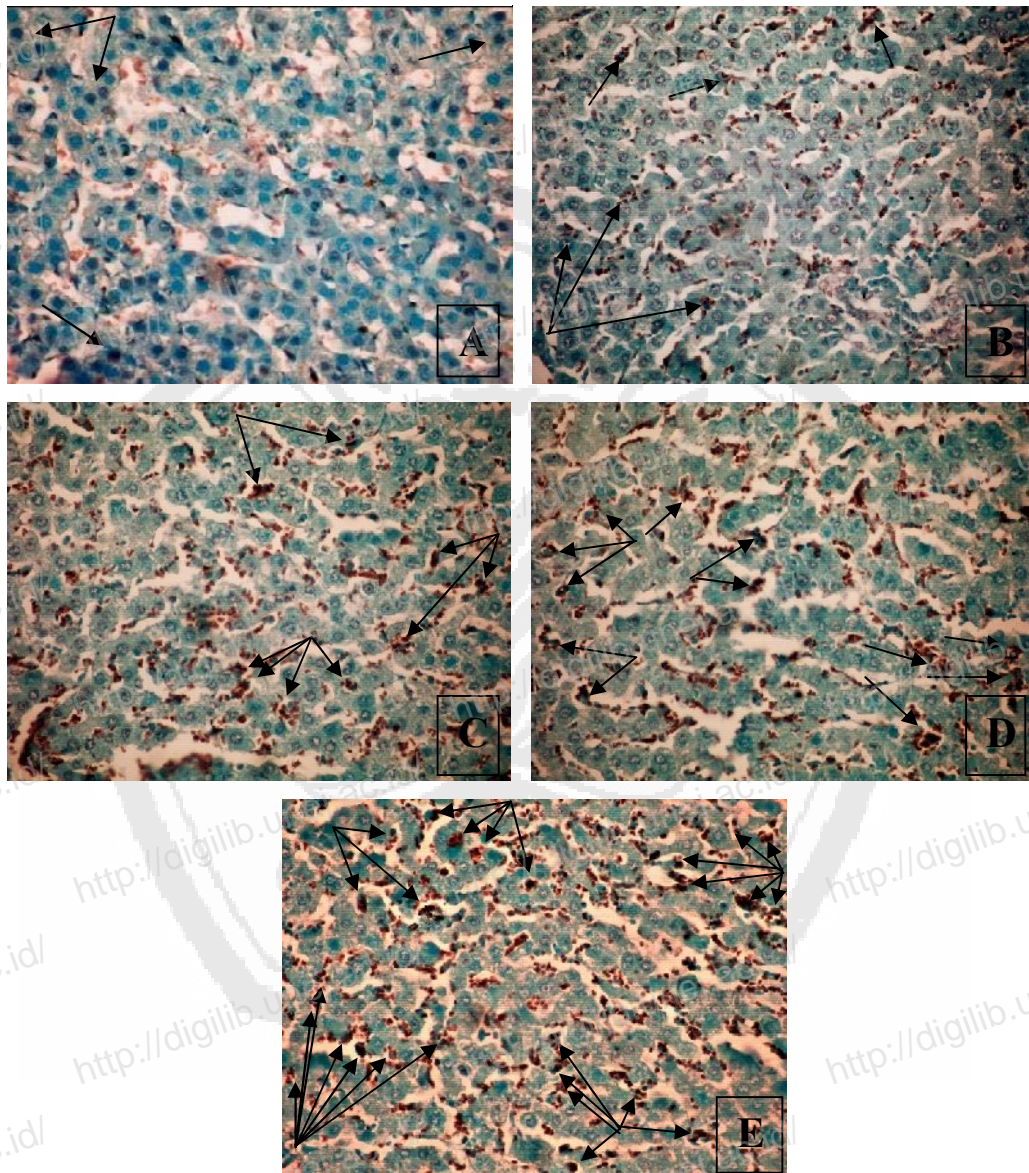
P<sub>2</sub> = Kelompok perlakuan II (DMBA 4,2 mg/hari + sari kedelai 10 mg/hari)

P<sub>3</sub> = Kelompok perlakuan III (DMBA 4,2 mg/hari + sari kedelai 20 mg/hari)

Berdasarkan gambar 4.1 diketahui bahwa rerata apoptosis sel kelompok kontrol negatif adalah sebesar 15,60 sel per 10 lapang pandang dengan standar deviasi 4,15 dan kelompok kontrol positif sebesar 23,80 sel dengan standar deviasi 4,32. Sedangkan untuk kelompok perlakuan 1 rerata apoptosis sel sebesar 26,80 sel per 10 lapang pandang dengan standar deviasi 6,57. Untuk kelompok perlakuan 2 sebesar 29,80 sel per 10 lapang pandang dengan standar deviasi 8,64 sedangkan rerata apoptosis sel kelompok perlakuan 3 sebesar 45,60 sel per 10 lapang pandang dengan standar deviasi 7,12.

Kelompok kontrol negatif yang tidak diinduksi DMBA mempunyai rerata apoptosis sel kanker hepar paling rendah dibandingkan semua kelompok, yaitu sebesar 15,60 sel per 10 lapang pandang. Sedangkan rerata apoptosis sel kanker hepar terbesar terdapat pada kelompok perlakuan 3, yaitu sebesar 45,60 sel per 10 lapang pandang pada pemberian dosis sari kedelai 20mg/hari. Selain itu, pada

kelompok perlakuan ( $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ ) dapat dilihat bahwa terdapat kenaikan jumlah apoptosis sel kanker hepar yang mengalami apoptosis seiring dengan meningkatnya dosis sari kedelai.



Gambar 4.2 Gambaran histopatologi hasil pewarnaan imunohistokimia, metode TUNEL dari sel hepar *Rattus norvegicus*

Keterangan: A: Sel hepar kelompok kontrol negatif (K-), B: Sel hepar kelompok kontrol positif (K+), C: Sel hepar kelompok perlakuan 1 ( $P_1$ ), D: Sel hepar kelompok perlakuan 2 ( $P_2$ ), E: Sel hepar kelompok perlakuan 3 ( $P_3$ )

→ : sel apoptosis

Pada gambaran mikroskopis sel kanker yang mengalami apoptosis ditandai dengan kondensasi dan fragmentasi nukleus dan dikelilingi oleh halo yang jernih dan dapat dilabel dengan TUNEL, yang akan mengekspresikan warna coklat pada nukleus yang mengalami penyusutan (*shrinkage*) (panah warna hitam). Dihitung melalui mikroskop dengan perbesaran 400 kali dan dinyatakan dalam satuan N sel per lapang pandang.

#### 4.1.2 Hasil Uji Analisis

Berdasarkan output deskriptif standar deviasi terendah terdapat pada kelompok 1 (K-) yaitu 4,15, sedangkan yang tertinggi terdapat pada kelompok 4 (P<sub>2</sub>) yaitu 8,64. Semakin besar nilai standar deviasi menunjukkan semakin besarnya ketidakseragaman data. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa kelompok 4 (P<sub>2</sub>) menunjukkan ketidakseragaman (variatif) dalam hal jumlah apoptosis.

Langkah selanjutnya adalah melakukan uji *One Way Anova*. Adapun syarat untuk melakukan uji ini adalah pendistribusian dan keseragaman data harus baik. Oleh karena itu dilakukan uji asumsi normalitas dan homogenitas terlebih dahulu untuk mengetahui distribusi dan keseragaman data.

Tabel 4.2 Tes Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test	Jumlah apoptosis
Kolmogorov-Smirnov Z	,695
Asymp. Sig. (2-tailed)	,719

Berdasarkan hasil uji normalitas dengan *One-Sample Kolmogorof-Smirnov Test*, diperoleh data berdistribusi normal. Hal ini dapat dilihat dari nilai *Significancy* (Asymp. Sig.) semua kelompok lebih besar dari 0,05 yang artinya data - data tersebut berdistribusi normal. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas dengan Uji *Levene*.



Tabel 4.3 Tes Homogenitas

Levene Statistic	df1	df2	sig
1,219	4	20	,334

Dari hasil Uji *Levene* didapatkan nilai *Significancy* (Sig.) semua kelompok lebih besar dari 0,05. Maka dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan varian antar kelompok sampel yang diteliti atau varian antar kelompok sampel adalah sama (homogen).

Dari hasil uji tersebut didapatkan data yang terdistribusi normal dan homogen, sehingga analisis data dapat dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* untuk membedakan rerata semua kelompok data dengan cara membandingkan variansinya.

Tabel 4.4 Uji Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Between Groups	2426,640	4	606,660	14,818	,000
Within Groups	818,800	20	40,940		
Total	3245,440	24			

Output Anova menunjukkan bahwa nilai *Significancy* (Sig.) 0,00. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antar semua kelompok. Oleh karena itu diperlukan uji lanjutan melalui Uji *Post Hoc-Tukey HSD* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok tersebut.

Pada penelitian ini, data yang dibandingkan ada 5 kelompok, yaitu 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan dengan dosis sari kedelai yang berbeda. Pada uji *Uji Post Hoc-Tukey HSD* dinyatakan mempunyai perbedaan yang signifikan jika mempunyai nilai *Significancy* (Sig.) kurang dari 0,05 (Sig. <0,05).

Tabel 4.5 Uji Post Hoc-Tukey HSD

kelompok	kelompok	sig	keterangan
K-	K+	,290	x
	P1	,078	x
	P2	,017	o
	P3	,000	o
K+	K-	,290	x
	P1	,944	x
	P2	,585	x
	P3	,000	o
P1	K-	,078	x
	K+	,944	x
	P2	,944	x
	P3	,001	o
P2	K-	,017	o
	K+	,585	x
	P1	,944	x
	P3	,007	o
P3	K-	,000	o
	K+	,000	o
	P1	,001	o
	P2	,007	o

Keterangan :

o = ada perbedaan antar kelompok

x = tidak ada perbedaan antar kelompok

Hasil perbandingan *Post Hoc Test-Tukey HSD*, diketahui rerata apoptosis sel kanker kelompok K- tidak memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok K+ dan kelompok P<sub>1</sub> (*sig.* > 0,05). Kelompok K- memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok P<sub>2</sub> dan kelompok P<sub>3</sub> (*sig.* < 0,05). Rerata apoptosis sel kanker kelompok K+ tidak memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok K-, P<sub>1</sub>, dan P<sub>2</sub> (*sig.* > 0,05). Kelompok K+ memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok P<sub>3</sub> (*sig.* < 0,05). Rerata apoptosis sel kanker kelompok P<sub>1</sub> tidak memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok K-, K+, dan P<sub>2</sub> (*sig.* > 0,05). Kelompok P<sub>1</sub> memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok P<sub>3</sub> (*sig.* < 0,05). Kelompok P<sub>2</sub> memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok K- dan kelompok P<sub>3</sub> (*sig.* < 0,05). Kelompok

P<sub>2</sub> tidak memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok K<sup>+</sup> dan P<sub>1</sub> (*sig.* > 0,05). Rerata apoptosis sel kanker kelompok P<sub>3</sub> memiliki perbedaan yang signifikan terhadap semua kelompok (*sig.* < 0,05).

#### 4.2 Pembahasan

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian sari kedelai (*Glycine max* L.) terhadap apoptosis sel kanker hepar pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA. Sari kedelai diberikan dalam dosis bertingkat dengan tujuan untuk mengetahui dosis optimal yang dapat menginduksi apoptosis sel kanker hepar pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA.

Pada penelitian ini digunakan tikus wistar (*Rattus Novergicus*) betina sebagai hewan uji. Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan, diketahui bahwa di Indonesia angka kejadian hepatitis B sebagai etiologi terjadinya kanker hati pada laki – laki dan wanita hampir sama, yaitu 9,5 % diderita oleh laki-laki dan 9,3 % diderita oleh wanita. Pada infeksi hepatitis B, 30 – 60 % menjadi kronik (kanker hati) dan sisanya menjadi *carrier* (pembawa) dan faktor pola hidup seperti penggunaan alkohol, perokok dan kegemukan pada wanita yang tidak disertai dengan aktifitas atau olah raga tubuh dibandingkan laki – laki meningkatkan faktor resiko terjadinya kanker hati pada wanita (Siregar, 2011). Oleh karena itu dipilih tikus wistar betina sebagai model percobaan.

Pada penelitian ini digunakan DMBA dengan dosis 4,2 mg/hari sebagai induksi karsinogenesis sel kanker hepar. 7,12-Dimetilbenz(a)antrasen (DMBA) sebagai inisiator pembentukan kanker memerlukan aktivasi metabolik oleh enzim yang secara normal ada dalam tubuh dan merupakan bagian dari proses metabolisme xenobiotik fase I. Mekanisme aktivasi DMBA melibatkan enzim sitokrom P450 isoform CYP1A1 dan peroksidase menjadi *intermediate* reaktif yang dapat merusak DNA yaitu terbentuknya epoksida dihidrodiol dan kation radikal. Epoksida dehidrodiol akan mengikat gugus amino ekosiklik purin DNA secara kovalen menjadi bentuk *adduct* yang stabil, sedangkan kation radikal akan mengikat N7 atau C8 purin menjadi bentuk *adduct* tidak stabil yaitu depurinisasi menjadi tempat yang kehilangan purin pada DNA. Jalur epoksida dehidrodiol



inilah yang bertanggung jawab terhadap inisiasi tumor karsinogenik DMBA dibanding bentuk kation radikal (Melendez-Colon *et al.*, 1999).

Senyawa PAH (dalam penelitian ini memakai prokarsinogen DMBA) setelah mengalami transformasi kimiawi akan menghasilkan metabolit akhir yaitu *ultimate carcinogen* yang bersifat elektrofilik (memiliki atom yang kekurangan elektron) yang sangat reaktif dan bereaksi dengan atom kaya elektron di RNA, protein sel, dan terutama DNA. Interaksi antara senyawa karsinogen dengan DNA biasa disebut *DNA adduct* yang dapat menyebabkan kerusakan DNA sehingga terjadi proses karsinogenesis. Interaksi ini dapat dihambat dengan adanya detoksifikasi senyawa karsinogen atau *ultimate carcinogen* oleh enzim-enzim pemetabolisme terutama pada fase II yaitu enzim glutathion S-transferase (GST). Kemampuan detoksifikasi akan meningkat apabila ada peningkatan aktivitas (induksi) enzim ini. Peningkatan detoksifikasi menyebabkan senyawa reaktif menjadi tidak aktif dan mudah diekskresikan keluar tubuh. Aktifitas selanjutnya terjadi penurunan *DNA adduct* (kerusakan DNA) dan proses inisiasi karsinogen dihambat. Kandungan isoflavon dalam flavonoid yang sangat tinggi pada sari kedelai mampu meningkatkan ekspresi enzim *glutathion S-transferase* (GST) yang dapat mendetoksifikasi karsinogen reaktif menjadi tidak reaktif dan lebih polar sehingga cepat dieliminasi dari tubuh, selain itu isoflavon juga dapat mengikat senyawa karsinogen sehingga mencegah ikatan dengan DNA (Susilowati, 2010).

Sari kedelai yang digunakan dalam penelitian ini mengandung senyawa antioksidan di antaranya adalah vitamin E, vitamin A, provitamin A, vitamin C dan senyawa flavonoid golongan isoflavon (Rahma, 2010). Jenis senyawa isoflavon ini terutama adalah genistin, daidzin, dan glisitin (Ayuningtias, 2009). Keistimewaan isoflavon yang telah diketahui sampai saat ini ialah kemampuan sebagai antioksidan dan antikanker. Isoflavon kedelai juga terbukti, melalui penelitian *in vitro* dapat menghambat enzim tirosin kinase dan juga menghambat DNA topoisomerase, oleh karena itu dapat menghambat perkembangan sel kanker dan angiogenesis (Pawiharsono, 2008).

Aktivitas antikanker juga ditunjukkan flavonoid melalui induksi apoptosis. Flavonoid menghambat ekspresi enzim *topoisomerase* I dan *topoisomerase* II yang berperan dalam katalisis pemutaran dan relaksasi DNA. Inhibitor enzim *topoisomerase* akan menstabilkan kompleks *topoisomerase* dan menyebabkan DNA terpotong dan mengalami kerusakan. Kerusakan DNA dapat menyebabkan terekspresinya protein proapoptosis seperti Bax dan Bak, dan menurunkan ekspresi protein-protein antiapoptosis yaitu Bcl-2 dan Bcl-XL. Peningkatan apoptosis akan menghambat pertumbuhan sel kanker (Ren *et al.*, 2003).

Penelitian yang di gunakan adalah jenis penelitian eksperimental laboratoris yaitu penelitian percobaan yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh yang akan timbul dari adanya perlakuan tertentu. Rancangan penelitian menggunakan *post test only control group design* yang artinya suatu populasi tertentu diasumsikan tiap unitnya homogen, sehingga pengukuran awal tidak dilakukan karena dianggap sama untuk semua kelompok yang berasal dari satu populasi dan hanya dilakukan pengukuran akhir (Pratiknya, 2003). Teknik pengambilan sampel adalah menggunakan *simple random sampling*, yaitu cara pengambilan sampel dimana setiap unsur yang memberntuk populasi diberi kesempatan yang sama untuk terpilih menjadi sampel (Notoatmodjo, 2002).

Hasil uji normalitas dengan *One-Sample Kolmogorof-Smirnov Test*, diperoleh data berdistribusi normal. Hal ini dapat dilihat dari nilai *Significancy* (Asymp. Sig.) semua kelompok lebih besar dari 0,05 yang artinya data - data tersebut berdistribusi normal. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas dengan Uji *Levene*. Hasil Uji *Levene* didapatkan nilai *Significancy* (Sig.) semua kelompok lebih besar dari 0,05. Maka dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan varian antar kelompok sampel yang diteliti atau varian antar kelompok sampel adalah sama (homogen). Dari hasil uji tersebut didapatkan data yang terdistribusi normal dan homogen, sehingga analisis data dapat dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* untuk membedakan rerata semua kelompok data dengan cara membandingkan variansinya.

Output Anova menunjukkan bahwa nilai *Significancy* (Sig.) 0,00. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antar semua

kelompok. Oleh karena itu diperlukan uji lanjutan melalui Uji *Post Hoc-Tukey HSD* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok tersebut.

Hasil yang didapatkan dari analisis data dengan uji lanjutan melalui tes HSD (table 4.5), rerata apoptosis sel kanker hepar dari kelompok K- dengan kelompok K+ tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan, artinya pada kedua kelompok yang tanpa pemberian sari kedelai, induksi apoptosis sel abnormal hanya minimal. Rerata apoptosis sel kanker hepar untuk kelompok P<sub>1</sub> dan P<sub>2</sub> dibandingkan dengan kelompok K+ tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan, artinya pada kelompok P<sub>1</sub> dan P<sub>2</sub> dosis kedelai yang diberikan 5 mg/hari dan 10 mg/hari tidak dapat menginduksi apoptosis sel kanker secara optimal. Sedangkan perbandingan rerata apoptosis sel kanker hepar dari kelompok P<sub>3</sub> terhadap kelompok K+ menunjukkan nilai yang signifikan artinya, pemberian sari kedelai dosis 20 mg/hari memiliki pengaruh yang lebih besar untuk menginduksi apoptosis sel kanker hepar dibandingkan dengan dosis sari kedelai 5 mg/hari dan 10 mg/hari.

Kelompok P<sub>1</sub> tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap kelompok K-, artinya pemberian dosis kedelai 5 mg/hari belum dapat menunjukkan induksi apoptosis sel kanker yang optimal. Sedangkan kelompok P<sub>2</sub> dan P<sub>3</sub> menunjukkan nilai yang signifikan terhadap kelompok K-, artinya dosis kedelai 10 mg/hari dan 20 mg/hari mampu menginduksi terjadinya apoptosis lebih banyak dibandingkan dengan kelompok yang tidak di beri perlakuan sari kedelai.

Pada perbandingan kelompok P<sub>2</sub> terhadap kelompok P<sub>1</sub> tidak menunjukkan hasil yang signifikan. Sedangkan perbandingan kelompok P<sub>3</sub> terhadap P<sub>1</sub> didapatkan hasil yang signifikan. Hal ini menunjukkan kelompok P<sub>3</sub> terjadi kenaikan rerata apoptosis sel kanker hepar yang lebih signifikan dibandingkan kelompok P<sub>2</sub>, artinya pemberian dosis sari kedelai 20 mg/hari memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan pemberian dosis sari kedelai 10 mg/hari.

Berdasarkan hasil analisis data tersebut, didapatkan perbedaan pengaruh pemberian dosis sari kedelai terhadap apoptosis sel kanker hepar pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi 7,12-Dimetilbenz(a)antrasen (DMBA). Sari kedelai dengan dosis 20 mg/hari pada kelompok perlakuan 3 (P<sub>3</sub>) mampu

mengurangi sel kanker hepar dengan kenaikan jumlah apoptosis sel abnormal secara signifikan.

Penelitian tentang manfaat dari sari kedelai sebagai agen kemopreventif kanker ini sejalan dengan beberapa penelitian yang terdahulu, yaitu:

- a) Bukti penelitian pada model kanker menjelaskan bahwa isoflavon memiliki peranan penting dalam pencegahan kanker. Sebagai contoh konsumsi produk yang berbasis kedelai yang mengandung isoflavon dapat menurunkan rata-rata penyakit kanker payudara, kanker usus, dan kanker prostat di negara Jepang dan Cina. Mekanisme pencegahan kanker dalam isoflavon kedelai adalah adanya kapasitas efek antioksidan yang kuat (Messina *et al.*, 1994).
- b) TGF Beta menekan stimulasi *epidermal growth factor* (EGF) pada sel epitel kelenjar payudara, lebih lanjut pemberian genistein pada kedelai menaikkan kadar TGF beta pada medium sel secara *in vitro*. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa penghambatan kanker oleh genistein pada kedelai disebabkan oleh kemampuannya mengaktivasi TGF beta. Mekanisme penghambatan kanker yang lain oleh isoflavon kedelai adalah melalui perubahan ekspresi gen yang bertanggung jawab pada proses diferensiasi sel atau *cell cycle arrest*. Empat sel melanoma manusia dan satu sel melanoma tikus B16-B16 digunakan untuk membuktikan penghambatan pertumbuhan dan diferensiasi oleh genistein (Rauth *et al.*, 1997). Mekanisme lain yang telah diteliti mengenai aktivitas isoflavon yang terdapat pada kedelai antara lain menginduksi apoptosis, memodulasi aktivitas *DNA topoisomerase*, dan menghambat transduksi sinyal (Su *et al.*, 2000).
- c) Hasil penelitian di berbagai bidang kesehatan telah membuktikan bahwa konsumsi produk kedelai berperan penting dalam menurunkan resiko terkena penyakit degeneratif. Studi epidemiologi juga telah membuktikan bahwa masyarakat yang secara teratur mengonsumsi makanan dari kedelai, memiliki kasus kanker payudara, kolon dan prostat yang lebih rendah. Kedelai mengandung senyawa alami menyerupai estrogen yang disebut

fitoestrogen. Wanita yang mengonsumsi kedelai lebih banyak akan memiliki usia menopause lebih tinggi dan jarang mengalami keluhan pasca menopause (Koswara, 2006).



## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil pembahasan dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

- a. Sari kedelai (*Glycine max* L.) berpengaruh terhadap peningkatan apoptosis sel kanker hepar secara signifikan.
- b. Ada pengaruh perbedaan pemberian dosis sari kedelai (*Glycine max* L.) terhadap apoptosis sel kanker hepar pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) dan di penelitian ini dosis 20 mg/hari menunjukkan kenaikan jumlah apoptosis sel kanker secara signifikan.

### 5.2 Saran

- a. Perlu dilakukan uji toksisitas mengenai pemberian sari kedelai terhadap organ tubuh.
- b. Perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan ragam jenis olahan kedelai lainnya untuk mengetahui manfaat lain yang dikandungnya.
- c. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan sari kedelai dengan dosis lebih dari 20 mg/hari.
- d. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kebenaran manfaat kedelai menginduksi apoptosis melalui mekanisme kerja enzim *glutathion S-transferase*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Al-Attar AM. 2004. *The influence of dietary grape seed oil on DMBA-induced liver enzymes disturbance in the frog, Rana ridibunda*. *Pakistan J Nutr* 3 (5): 304-309.
- Amirudin, Rifal. 2007. Hepatobilier. Dalam : *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Sudoyo, Aru W., dkk. 2007. Jakarta : Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 415 – 419.
- Andriana, D. 2009. *Pengaruh Fraksi Air Ekstrak Rimpang Temu Mangga (Curcuma mangga, Val) terhadap Ekspresi Ki67 pada Galur Sel Karsinoma Kolon HT-29*. Surakarta.
- Andrianto, T. T., dan N. Indarto, 2004. *Budidaya Dan Analisis Usaha Tani Kedelai*. Penerbit Absolut, Yogyakarta.
- Ayuningtias, A. 2009. *Isoflavon dalam Kedelai Memberi Banyak Manfaat Bagi Tubuh*. Jatinangor.
- Badan Pengawas Obat Dan Makanan RI. 2003. *Peraturan di Bidang Pangan. Direktorat Surveilans Dan Penyuluhan Keamanan Pangan*. Deputi Bidang Pengawasan Keamanan Pangan Dan Bahan Berbahaya. Jakarta. Hal 2, 4, 15, 21, 30.
- Bruera ED, Fainsinger RL (2003): *Clinical management of Cachexia and anorexia*. In: Oxford textbook of Palliative Medicine 2bd ed. Editors: Doyle D, Hanks G, Donald NM, Oxford University Press, pp 548 – 557.
- Buters, J., L. Quintanilla-Martinez, W. Schober, V.J. Soballa, J. Hintermair, T. Wolff, F.J. Gonzalez dan H. Greim. 2003. *CYP1B1 Determines Susceptibility to Low Doses of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene Induced Ovarian Cancers in Mice: Correlation of CYP1B1-Mediated DNA Adducts with Carcinogenicity*. *Carcinogenesis*, 24: 327-334.
- Depkes RI. 2006. *Profil Kesehatan Indonesia 2005*. Jakarta. <http://www.depkes.go.id>. [12 Februari 2012].
- Desen, Wal. 2008. *Buku Ajar Onkologi Klinis Edisi 2*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI.
- Dorland, W. A. Newman. 2002. *Kamus Kedokteran Dorland*. Jakarta: EGC.

Elisabet S, Imelda. 2009. *Karakteristik Penderita Hepatoma Yang Dirawat Inap di RS. Santa Elisabeth*. Medan: FKM USU.

Encyclopedia Britannica. 2003. *Anterior and Posterior views of the Liver*. <http://www.britannica.com/EBchecked/media/68633/Anterior-and-posterior-views-of-the-liver> [ 10 Februari 2012]

Esti dan Sediadi, A. 2000. *Buku Panduan Teknologi Pangan*. Jakarta.

Fatmal, Irvandra. 2009. *Hama Tikus dan Pengendaliannya*.

Fillaeli, Annisa. 2010. *Kajian Aflatoxin sebagai Salah Satu Cemaran Alami Bahan Pangan*. Yogyakarta: Universitas Negeri Yogyakarta

Freddy, S., and Waliyar, F. 2000. *Properties of Aflatoxin and It Producing Fungi*. <http://www.aflatoxin.info/aflatoxin.asp>. [28 Februari 2012].

Fujiki, H., Horiuci, T., Yamashita, K., Haki, H., Suganuma, M., Nishino, H., Iwashima, A., Hirata, Y., dan Sugimura, T. 1986. *Inhibition of Tumor Promotion by Flavonoids. Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmaceutical and Structure Activity Relationships*. Alan R. Liss, Tnc. p: 429-440.

Hadi, Sujono. 2002. Hati. Dalam : *Gastroenterologi*. Bandung : P.T. ALUMNI, 402 – 475.

Hanafiah, K. A. 2001. *Rancangan Percobaan: Teori dan Aplikasi, Edisi Revisi*, Jakarta: Raja Grafindo Persada, pp: 1-9.

Harahap, SA. 2011. *Botani Tanaman*. Medan: Universitas Sumatra Utara.

Hebel R, Stromberg MW. 1989. *Anatomy of the Laboratory Rat*, The William & Wilin Company, Baltimore: 50

Irwan, A. W. 2006. *Budidaya Tanaman Kedelai (Glycine max (L.) Merrill)*. Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran, Jatinangor.

Jemal, A. dkk., 2010. Cancer Statistics 2006. *A Cancer Journal for Clinicians*. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.20073>. [11Februari 2012].

Junqueira, Luiz Carlos. 2007. *Basic histology: text & atlas, 10 ed*. Jakarta: EGC.

Koswara, Sutrisno. 2006. *Isoflavon Senyawa Multi Manfaat dalam Kedelai*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Liu, S., Edgerton, S. M., Moore, D. H., Thor, A. D. 2001. *Measures of Cell Turnover (Proliferation and Apoptosis) and Their Association with Survival in Breast Cancer*. Clin cancer res; 7: 1716-23.



Lumongga, Fitriani. 2008. *Apoptosis*. Medan: Universitas Sumatra Utara.

Lytle, Charles, F., dan John, R. Meyer. 2005. *General Zoology*. McGraw-Hill Companies, Inc. New York.

Manikandan, Murugan, Abbas, Abraham, Nagini. 2007. *Ocimum sanctum Linn. (Holy Basil) ethanolic leaf extract protects against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced genotoxicity, oxidative stress, and imbalance in xenobiotic metabolizing enzymes*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17887944>.2012. [14 Februari 2012].

Margono, T. D., Suryati, S., Hartinah. 2000. *Buku Panduan Teknologi Pangan, Pusat Informasi Wanita dalam Pembangunan PDII-LIPI bekerja sama dengan Swiss Development Cooperation*. Hal 32-33., <http://warintek.ristek.go.id/pangan/kacang-kacangan%20dan%biji-bijian/bubuk kacang kedelai.pdf>. [13 Februari 2012].

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

Messina, M. J., Parsky, V., Setchell, K. D. R., Barns, S. 1994. *Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data*. *Nutr. Cancer*. 21: 113-131.

Miyata, M., M. Furukawa, K. Takahashi, F.J. Gonzales dan Y. Yamazoe, 2001. *Mechanism of 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene-Induced Immunotoxicity: Role of Metabolic Activation at the Target Organ*. *Jpn. J. Pharmacol.*, 86: 302-309.

Molteni, A., Brizio, Molteni, L., Persky, V. 1995. *In Vitro Hormonal Effect of Soybean Isoflavon*. *J.Nutr.* 125: 751-756. <http://www.scribd.com/doc/46468519/2-Kedelai-Anti-Kanker> [12 Februari 2012].

Notoatmodjo, Soekidjo. 2002. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Edisi Revisi, Rineka Cipta, Jakarta.

Pawiroharsono, Suyanto. 2008. *Prospek dan Manfaat Isoflavon pada Kesehatan, Direktorat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi*.

Peterson, T. G., Kim, H., dan Barnes S. 1997. *Mechanism of Action of the Soy Isoflavone Genistein at the Cellular Level*. Second International Symposium on the Role of Soybean in Preventing and Treating Chronic Diseases, September, Brussel, Belgique; 15-18.

- Pratiknya, A. W. 2003. *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Kedokteran dan Kesehatan*. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada.
- Rahma, Heny. 2010. *Karakterisasi Senyawa Bioaktif Isoflavon dan Uji Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Tempe Berbahan Baku Kedelai Hitam*. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Rasyid, Abdul. 2006. *Pentingnya Peranan Radiologi Dalam Deteksi Dini Dan Pengobatan Kanker Hati Primer*. Medan : FK USU.
- Rauth, S., Kichina, J., Green, A. 1997. *Inhibition of growth and induction of differentiation of metastatic melanoma cells in vitro by genistein: chemosensitivity is regulated by cellular p53*. *Br. J. Cancer*. 75: 1559-1566.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., Zhang, L. 2003. *Flavonoids: Promising Anticancer Agents*, *Medicinal Research Review*; 23(4): 519-534.
- S.D. Ryder. 2003. *Guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma (HCC) in adults*. *Gut*; 52 – 56.
- Shike M (1996): *Nutrition therapy for the Cancer Patient*. In: *Hematology / Oncology Clinic of North America* 10 Number 1, pp 221 – 334.
- Siregar, Lianda. 2011. *PKRS: Deteksi Dini Kanker Hati*. Jakarta: Pusat Kanker Nasional Rumah Sakit Dharmais.
- Sjamsuhidajat, R., dan De Jong, W., 2004. *Neoplasia*. Dalam: Sjamsuhidajat, R., dan De Jong, W., ed. *Buku Ajar Ilmu Bedah*. Jakarta : EGC, 131 dan 138.
- Sofyan, Rochestry. 2000. *Terapi Kanker pada Tingkat Molekular*. Jakarta: *Cermin Dunia Kedokteran No. 127*.
- Sowash, J. R. 2009. *Rat dissection: 1*. Available from: <http://jrsowash.wikispaces.com/file/view/rat.student.pdf> [17 Januari 2012]
- Stubert, Johannes dan Gerber, Bernd. 2009. *Isoflavones – Mechanism of Action and Impact on Breast Cancer Risk*. Department of Obstetrics and Gynecology, University of Rostock, Germany.
- Su, S. J., Yeh, T. M., Lei, H. Y., Chow, N. H. 2000. *The potential of soybean foods as a chemoprevention approach for human urinary tract cancer*. *Clin. Cancer Res.*6: 230-236.
- Susilowati, 2010. *Efek Kemopreventif Ekstrak Metanol Kulit Kayu Nangka (Artocarpus Heterophylla Lmk.) Pada Karsinogenesis Kanker Payudara*

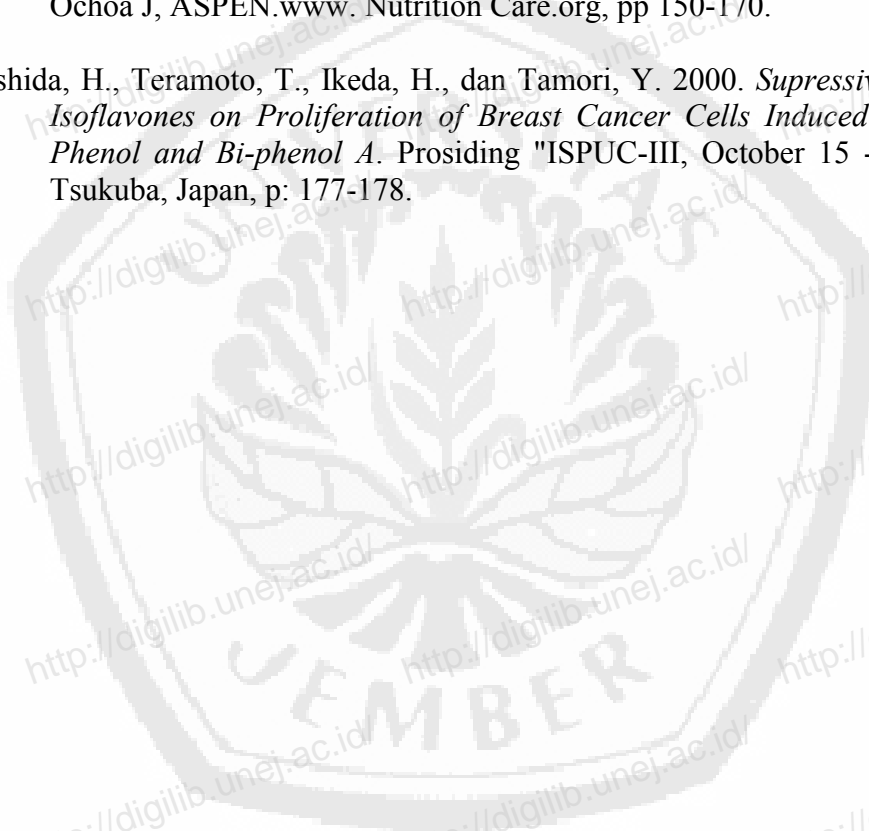
*Tikus Betina yang Diinduksi DMBA*. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Tanudjaja N, George. 2008. *Anatomi Makroskopis Hepar*. Manado: BIK Biomed Fakultas Kedokteran Sam Ratulangi, 181 – 186.

Tortora, Gerard J., Derrickson, Bryan. 2006. *Principles of Anatomy and Physiology*. United States of America : Von Hoffman Press.

Trujillo EB, Bergerson ASL, Graf JC, Mechael M (2005): *Cancer*. In: *The American Society for Parenteral and Enteral Nutrition Support Practice Manual*. 2nd ed editors: Merritt R, Delyge MH, Holcombe B, Muller C, Ochoa J, ASPEN. www. Nutrition Care.org, pp 150-170.

Yoshida, H., Teramoto, T., Ikeda, H., dan Tamori, Y. 2000. *Supressive Effect of Isoflavones on Proliferation of Breast Cancer Cells Induced by Nonyl-Phenol and Bi-phenol A*. Prosiding "ISPUC-III, October 15 - 20, 2000, Tsukuba, Japan, p: 177-178.



**LAMPIRAN A. Cara Pewarnaan Sel Apoptosis dengan *Terminal Transferase and Biotin-16-dUTP (TUNEL Fluorescent Method)***

- a) Spesimen jaringan hepar diambil secukupnya dan ditempatkan di atas *object glass*, tambahkan suspensi *Proteinase K* 100 ml diamkan 20 menit. Tujuan penambahan enzim ini adalah untuk mendegradasi protein, terutama protein yang terdapat pada membrane.
- b) Kemudian bilas specimen dengan larutan PBS (Phosphate Buffer Saline) 1 kali dan keringkan menggunakan *tissue*. Selama proses pengeringan, lakukan dengan hati – hati, jangan sekali – sekali menggosokkan *tissue* pada jaringan karena dapat menghapus jaringan tersebut.
- c) Tambahkan Hydrogen Peroxidase (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3% sebanyak 100 ml, inkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Bilas dengan larutan PBS lalu keringkan.
- d) Berikan Reaction Buffer 100 µL, inkubasi selama 30 menit.
- e) Tambahkan Reaction Buffer 100 µL dan Complete Labeling Reaction Mixture secukupnya. Tutup dengan parafilm atau tuperware untuk dimasukkan ke dalam inkubator. Inkubasi dengan suhu 37° C selama 1 jam. Kemudian cuci dengan larutan PBS, dan keringkan menggunakan *tissue*.
- f) Lakukan pengeblokan dengan *Blocking Buffer* sebanyak 100 µL lalu inkubasi pada suhu ruangan selama 10 menit. Tanpa dicuci, berikan *Antybody Solution* 100 µL. Inkubasi 1 jam kemudian cuci dengan PBS.
- g) Lakukan pengeblokan kedua dengan reagen dan jumlah yang sama, kemudian campur dengan larutan *conjugated* yang sudah tersedia.
- h) Lakukan pengeblokan ketiga dengan reagen dan jumlah yang sama, kemudian inkubasi selama 30 menit.
- i) Buang sisa – sisa pembuatan preparat tanpa dicuci dan tunggu 30 menit. Setelah bersih, tambahkan *DAB Solution* sampai specimen berwarna coklat. Cuci dengan larutan PBS 1 kali, kemudian langkah terakhir adalah berikan etelan untuk menutup *object glass* dengan *cover glass*.

**LAMPIRAN B. Tes Normalitas Sampel (*One-Sample* Kolmogorov-*Smirnov* Test)**

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Jumlah Apoptosis Sel Hepar
N		25
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	28.3200
	Std. Deviation	11.62870
Most Extreme Differences	Absolute	.139
	Positive	.139
	Negative	-.086
Kolmogorov-Smirnov Z		.695
Asymp. Sig. (2-tailed)		.719

a. Test distribution is Normal.

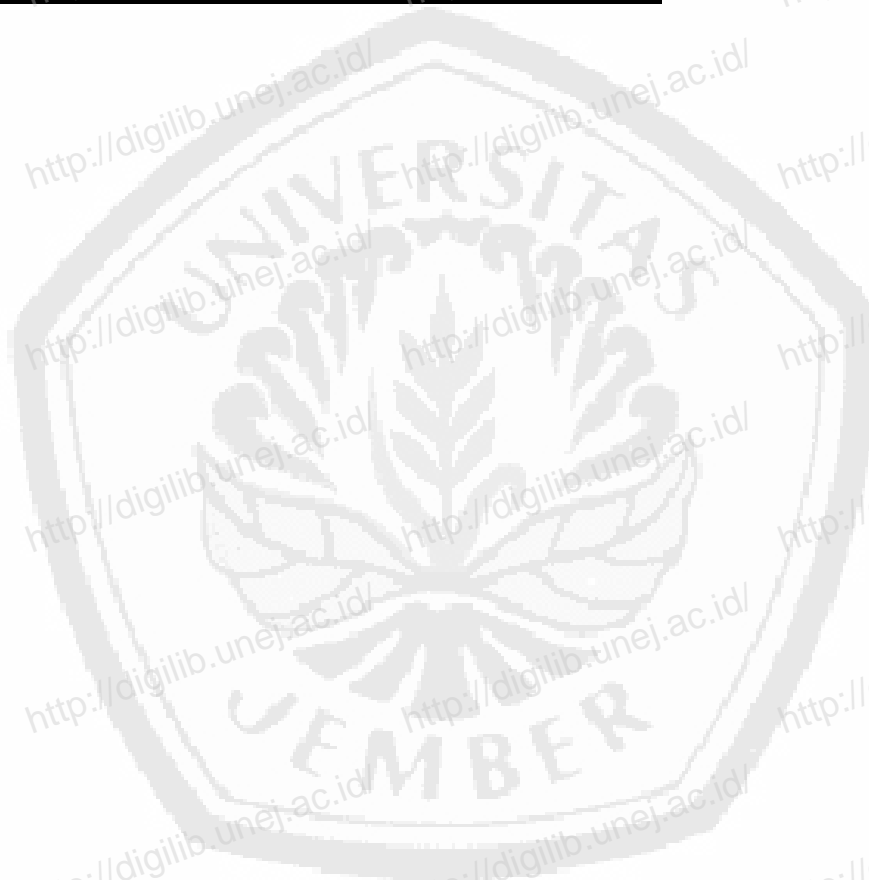
b. Calculated from data.



**LAMPIRAN C. Tes Homogenitas Sampel (*Levene Statistic*)****Test of Homogeneity of Variances**

Jumlah Apoptosis Sel Hepar

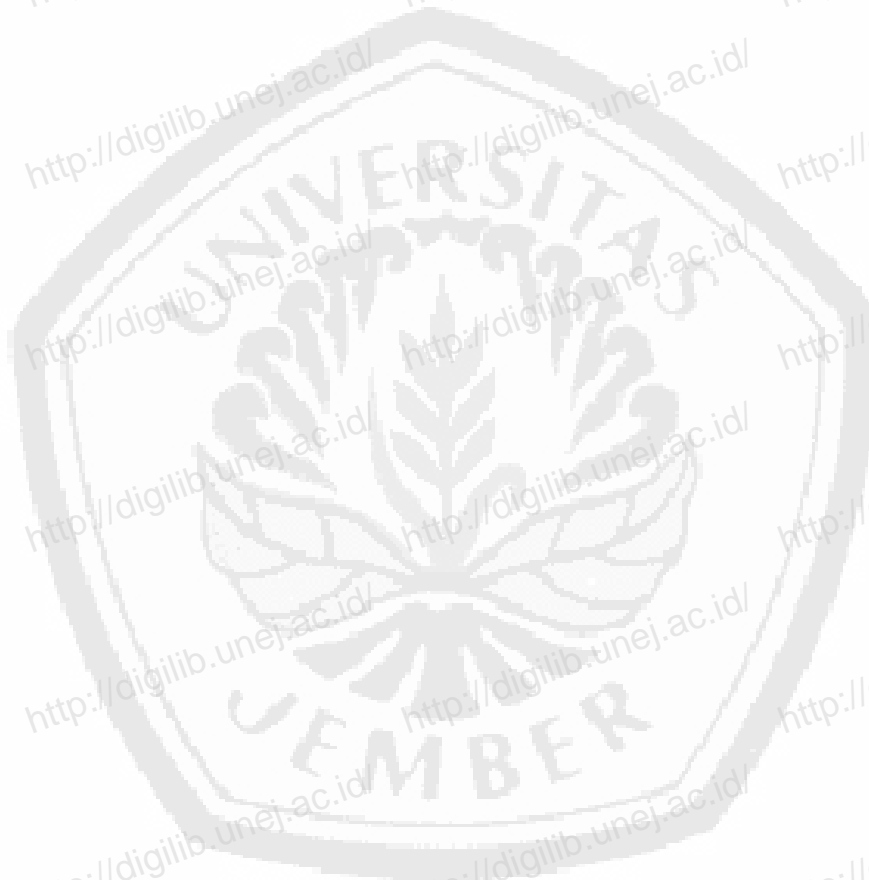
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,219	4	20	,334



**LAMPIRAN D. Uji Analisis Variansi Satu Arah ( *One Way* ANOVA)****ANOVA**

Jumlah Apoptosis Sel Hepar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2426,640	4	606,660	14,818	,000
Within Groups	818,800	20	40,940		
Total	3245,440	24			



### LAMPIRAN E. Uji *Post Hoc* (Tukey-HSD)

#### Multiple Comparisons

Jumlah Apoptosis Sel Hepar

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	K+	-8,20000	4,04673	,290	-20,3093	3,9093
	P1	-11,20000	4,04673	,078	-23,3093	,9093
	P2	-14,20000*	4,04673	,017	-26,3093	-2,0907
	P3	-30,00000*	4,04673	,000	-42,1093	-17,8907
K+	K-	8,20000	4,04673	,290	-3,9093	20,3093
	P1	-3,00000	4,04673	,944	-15,1093	9,1093
	P2	-6,00000	4,04673	,585	-18,1093	6,1093
	P3	-21,80000*	4,04673	,000	-33,9093	-9,6907
P1	K-	11,20000	4,04673	,078	-,9093	23,3093
	K+	3,00000	4,04673	,944	-9,1093	15,1093
	P2	-3,00000	4,04673	,944	-15,1093	9,1093
	P3	-18,80000*	4,04673	,001	-30,9093	-6,6907
P2	K-	14,20000*	4,04673	,017	2,0907	26,3093
	K+	6,00000	4,04673	,585	-6,1093	18,1093
	P1	3,00000	4,04673	,944	-9,1093	15,1093
	P3	-15,80000*	4,04673	,007	-27,9093	-3,6907
P3	K-	30,00000*	4,04673	,000	17,8907	42,1093
	K+	21,80000*	4,04673	,000	9,6907	33,9093
	P1	18,80000*	4,04673	,001	6,6907	30,9093
	P2	15,80000*	4,04673	,007	3,6907	27,9093

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



### LAMPIRAN F. Hasil Penghitungan Apoptosis

Kelompok	Tikus	Lapang pandang										Jumlah
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
K-	1	2	1	3	1	1	1	1	4	1	1	16
	2	1	1	1	1	2	-	-	1	-	2	9
	3	3	1	1	4	2	1	2	1	4	1	20
	4	1	2	1	1	3	1	2	1	2	1	15
	5	2	3	1	2	1	2	3	2	1	1	18
K+	1	4	2	1	2	1	3	1	2	3	2	21
	2	1	2	4	2	5	1	2	3	4	2	26
	3	3	2	4	1	1	2	3	1	1	5	23
	4	1	2	5	2	7	3	2	4	1	3	30
	5	2	3	1	1	2	2	3	1	1	3	19
P1	1	7	2	3	1	2	2	1	1	3	1	23
	2	2	5	1	1	6	5	1	2	1	1	25
	3	1	1	1	4	2	1	4	3	1	1	19
	4	3	4	3	1	2	5	2	7	2	3	32
	5	2	3	1	2	4	4	7	2	5	5	35
P2	1	4	3	2	4	6	2	3	3	4	6	37
	2	2	2	4	5	2	3	1	2	4	5	30
	3	2	1	3	4	1	3	2	5	3	1	25
	4	1	1	1	1	2	4	3	2	1	2	18
	5	5	2	2	3	6	4	5	6	2	4	39
P3	1	4	5	3	6	3	6	5	7	5	6	50
	2	5	4	3	3	5	5	4	7	4	5	45
	3	6	8	4	5	4	3	8	9	3	5	55
	4	4	2	2	4	3	5	6	4	4	3	37
	5	3	3	3	4	6	4	5	5	3	5	41

**LAMPIRAN G. Foto Dokumentasi Penelitian**

