



**PENGARUH EKSTRAK KEDELAI (*GLYCINE MAX (L.) MERILL*)  
TERHADAP APOPTOSIS SEL KANKER KOLON PADA  
TIKUS PUTIH (*RATTUS NORVEGICUS STRAIN  
WISTAR*) YANG DIINDUKSI DMBA (*7,12-  
DIMETHYLBENZ( $\alpha$ )ANTHRACENE*)  
(STUDI *IN VIVO* PADA TIKUS PUTIH GALUR WISTAR)**

**SKRIPSI**

Oleh

**Ari Ilham Wahyudi  
NIM 072110101066**

**BAGIAN EPIDEMIOLOGI DAN BIostatistik KEPENDUDUKAN  
FAKULTAS KESEHATAN MASYARAKAT  
UNIVERSITAS JEMBER  
2011**



**PENGARUH EKSTRAK KEDELAI (*GLYCINE MAX (L.) MERILL*)  
TERHADAP APOPTOSIS SEL KANKER KOLON PADA  
TIKUS PUTIH (*RATTUS NORVEGICUS STRAIN  
WISTAR*) YANG DIINDUKSI DMBA (*7,12-  
DIMETHYLBENZ( $\alpha$ )ANTHRACENE*)  
(STUDI *IN VIVO* PADA TIKUS PUTIH GALUR WISTAR)**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan program pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kesehatan Masyarakat dan mencapai gelar Sarjana Kesehatan Masyarakat

Oleh

**Ari Ilham Wahyudi  
NIM 072110101066**

**BAGIAN EPIDEMIOLOGI DAN BIostatistik KEPENDUDUKAN  
FAKULTAS KESEHATAN MASYARAKAT  
UNIVERSITAS JEMBER  
2011**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini penulis persembahkan untuk :

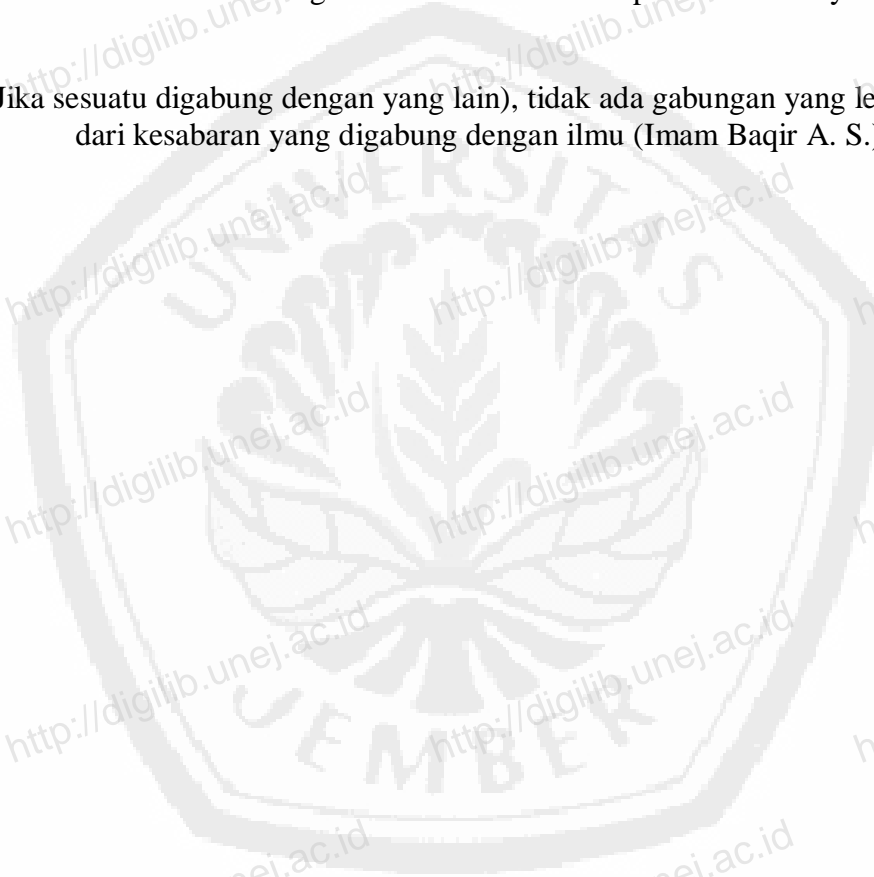
1. Bapak Achmad Budin, S. Pd. dan Ibu Kusyati serta Mbak Yulia Susilowati, S. Pd. serta keluarga besarku di Desa Sukowono yang telah membesarkanku, merawat, membimbing, mendoakan, melindungi, memberi kasih sayang, dan memotivasi tanpa lelah dengan penuh kasih sayang sampai pada detik ini.
2. Keluarga Bapak Subairi yang telah memberikan tempat tinggal, dan masukan dari awal masuk kuliah sampai menjelang penyelesaian skripsi ini.
3. Semua guru-guruku sejak kecil sampai pada saat ini yang telah mendidik, berbagi ilmu, pengalaman dan cerita.
4. Adik Riska Widyaningrum yang selalu sabar menemani, memotivasi, mendoakan, memberi masukan, memberi kasih sayang dan mengingatkan akan tanggung jawab.
5. Bangsa, Agama dan Almamater Universitas Jember yang telah menjadi tempat menimba ilmu dan pengalaman.

## MOTTO

Segala sesuatu ada jalannya, dan jalan menuju surga adalah ilmu.  
(Rasulullah SAW)<sup>\*)</sup>

Percayalah dengan ilmu derajatmu akan diangkat oleh Allah dan hanya dengan  
ilmulah seseorang akan lebih mudah memperbaiki nasibnya.<sup>\*)</sup>

(Jika sesuatu digabung dengan yang lain), tidak ada gabungan yang lebih indah  
dari kesabaran yang digabung dengan ilmu (Imam Baqir A. S.)<sup>\*)</sup>



---

<sup>\*)</sup> Shirazy, Habiburrahman El. 2007. *Mahkota Cinta*. Jakarta : Zee collection.

## PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

nama : Ari Ilham Wahyudi

NIM : 072110101066

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul : *Pengaruh Ekstrak Kedelai (Glycine max (L.) Merill) terhadap Apoptosis Sel Kanker Kolon pada Tikus Putih (Rattus Norvegicus Strain Wistar) yang Diinduksi DMBA (7,12-Dimethylbenz(α)Anthracene) (Studi In Vivo pada Tikus Putih Galur Wistar)* adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun serta 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 adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapatkan sanksi akademik jika dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 6 Juni 2011

Yang menyatakan,

Ari Ilham Wahyudi

NIM 072110101066

**SKRIPSI**

**PENGARUH EKSTRAK KEDELAI (*GLYCINE MAX (L.) MERILL*)  
TERHADAP APOPTOSIS SEL KANKER KOLON PADA  
TIKUS PUTIH (*RATTUS NORVEGICUS STRAIN  
WISTAR*) YANG DIINDUKSI DMBA (7,12-  
*DIMETHYLBENZ( $\alpha$ )ANTHRACENE*)  
(STUDI *IN VIVO* PADA TIKUS PUTIH GALUR WISTAR)**

Oleh

Ari Ilham Wahyudi  
NIM 072110101066

Pembimbing

Dosen pembimbing utama : dr. Candra Bumi, M. Si.  
Dosen pembimbing anggota : Dwi Martiana W., S. Si., M. Si.

## PENGESAHAN

Skripsi berjudul *Pengaruh Ekstrak Kedelai (Glycine max (L.) Merrill) terhadap Apoptosis Sel Kanker Kolon pada Tikus Putih (Rattus Norvegicus Strain Wistar) yang Diinduksi DMBA (7,12-Dimethylbenz(α)Anthracene) (Studi In Vivo pada Tikus Putih Galur Wistar)* telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Jember pada:

hari : Senin

tanggal : 6 Juni 2011

tempat : Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua

Sekretaris

Farida Wahyu Ningtyias, S.KM., M.Kes.

NIP 19801009 200501 2 002

Dwi Martiana W., S.Si., M.Si.

NIP 19800313 200812 2 003

Anggota I

Anggota II

dr. Candra Bumi, M.Si.

NIP 19740608 200801 1 012

dr. Al Munawir, Ph.D.

NIP 19690901 199903 1 003

Mengesahkan  
Dekan Fakultas Kesehatan Masyarakat,  
Universitas Jember

Drs. Husni Abdul Gani, M.S.

NIP 19560810 198303 1 003

Pengaruh Ekstrak Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) terhadap Apoptosis Sel Kanker Kolon pada Tikus Putih (*Rattus Norvegicus Strain Wistar*) yang Diinduksi DMBA (7,12-Dimethylbenz( $\alpha$ )Anthracene) (Studi In Vivo pada Tikus Putih Galur Wistar) (*Effect of Soybean Extract on DMBA (7,12-dimethylbenz ( $\alpha$ ) anthracene) Induced Rat Colon Adenoma Cell Apoptotic (In Vivo Studies in Rattus Norvegicus strain Wistar)*).

Ari Ilham Wahyudi

*Epidemiology and Demography Biostatistical Department  
Faculty of Public Health, Jember University*

#### **ABSTRACT**

*Colon cancer is the third common cause of cancer death in the world and in Indonesia. Its prevalence was increasing every year. Colon cancer commonly caused by daily intakes of total energy, and macronutrients in high average and the consumption of dietary fiber is low. Consumption of soybean is a healthy diet that has the capacity for prevention and treatment of the cancer. Soybean contains isoflavones, which proved to suppress growth of cancer cells. It was a true experimental in vivo studies using rats (*Rattus Norvegicus strain Wistar*) as the model of cancer which given extract of soybean. The aims of this study to identify directly the effects of soybean on cancer growth through observation of apoptotic in the rat colon. The number of rat used as a model were 30 rats, divided into 5 groups of treatment (t), where each group consisted of 6 rats (n). The treatments on this experiment were inducted of DMBA (7,12-dimethylbenz ( $\alpha$ ) anthracene) and soybean extract. Rats' colon with tumor suspected changed into paraffin blocks to be executed by the TUNEL test. The apoptotic data analyzed by analysis of variance (ANOVA). The ANOVA results was indicated that there was a difference between the groups under significance level 1% of 0.0001. According to the result of the research, concluded that soybean extract tend to prevent the colon cancer.*

*Key words : colon cancer, soybean ekstrak, apoptotic.*



## RINGKASAN

**Pengaruh Ekstrak Kedelai (*Glycine max* (L.) Merill) Terhadap Apoptosis Sel Kanker Kolon pada Tikus Putih (*Rattus Norvegicus strain Wistar*) yang diinduksi DMBA (7,12-Dimethylbenz(a)anthracene) (Studi *In Vivo* pada Tikus Putih Galur Wistar); Ari Ilham Wahyudi, 072110101066; 2011: 83 halaman; Bagian Epidemiologi dan Biostatistika Kependudukan Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Jember**

Kanker kolon merupakan salah satu penyakit keganasan yang insiden maupun prevalensi meningkat dari tahun ke tahun. Berdasarkan penelitian Williams dan Hopper selama tahun 2002, di Eropa dan Amerika Serikat pasien kanker kolon jauh lebih banyak dibandingkan di Asia. Insiden kanker kolon di Indonesia juga cukup tinggi dan prevalensinya semakin meningkat setiap tahunnya, demikian juga angka kematian yang terjadi akibat kanker ini. Berdasarkan data dari Rumah Sakit Kanker Dharmais dinyatakan bahwa kanker kolon merupakan salah satu dari sepuluh besar kejadian kanker yang sering diderita oleh pasien. Prevalensi kanker kolon di Kabupaten Jember juga mengalami peningkatan selama tahun 2008 sampai 2009.

Sebuah laporan yang ditulis oleh *American Institute of Cancer Research* (16 Februari 2009) memperkirakan bahwa sekitar 45% dari kasus kanker kolon dan 38% dari kasus kanker payudara di US dapat dicegah melalui diet, aktivitas fisik dan menjaga berat badan. Salah satu alternatif pencegahan yang dapat dilakukan secara mudah, efektif, efisien dan terjangkau yaitu melalui diet nutrisi. Salah satu diet nutrisi yang menjadi perhatian selama beberapa tahun terakhir karena memiliki potensi dalam mencegah dan mengobati penyakit kronis yaitu konsumsi kedelai dan produk olahannya. Kedelai mengandung isoflavon yang dipercaya mampu mencegah terjadinya kanker.

Penelitian ini merupakan penelitian *True Experimental* dengan desain *Post Test Control Group* yang dilakukan secara *Completely Randomized Design*.

Penelitian ini dilakukan di laboratorium secara *in vivo* menggunakan tikus putih (*Rattus Norvegicus strain Wistar*) sebagai model. Dalam desain ini terdapat 5 kelompok yang masing-masing dipilih secara random dari populasi. Jumlah tikus yang digunakan sebagai sampel adalah 30 ekor yang terbagi dalam 5 kelompok perlakuan (*t*), dimana tiap kelompok terdiri 6 ekor (*n*).

Metode pembuatan tikus model kanker kolon dengan pemberian DMBA sebanyak 35 mg/kg BB yang dilarutkan dalam 1 ml minyak wijen dan diberikan ke tikus per oral. Pemberian DMBA dilakukan setiap hari pada kelompok 2 (kontrol negatif), kelompok 3 (perlakuan I), kelompok 4 (perlakuan II), dan kelompok 5 (perlakuan III). Ekstrak kedelai diberikan melalui sonde dengan dosis 5 mg/kg BB untuk kelompok 3 (perlakuan I), 10 mg/kg BB untuk kelompok 4 (perlakuan II), dan 20 mg/kg BB untuk kelompok 5 (perlakuan III). Pemberian DMBA dan ekstrak kedelai dilakukan setiap hari secara bersamaan selama 42 hari. Pada akhir perlakuan tikus dipuasakan selama 1 hari kemudian dibedah dan selanjutnya dilakukan pembuatan preparat untuk pengujian TUNEL.

Jumlah apoptosis sel kanker kolon tikus dihitung berdasarkan jumlah rata-rata kematian sel kanker yang ditandai fragmentasi sitoplasma dan DNA berwarna coklat pada 10 lapang pandang preparat kolon tikus setelah uji TUNEL melalui mikroskop cahaya. Data hasil penelitian berupa rata-rata apoptosis dianalisis secara statistik menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA). Hasil uji F pada ANOVA menunjukkan bahwa minimal ada satu di antara kelima kelompok tikus itu yang memberikan pertambahan jumlah apoptosis atau rata-rata jumlah apoptosis yang berbeda dengan *p-value* 0,0001 ( $\alpha = 0,01$ ). Selain itu, plot data kelompok perlakuan (X) dan jumlah apoptosis (Y) menunjukkan bahwa ada perbedaan dan peningkatan jumlah apoptosis pada tiap kelompok perlakuan. Berdasarkan hasil analisis statistik dan plot data X-Y tersebut dapat dikatakan bahwa ada kecenderungan pengaruh pemberian ekstrak kedelai terhadap apoptosis sel kanker kolon tikus.

Kemopreventif berpotensi untuk menjadi komponen utama kontrol kanker. Salah satu upaya optimal untuk preventif kanker ini adalah kombinasi antara manipulasi nutrisi dan pemberian bahan kemopreventif. Kemopreventif dalam hal ini berperan mengembalikan fungsi gen yang terganggu, yaitu mengembalikan fungsi apoptosis atau menginduksi apoptosis. Apoptosis adalah suatu proses kematian sel yang terprogram dan diatur secara genetik. Dua metode yang dikenal untuk mekanisme apoptosis, yaitu melalui jalur intrinsik dan jalur ekstrinsik.

Aspek gizi kedelai telah diteliti secara intensif selama 5-10 tahun lalu, karena kedelai merupakan makanan unik sumber isoflavon, suatu group fitokimia. Pemberian ekstrak kedelai pada penelitian ini berpengaruh pada jumlah apoptosis sel kanker kolon. Berdasarkan penelitian terdahulu dinyatakan bahwa salah satu zat isoflavon kedelai yaitu *genistein* dapat menginduksi apoptosis baik melalui jalur ekstrinsik maupun jalur instrinsik. Secara ekstrintik, *genistein* pada isoflavon kedelai berkaitan dengan reseptor TNF yang pada akhirnya menyebabkan apoptosois sel. *Genistein* dalam kedelai juga dapat menginduksi apoptosis sel kanker melalui jalur intrinsik pada gen p53 dan protein Bax. Fungsi gen p53 yaitu memperbaiki DNA yang rusak dan mengistirahatkan siklus sel di G1 sampai perbaikan selesai. Jika perbaikan gagal dan terdapat kerusakan DNA yang hebat, gen p53 akan memicu penghapusan sel dengan apoptosis.

Kesimpulan dari penelitian ini yaitu terdapat perbedaan rata-rata jumlah apoptosis antara kelompok perlakuan dan dinyatakan terdapat kecenderungan adanya pengaruh pemberian ekstrak kedelai terhadap apoptosis sel kanker kolon tikus yang diinduksi DMBA. Saran pada penelitian ini yaitu perlu adanya penelitian lanjutan untuk mengetahui jenis-jenis kandungan gizi kedelai sebagai nutrisi pencegah kanker dan kelanjutan penelitian pada penentuan dosis ekstrak kedelai yang dapat dikonsumsi oleh manusia untuk pencegahan kanker kolon. Selain itu dapat dilakukan pengembangan penelitian terhadap manusia sehingga mampu mengurangi insiden maupun prevalensi kanker kolon di masyarakat.

## PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul *Pengaruh Ekstrak Kedelai (Glycine max (L.) Merrill) Terhadap Apoptosis Sel Kanker Kolon pada Tikus Putih (Rattus Norvegicus strain Wistar) yang Diinduksi DMBA (7,12-Dimethylbenz(a)Anthracene) (Studi In Vivo pada Tikus Putih Galur Wistar)*. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Drs. Husni Abdul Gani, M.S, selaku Dekan Fakultas Kesehatan Masyarakat;
2. Bapak dr. Candra Bumi, M.Si, selaku Dosen Pembimbing I, dan Ibu Dwi Martiana Wati, S.Si., M.Si, selaku Dosen Pembimbing II yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian selama penulisan skripsi ini;
3. Irma Prasetyowati, S.K.M., M.Kes, selaku Kepala Bagian Epidemiologi dan Biostatistika Kependudukan;
4. Bapak Achmad Budin, S.Pd., dan Ibu Kusyati serta Mbak Yulia Susilowati, S. Pd., yang telah memberikan dorongan moril, dan materi serta do'a sehingga saya mampu menyelesaikan kuliah di Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Jember dengan baik;
5. Bapak Subairi dan Ibu Tin yang telah menyediakan tempat tinggal dan selalu memberi masukan serta saran untuk kelancaran selama masa kuliah;
6. Adik Riska Widyaningrum yang selalu sabar menemani, mendoakan, memberi kasih sayang, memberi berbagai masukan dan saran, memberi semangat dari awal sebelum penyusunan sampai pada penyelesaian skripsi;

7. Sahabat-sahabatku Gita, Niki, Ipunk, Umi, Bayu, Frezka dan sahabat-sahabatku di FKM lainnya terima kasih atas bantuan kalian baik fisik maupun moril selama masa kuliah;
8. Angkatan 2007 Fakultas Kesehatan Masyarakat, khususnya peminatan Epidemiologi dan Biostatistika Kependudukan, teman-teman BEM, UKM MAPAKESMA, UKM Bulutangkis, dan UKM Lentera terima kasih atas kerjasamanya selama kuliah;
9. Keluarga besar Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Jember, terima kasih atas bantuan selama masa kuliah.
10. Teman-teman Fakultas Kesehatan Masyarakat dan Fakultas Kedokteran angkatan 2008 serta dokter Heni yang tergabung dalam tim penelitian ini, terima kasih atas kerjasamanya.
11. Semua pihak yang telah memberikan kontribusi bagi terselesaikannya skripsi ini.

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

Jember, 6 Juni 2011

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 PEMBIMBINGAN</b> .....	vi
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>RINGKASAN</b> .....	ix
<b>PRAKATA</b> .....	xii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xiv
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xviii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xix
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xx
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	xxi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Tujuan.....	6
1.3.1 Tujuan Umum.....	6
1.3.2 Tujuan Khusus.....	6
1.4 Manfaat.....	7
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	7
1.4.2 Manfaat Praktis.....	7

<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>8</b>
2.1 Kolon .....	8
2.1.1 Fisiologi .....	8
2.1.2 Anatomi .....	12
2.2 Kanker Kolon.....	14
2.2.1 Epidemiologi.....	14
2.2.2 Definisi Kanker Kolon .....	15
2.2.3 Etiologi Kanker Kolon .....	18
2.2.4 Patofisiologi Kanker Kolon .....	19
2.2.5 Pencegahan .....	25
2.3 Karsinogen .....	26
2.3.1 DMBA ( <i>7,12-Dimethylbenz(a)anthracene</i> ) .....	28
2.3.2 Karsinogenesis Kolon .....	30
2.4 Kedelai ( <i>Glycine max</i> (L.) Merrill).....	31
2.4.1 Morfologi dan Habitat Kedelai .....	31
2.4.2 Kandungan Kedelai .....	33
2.4.3 Kedelai sebagai Zat Anti Kanker .....	34
2.5 Kerangka Konseptual.....	37
2.6 Hipotesis .....	38
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>39</b>
3.1 Jenis Penelitian .....	39
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian .....	40
3.2.1 Tempat Penelitian .....	40
3.2.2 Waktu Penelitian.....	41
3.2 Populasi dan Sampel Penelitian .....	41
3.3.1 Populasi Penelitian.....	41
3.3.2 Sampel Penelitian .....	41

3.4 Variabel dan Definisi Operasional .....	42
3.4.1 Variabel .....	42
3.4.2 Definisi Operasional .....	42
3.5 Alat dan Bahan Penelitian.....	43
3.6 Prosedur Penelitian.....	43
3.6.1 Persiapan Kandang.....	43
3.6.2 Persiapan Hewan Coba .....	43
3.6.3 Induksi DMBA .....	44
3.6.4 Perlakuan Ekstrak Kedelai .....	44
3.6.5 Proses Perlakuan pada Tikus .....	44
3.6.6 Cara Pembedahan dan Pengambilan Sel Kanker.....	45
3.6.7 Pemeriksaan Apoptosis dengan Metode Pelabelan Fragmentasi DNA Sistem Tunel .....	45
3.7 Teknik Penyajian dan Analisis Data.....	48
3.8 Kerangka Alur Penelitian.....	50
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>51</b>
4.1 Hasil.....	51
4.1.1 Apoptosis Sel Kolon pada Setiap Kelompok Perlakuan .	51
4.1.2 Analisis Pengaruh Ekstrak Kedelai terhadap Jumlah Apoptosis Sel Kanker Tikus yang Diinduksi Karsinoge- nisis Kolon.....	55
4.1.3 Analisis perbedaan pengaruh ekstrak kedelai terhadap jumlah apoptosis sel kanker tikus yang diinduksi karsinogenesis kolon antar kelompok perlakuan.....	57
4.2 Pembahasan.....	59
4.2.1 Pengaruh Ekstrak Kedelai terhadap Jumlah Apoptosis Sel Kanker Tikus yang Diinduksi Karsinogenesis Kolon	59



4.2.2 Perbedaan pengaruh ekstrak kedelai terhadap jumlah apoptosis sel kanker tikus yang diinduksi karsinogenesis kolon antar kelompok perlakuan.....	63
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	67
5.1 Kesimpulan .....	67
5.2 Saran .....	68
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	69
<b>LAMPIRAN</b> .....	74



## DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Faktor Risiko Kanker Kolon .....	18
2.2 Kandungan Nutrisi Kacang Kedelai Mentah per 100g Porsi Makan.....	33
2.3 Kandungan Isoflavon Beberapa Produk Kedelai Setiap 100 gr .....	34
3.1 Variabel, Definisi Operasional, Alat Ukur, dan Skala Data.....	43
3.2 Kelompok Perlakuan dalam Penelitian .....	45
4.1 Data Kejadian Tumor pada Organ Setelah Dilakukan Pembedahan .....	52
4.2 Mean dan Standar Deviasi (SD) Jumlah Apoptosis Sel Kanker Kolon.....	54
4.3 Hasil Uji Normalitas Data ( <i>One-Sample Kolmogorov Smirnov</i> ).....	56
4.4 <i>Test of Homogeneity of Variance</i> .....	56
4.5 ANOVA .....	57
4.6 <i>Multiple Comparisons</i> .....	57
4.7 <i>Homogenous Subsets</i> .....	58

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Anatomi Kolon .....	12
2.2 Jaringan Kanker Kolon .....	16
2.3 Proses Molekuler Terjadinya Keganasan.....	19
2.4 Biji Kedelai.....	31
2.5 Kerangka Konseptual Penelitian.....	37
3.1 Rancangan Percobaan .....	40
3.2 Prosedur Penelitian .....	47
3.3 Kerangka Alur Penelitian .....	50
4.1 Rata-rata dan Standar Deviasi Berat Badan Tikus Selama Masa Pengamatan.....	51
4.2 Pewarnaan Imunohistokimia untuk Sel Apoptosis Menggunakan TUNEL, Ditunjukkan Adanya Pewarnaan Coklat pada Inti yang Mengalami Penyusutan/Shinkage dan Dikelilingi oleh Halo Jernih.....	53
4.3 Plot Data Kelompok Perlakuan (X) dan Jumlah Apoptosis (Y) .....	55

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Prosedur Pengujian TUNEL.....	74
B. Nilai Rata-Rata (Mean) Jumlah Apoptosis Sel Kolon Tikus pada Sepuluh Lapang Pandang .....	77
C. Hasil Uji Statistik.....	78
D. Dokumentasi Penelitian .....	81



## DAFTAR SINGKATAN



AhR	= <i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i>
AIF	= <i>Apoptosis Initiating Factor</i>
ANOVA	= <i>Analisis of Variance</i>
Apaf-1	= <i>Apoptosis Activating Factor-1</i>
BB	= <i>Berat Badan</i>
Bcl-2	= <i>B Cell Lymphoma</i>
Bid	= <i>Bcl-2 Interacting Domain</i>
COX-2	= <i>Cyclooxygenase-2</i>
DAB	= <i>Diamono Benzidine</i>
DD	= <i>Death Domain</i>
DISC	= <i>Death Inducing Signaling Complex</i>
DMBA	= <i>7,12-dimethylbenz(a)anthracene</i>
DNA	= <i>Deoxsiribonukleic Acid</i>
DR	= <i>Death Receptor</i>
DW	= <i>Durbin-Watson</i>
EBV	= <i>Virus Epstein Barr</i>
FADD	= <i>Fas-Associated Death Domain</i>
FAP	= <i>Familial Adenomatous Polyposis</i>
FasL	= <i>Fas Ligand</i>
FLIP	= <i>FADD-Like Interleukin-1 Converting Enzyme Inhibitor Protein</i>
HE	= <i>Hematoxillin-Eosin</i>

HNPCC	= <i>Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer</i>
HRT	= <i>Hormon Replacement Therapy</i>
$H_0$	= <i>Hipotesis Awal</i>
NCI	= <i>National Cancer Institute</i>
NO	= <i>Nitroc Oxide</i>
NSAID	= <i>Non Steroid Anti Inflammation Drug</i>
PAH	= <i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbon</i>
PAI-1	= <i>Plasminogen Activator Inhibitor 1</i>
PCD	= <i>Programmed Cell Death</i>
ROS	= <i>Reactive Oxygen Spesies</i>
RSD	= <i>Rumah Sakit Daerah</i>
RSK	= <i>Rumah Sakit Kanker</i>
SD	= <i>Standar Deviasi</i>
TdT	= <i>Terminal Deoxynucleotide Transferase</i>
TNFR 1	= <i>Type I Tumour Necrosing Factors Receptor</i>
TNF- $\alpha$	= <i>Tumour Necrosing Factors alpha</i>
TRADD	= <i>TNF-Receptor-Associated Death Domain</i>
TRAIL	= <i>TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
TUNEL	= <i>Terminal Deoxycleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick and Labeling</i>
US	= <i>United States</i>
WHO	= <i>World Health Organization</i>

## **BAB I. PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Kanker kolon merupakan penyakit keganasan terbanyak ketiga di dunia dan prevalensinya meningkat dari tahun ke tahun. Berdasarkan penelitian Williams dan Hopper selama tahun 2002, di Eropa dan Amerika Serikat pasien kanker kolon jauh lebih banyak dibandingkan di Asia. Pada tahun 2001 kira-kira 135.400 kasus kanker kolon baru ditemukan, dan sebanyak 42% penduduk meninggal akibat penyakit ganas ini (Williams & Hopper, 2003). Eropa merupakan salah satu benua dengan angka insiden kanker kolon yang tinggi. Boyle dan Ferlay dalam jurnal *Cancer Incidence and Mortality in Europe 2004* menyatakan bahwa pada tahun 2004 di Eropa terdapat 2.886.800 insiden kanker yang terdiagnosa dan sebanyak 90% penderita mengalami kematian. Sedangkan insiden kanker yang paling sering terjadi di Eropa adalah kanker paru-paru (13,3%), diikuti oleh kanker kolon (13,2%) dan kanker payudara (13%) (Fahlevi, 2008).

Insiden kanker kolon di Indonesia juga cukup tinggi dan prevalensinya semakin meningkat setiap tahunnya, demikian juga angka kematian yang terjadi akibat kanker ini. Pada tahun 2002 kanker kolon di Indonesia menduduki peringkat kedua pada kasus kanker yang terdapat pada pria, sedangkan pada wanita kanker kolon menduduki peringkat ketiga dari semua kasus kanker (WHO, 2006). Berdasarkan data dari Rumah Sakit Kanker Dharmais dinyatakan bahwa pada tahun 2007, jumlah pasien kanker mencapai 1.264 orang dan sebesar 4,8% adalah penderita kanker kolon (RSK Dharmais, 2008). Prevalensi kanker kolon di Kabupaten Jember juga mengalami peningkatan selama tahun 2008 sampai 2009. Berdasarkan data inventaris RSD Soebandi Jember tahun 2008 tercatat pasien dengan kanker kolon sebanyak 29 orang dan pada tahun 2009 terjadi peningkatan kasus hingga mencapai 114%, yaitu 62 orang.

Kanker merupakan penyakit keganasan yang sampai saat ini masih memerlukan kajian untuk penanganannya. Sel kanker merupakan sel ganas yang secara fisiologi telah mengalami perubahan secara genetik sehingga terjadi proliferasi (pertumbuhan sel) yang berlebihan dan penurunan apoptosis (kematian sel). Secara patofisiologi, kanker adalah suatu kondisi dimana sel telah kehilangan pengendalian dan mekanisme normalnya, sehingga mengalami pertumbuhan yang tidak normal, cepat dan tidak terkendali. Kanker kolon merupakan tumor malignan yang muncul dari jaringan epitelial kolon atau rektum (Prawesti dkk, 2007).

Pertumbuhan tumor kolon secara tipikal tidak terdeteksi, tetapi menimbulkan beberapa gejala. Pada saat timbul gejala, penyakit mungkin sudah menyebar ke dalam lapisan lebih dalam dari jaringan usus dan organ-organ yang berdekatan. Kanker kolon menyebar dengan perluasan langsung ke sekeliling permukaan usus, submukosa, dan dinding luar usus. Struktur yang berdekatan, seperti hepar, lambung, duodenum, usus halus, pankreas, limpa, saluran *genitourinary*, dan dinding abdominal juga dapat dikenai oleh perluasan. Sel-sel kanker dari tumor primer dapat juga menyebar melalui sistem limpatik ke area sekunder seperti hepar, paru-paru, otak, tulang, dan ginjal (Lima and Gomes, 2005).

Penyakit kanker kolon ini sering juga disebut sebagai "*silent killer*". Pada kebanyakan orang kanker ini tidak menunjukkan gejala yang jelas pada stadium awalnya. Suatu gejala awal, pada beberapa pasien, kadang-kadang tumor akan mengeluarkan darah sedikit dan kadang tidak. Perdarahan seperti ini sulit untuk diperhatikan atau dideteksi. Kebanyakan penderita ditemukan pada stadium akhir ketika datang berobat ke rumah sakit dan memiliki tingkat kesembuhan yang sangat kecil. Oleh sebab itu, mortalitas akibat kanker kolon ini menjadi tinggi (William, 2005). Data WHO 2008 menyebutkan bahwa kanker kolon merupakan kanker tersering ketiga penyebab mortalitas di dunia dengan angka 677.000 mortalitas/tahun. Mortalitas akibat kanker ini di seluruh dunia diperkirakan akan terus meningkat, dan pada tahun 2030 angka mortalitasnya akan menjadi 12 juta.



Studi genetik, eksperimental dan epidemiologik menunjukkan bahwa kanker kolon disebabkan oleh interaksi yang kompleks antara kerentanan genetik dan faktor lingkungan (Asri, 2004). Lingkungan menunjukkan pengaruh yang lebih dominan bila dibandingkan faktor genetik dalam hal induksi kanker. Faktor diet diketahui sebagai modulator kanker pada manusia yang paling penting, terutama kanker di saluran pencernaan. Konsumsi lemak dan serat telah menjadi komponen utama yang berkaitan dengan meningkat atau berkurangnya risiko kanker. Beberapa orang yang suka mengkonsumsi diet tinggi lemak dan sedikit serat terbukti memiliki insiden kanker saluran pencernaan yang tinggi. Proses kanker ditandai oleh pertumbuhan jaringan yang berlebihan karena adanya gen-gen yang abnormal, proses ini berjalan bertahap dan penyebabnya multifaktorial (William, 2005).

Kehidupan modern yang menyuguhkan banyak kemudahan dan kecepatan dalam memenuhi kebutuhan seseorang, telah berdampak pada perubahan gaya hidup bagi sebagian orang. Banyaknya makanan cepat saji dan makanan berkadar lemak tinggi, menyebabkan sebagian orang kurang tertarik untuk mengkonsumsi makanan alamiah yang memerlukan proses lama, padahal makanan tersebut banyak mengandung zat yang bermanfaat bagi kesehatan. Hal-hal tersebut di atas merupakan sebagian dari sekian banyak faktor yang mendukung terjadinya kanker kolon. Sehingga, pola diet makanan yang kurang serat, gaya hidup yang kurang gerak/olah raga, terpapar dengan zat karsinogen, dan adanya riwayat keturunan penyakit sejenis, diyakini merupakan faktor risiko terjadinya kanker kolon (Praxesti dkk, 2007).

Berdasarkan sudut pandang epidemiologi, ada dua faktor yang menyebabkan suatu penyakit menjadi suatu masalah kesehatan yang penting. Pertama adalah frekuensi, ini berkaitan dengan tingginya insiden atau prevalensi, termasuk penyakit yang potensial akan meninggi dalam tingkat insidensi. Adanya faktor-faktor gaya hidup di atas memungkinkan kanker kolon di masa yang akan datang

potensial meninggi dalam hal insidensi serta angka prevalensi yang akan terjadi. Kedua adalah derajat keparahan atau tingginya mortalitas. Berdasarkan data kejadian kanker di Eropa tahun 2004 didapatkan 50 persen penderita kanker kolon meninggal dikarenakan penyakit ini. Hal ini disebabkan karena pada stadium awal seringkali tidak menunjukkan gejala, sehingga pasien baru datang setelah ada gejala yang biasanya sudah pada stadium akhir (Shim dan Ae-Son, 2010). Oleh sebab itu, penanggulangan yang dapat dilakukan adalah lebih menekankan pada upaya pencegahan untuk mengurangi insidensi serta prevalensi yang terjadi.

Sebuah laporan yang ditulis oleh *American Institute of Cancer Research* (16 Februari 2009) memperkirakan bahwa sekitar 45% dari kasus kanker kolon dan 38% dari kasus kanker payudara di US dapat dicegah melalui diet, aktivitas fisik dan menjaga berat badan. Salah satu alternatif pencegahan yang dapat dilakukan secara mudah, efektif, efisien dan terjangkau yaitu melalui diet nutrisi. Salah satu diet nutrisi yang menjadi perhatian selama beberapa tahun terakhir karena memiliki potensi dalam mencegah dan mengobati penyakit kronis yaitu konsumsi kedelai dan produk olahannya (Koswara, 2006).

Kedelai (*Glycine sp*) adalah salah satu komoditas pertanian yang melimpah di Indonesia. Kedelai mempunyai potensi sebagai sumber protein yang telah dikonsumsi secara luas oleh masyarakat. Sebagian penduduk di Asia yang banyak mengkonsumsi kedelai sebagai bahan makanan dalam diet sehari-hari diketahui memiliki angka insiden kanker kolon lebih rendah dibanding penduduk Amerika dan Eropa yang lebih banyak mengkonsumsi tinggi lemak dan kurang mengkonsumsi kedelai (Lima and Gomes, 2005). Hasil-hasil penelitian di berbagai bidang kesehatan telah membuktikan bahwa konsumsi produk-produk kedelai berperan penting dalam menurunkan risiko terkena berbagai penyakit degeneratif. Kedelai telah diketahui dapat digunakan sebagai antiinflamasi dan antioksidan. Kedelai dengan efek antioksidannya menghalangi *Reactive Oxygen Spesies* (ROS)

yang merusak DNA (*Deoxsiribonukleic Acid*) dan menyebabkan mutasi (Koswara, 2006).

Aspek gizi kedelai telah diteliti secara intensif selama 5-10 tahun lalu, karena kedelai merupakan makanan unik sumber isoflavon, suatu group fitokimia. Isoflavon adalah subkelas flavonoid, yakni kelompok besar antioksidan polifenol yang banyak dijumpai secara alami dalam buah-buahan, sayuran, kacang-kacangan dan minuman, seperti teh dan minuman anggur, produk fermentasi buah anggur. Jenis isoflavon utama yang ditemukan dalam kedelai adalah *genistein* dan *daidzein*. Produk seperti kedelai matur/masak, kedelai panggang dan tepung kedelai merupakan sumber isoflavon yang unggul dan menyediakan isoflavon total sekitar 5,1–5,5 mg/g protein kedelai (Afriansyah, 2000).

Mekanisme yang banyak diketahui sebagai anti kanker dari isoflavon adalah aktivitas anti estrogen, menghambat aktivitas enzim penyebab kanker, aktivitas antioksidan dan meningkatkan fungsi kekebalan sel. Studi epidemiologi juga 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, oleh karena itu dapat menghambat pertumbuhan sel-sel kanker dan angiogenesis. Hal ini berarti suatu tumor tidak dapat membuat pembuluh darah baru, sehingga tidak dapat tumbuh (Koswara, 2006).

Penelitian mengenai efek kedelai pada kanker terutama kanker kolon masih sangat terbatas. Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui bahwa kedelai dan produk olahannya memang dapat digunakan sebagai diet dalam upaya pencegahan terjadinya kanker sehingga mampu menurunkan prevalensi kejadian kanker kolon di masyarakat. Selain itu, adanya penelitian lebih lanjut tersebut juga dapat menambah nilai mutu dari kedelai sebagai nutrisi sumber protein.

Berdasarkan uraian tersebut penelitian dilakukan untuk mengetahui secara langsung efek isoflavon dalam kedelai melalui ekstrak kedelai sebagai peng-

hambat perkembangan sel kanker kolon. Penelitian ini bersifat eksperimental secara *in vivo* menggunakan tikus putih (*Rattus Norvegicus strain Wistar*) sebagai model yang diinduksi karsinogen berupa DMBA serta pemberian ekstrak kedelai. Perkembangan sel kanker diukur melalui pengamatan gambaran kematian sel (apoptosis) pada kolon tikus yang telah diinduksi zat karsinogenik (DMBA). Penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran perkembangan kanker kolon pada tikus yang diberi ekstrak kedelai sehingga mampu mengetahui efek kedelai sebagai diet pencegah kanker.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah “bagaimana pengaruh ekstrak kedelai terhadap apoptosis sel kanker kolon pada tikus putih (*Rattus Norvegicus strain Wistar*) yang diinduksi DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene)?“

## 1.3 Tujuan

### 1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mengkaji dan menganalisis pengaruh ekstrak kedelai terhadap penurunan sel kanker tikus yang diinduksi karsinogenesis kolon.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

- Mendeskripsikan jumlah apoptosis sel kolon pada setiap kelompok perlakuan.
- Menganalisis pengaruh ekstrak kedelai terhadap jumlah apoptosis sel kanker tikus yang diinduksi karsinogenesis kolon.
- Menganalisis perbedaan pengaruh ekstrak kedelai terhadap jumlah apoptosis sel kanker tikus yang diinduksi karsinogenesis kolon antar kelompok perlakuan.

## 1.4 Manfaat

### 1.4.1 Manfaat Teoritis

Secara teoritis diharapkan penelitian ini dapat mengembangkan ilmu pengetahuan khususnya bidang Epidemiologi mengenai pengaruh ekstrak kedelai terhadap perkembangan sel kanker kolon.

### 1.4.2 Manfaat Praktis

- a. Meningkatkan pengetahuan peneliti tentang pengaruh kedelai terhadap perkembangan sel kanker kolon.
- b. Dapat mengetahui manfaat kedelai dan produk olahannya bagi kesehatan terutama pencegahan penyakit kanker sehingga kedelai mempunyai nilai tambah disamping sebagai bahan pokok makanan.
- c. Sebagai bahan masukan untuk mahasiswa Fakultas Kesehatan Masyarakat khususnya Bagian Epidemiologi serta instansi pemerintah terkait peningkatan mutu kedelai sebagai bahan pangan.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kolon

#### 2.1.1 Fisiologi

Kolon adalah bagian dari usus besar pada sistem pencernaan yang disebut juga *traktus gastrointestinal*. Fungsi utama kolon adalah mengabsorpsi air dan elektrolit dari kimus untuk membentuk *feces* yang padat dan penimbunan bahan *feces* sampai dapat dikeluarkan. Setengah bagian proksimal kolon berhubungan dengan absorpsi dan setengah distal kolon berhubungan dengan penyimpanan. Gerakan kolon sangat lambat karena fungsinya mengabsorpsi air dan membentuk *feces*. Gerakan kolon seperti gerakan usus halus yang terbagi menjadi gerakan mencampur dan mendorong (Ganong, 1994).

##### a. Gerakan Mencampur “Haustrasi”

Gerakan segmentasi dengan konstriksi sirkular yang besar pada kolon,  $\pm$  2,5 cm otot sirkular akan berkontraksi, terkadang menyempitkan lumen. Pada saat yang sama, otot longitudinal kolon (*taenia coli*) akan berkontraksi. Kontraksi gabungan tersebut menyebabkan bagian usus yang tidak terangsang menonjol keluar (haustrasi). Setiap haustrasi mencapai intensitas puncak dalam waktu  $\pm$  30 detik, kemudian menghilang 60 detik berikutnya, terkadang lebih lambat terutama sekum dan kolon ascendens sehingga sedikit isi hasil dari dorongan ke depan. Oleh karena itu bahan *feces* dalam usus besar secara lambat diaduk dan (Ganong, 1994).

##### b. Gerakan Mendorong “Pergerakan Massa”

Banyak dorongan dalam sekum dan kolon ascendens dari kontraksi haustra yang lambat tetapi persisten, kimus pada saat itu sudah dalam keadaan lumpur setengah padat. Selain itu, kolon mempunyai *kripta lieberkuhn* tidak bervili yang menghasilkan *mucus* (sel epitelnya jarang mengandung enzim).

*Mucus* mengandung ion bikarbonat yang diatur oleh rangsangan taktil, langsung dari sel epitel dan oleh refleks saraf setempat terhadap sel *mucus krista lieberkuhn*. *Mucus* juga berperan dalam melindungi dinding kolon terhadap ekskoriasi. Selain itu juga menyediakan media yang lengket untuk saling melekatkan bahan *feces*. Selanjutnya *mucus* melindungi dinding usus dari aktivitas bakteri yang berlangsung dalam *feces*, ion bikarbonat yang disekresi ditukar dengan ion klorida sehingga menyediakan ion bikarbonat alkalis yang menetralkan asam dalam *feces*. Mengenai ekskresi cairan, sedikit cairan yang dikeluarkan melalui *feces* (100 ml/hari). Jumlah ini dapat meningkat sampai beberapa liter sehari pada pasien diare berat (Ganong, 1994).

#### c. Absorpsi dalam Usus Besar

Sekitar 1500 ml kimus secara normal melewati katup ileosekal, sebagian besar air dan elektrolit di dalam kimus diabsorpsi di dalam kolon dan sekitar 100 ml diekskresikan bersama *feces*. Sebagian besar absorpsi di pertengahan kolon proksimal (kolon pengabsorpsi), sedang bagian distal sebagai tempat penyimpanan *feces* sampai akhirnya dikeluarkan pada waktu yang tepat (kolon penyimpanan) (Ganong, 1994).

Normalnya *feces* terdiri dari  $\frac{3}{4}$  air dan  $\frac{1}{4}$  padatan (30% bakteri, 10-20% lemak, 10-20% anorganik, 2-3% protein, 30% serat makan yang tidak tercerna dan unsur kering dari pencernaan). Warna coklat dari *feces* disebabkan oleh sterkobilin dan urobilin yang berasal dari bilirubin yang merupakan hasil kerja bakteri. Apabila empedu tidak dapat masuk usus, warna tinja menjadi putih (tinja akolik). Asam organik yang terbentuk dari karbohidrat oleh bakteri merupakan penyebab tinja menjadi asam (pH 5.0-7.0). Bau *feces* disebabkan produk kerja bakteri (*indol*, *merkaptan*, *skatol*, *hydrogen sulfide*). Komposisi tinja relatif tidak terpengaruh oleh variasi dalam makanan karena sebagian besar fraksi massa *feces* bukan berasal dari makanan. Hal ini merupakan penyebab mengapa selama

kelaparan jangka panjang tetap dikeluarkan *feces* dalam jumlah bermakna (Ganong, 1994).

d. Absorpsi dan Sekresi Elektrolit dan Air.

Mukosa usus besar mirip seperti usus halus, mempunyai kemampuan absorpsi aktif natrium yang tinggi dan klorida juga ikut terabsorpsi. Ditambah taut epitel di usus besar lebih erat dibanding usus halus sehingga mencegah difusi kembali ion tersebut. Absorpsi ion natrium dan ion klorida menciptakan *gradien osmotik* di sepanjang mukosa usus besar yang kemudian menyebabkan absorpsi air. Dalam waktu bersamaan usus besar juga menyekresikan ion bikarbonat (seperti penjelasan diatas) untuk membantu menetralsir produk akhir asam dari kerja bakteri didalam usus besar (Ganong, 1994).

e. Kemampuan Absorpsi Maksimal Usus Besar

Usus besar dapat mengabsorpsi maksimal 5-8 liter cairan dan elektrolit tiap hari sehingga bila jumlah cairan masuk ke katup ileosekal melebihi atau melalui sekresi usus besar melebihi jumlah ini akan terjadi diare (Ganong, 1994). Banyak bakteri, khususnya basil kolon, bahkan terdapat secara normal pada kolon pengabsorpsi. Bakteri ini mampu mencerna selulosa (berguna sebagai tambahan nutrisi), vitamin (K, B<sub>12</sub>, tiamin, riboflavin, dan bermacam gas yang menyebabkan flatulensi di dalam kolon, khususnya CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>) (Guyton & Hall, 2008).

f. Defekasi

Sebagian besar waktu, *rectum* tidak berisi *feces*, hal ini karena adanya sfingter yang lemah ± 20 cm dari anus pada perbatasan antara *kolon sigmoid* dan *rectum* serta sudut tajam yang menambah resistensi pengisian *rectum*. Bila terjadi pergerakan massa ke *rectum*, kontraksi *rectum* dan relaksasi sfingter anus akan timbul keinginan defekasi. Pendorongan massa yang terus menerus akan dicegah oleh konstriksi tonik dari *sfingter ani interni* dan *sfingter ani eksternus*. Keinginan berdefekasi muncul pertama kali saat tekanan *rectum* mencapai 18 mmHg dan apabila mencapai 55 mmHg, maka *sfingter ani internus* dan *eksternus* melemas



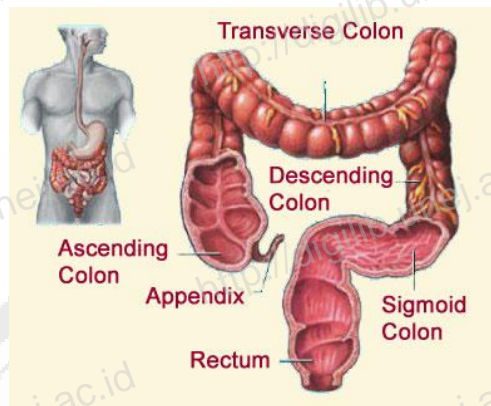
dan isi *feces* terdorong keluar. Satu dari refleks defekasi adalah refleks *intrinsic* (diperantarai sistem saraf *enteric* dalam dinding *rectum*) (Guyton & Hall, 2008).

Ketika *feces* masuk *rectum*, distensi dinding *rectum* menimbulkan sinyal aferen menyebar melalui *pleksus mienterikus* untuk menimbulkan gelombang *peristaltic* dalam *kolon descendens*, *sigmoid*, *rectum*, mendorong *feces* ke arah anus. Ketika gelombang *peristaltic* mendekati anus, *sfincter ani internus* direlaksasi oleh sinyal penghambat dari *pleksus mienterikus* dan *sfincter ani eksternus* dalam keadaan sadar berelaksasi secara volunter sehingga terjadi defekasi. Jadi sfincter melemas sewaktu *rectum* teregang (Guyton & Hall, 2008).

Sebelum tekanan yang melemaskan *sfincter ani eksternus* tercapai, defekasi volunter dapat dicapai dengan cara volunter melemaskan sfincter eksternus dan mengontraksikan otot-otot abdomen (*mengejan*). Dengan demikian defekasi merupakan suatu *reflex spinal* yang dengan sadar dapat dihambat dengan menjaga agar sfincter eksternus tetap berkontraksi atau melemaskan sfincter dan mengontraksikan otot abdomen (Guyton & Hall, 2008).

Sebenarnya stimulus dari *pleksus mienterikus* masih lemah sebagai relfeks defekasi, sehingga diperlukan refleks lain, yaitu refleks defekasi parasimpatis (*segmen sacral medulla spinalis*). Bila ujung saraf dalam *rectum* terangsang, sinyal akan dihantarkan ke medulla spinalis, kemudian secara refleks kembali ke kolon *descendens*, *sigmoid*, *rectum*, dan anus melalui serabut parasimpatis. Sinyal parasimpatis ini sangat memperkuat gelombang *peristaltic* dan merelaksasi *sfincter ani internus*. Sehingga mengubah refleks defekasi *intrinsic* menjadi proses defekasi yang kuat (Guyton & Hall, 2008). Sinyal defekasi masuk ke medula spinalis menimbulkan efek lain, seperti mengambil napas dalam, penutupan glottis, kontraksi otot dinding abdomen mendorong isi *feces* dari kolon turun ke bawah dan saat bersamaan dasar pelvis mengalami relaksasi dan menarik keluar cincin anus mengeluarkan *feces* (Guyton & Hall, 2008).

### 2.1.2 Anatomi



Gambar 2.1 Anatomi Kolon

Usus besar merupakan bidang perluasan dari *ileocecal* ke anus. Usus besar terdiri dari *cecum*, *colon*, *rectum*, dan lubang anus. Selama dalam *colon*, *chyme* diubah menjadi *feces*. Penyerapan air dan garam, penyeksresian *mucus* dan aktivitas dari mikroorganisme yang termasuk dalam pembentukan *feces*, dimana *colon* menyimpan sampai *feces* dikeluarkan melalui proses defekasi. Kira-kira 1500 ml dari *chyme* masuk ke *cecum* setiap hari, tapi lebih dari 90% dari volume direabsorpsi dan hanya tertinggal 80-150 ml dari *feces* yang dikeluarkan secara normal melalui defakasi (Tim Pengajar Anatomi, 2001).

*Cecum* merupakan tempat bertemunya usus halus dan usus besar pada *ileocecal*. *Cecum* panjangnya kira-kira 6 cm mulai dari *ileocecal* membentuk kantung tersembunyi. Berdekatan dengan *cecum* adalah saluran tersembunyi yang kecil kira-kira panjangnya 9 cm disebut *appendix* (umbai cacing). Dinding dari *appendix* terdiri beberapa nodul limpatik (Tim Pengajar Anatomi, 2001).

*Colon* kira-kira panjangnya 1,5-1,8 m dan terdiri dari 4 bagian, yaitu *colon ascending*, *colon transversal*, *colon descending* dan *colon sigmoid*. *Colon ascending* membujur dari *cecum* dan berakhir pada fleksur kolik kanan (*fleksur hepatic*) dekat pinggir bawah kanan dari hati. *Colon* transversal membentang dari

fleksur kolik kanan ke fleksur kolik kiri (*fleksur limpha*), dan *colon* descending membentangi dari fleksur kolik kiri ke pembukaan atas dari pelvis yang sebenarnya, dimana tempat tersebut menjadi *colon sigmoid*. *Colon sigmoid* membentuk saluran S yang membentangi sampai pelvis dan berakhir di *rectum* (Tim Pengajar Anatomi, 2001).

Lapisan otot sirkular dari *colon* lengkap, tapi lapisan otot longitudinal tidak lengkap. Lapisan longitudinal tidak membungkus seluruh dinding usus tapi membentuk tiga berkas otot, yaitu *taniae coli*, yang terdapat di sepanjang *colon*. Kontraksi dari *taniae coli* menyebabkan suatu kantung yang disebut haustra yang terbentuk di sepanjang *colon* terlihat seperti sebuah lekukan. Jaringan ikat yang berukuran kecil dan berisi lemak disebut *epiploik appendage* yang melekat di sepanjang permukaan kolon bagian luar. Barisan mukosal dari usus besar terdiri dari epitel lajur sederhana. Epitel ini tidak membentuk suatu lipatan-lipatan atau vili seperti pada usus halus tapi memiliki sejumlah kelenjar tubuler yang disebut *crypts*. *Crypts* mirip dengan kelenjar usus yang ada di usus halus, dengan tiga jenis sel yang termasuk sel absorpsi, sel goblet dan sel granular. Perbedaan utama adalah pada sel goblet usus besar menonjol dan dua jenis sel lain jumlahnya berkurang banyak (Tim Pengajar Anatomi, 2001).

Rektum berbentuk lurus, pipa berotot yang berawal dari pangkal *sigmoid* kolon dan berakhir pada lubang anus. Deretan membran selaput lendir adalah epitelium lajur yang sederhana, dan berlapis otot yang relatif tebal dibandingkan waktu alat pencernaan beristirahat. Bagian terakhir dari alat pencernaan yang panjangnya 2-3 cm adalah lubang anus. Lubang anus berawal dari pangkal rektum dan berakhir pada anus. Lapisan otot halus dari lubang anus lebih tebal daripada rektum dan berbentuk *internal anal sphincter* bagian ujung atas dari lubang anus. Otot rangka membentuk *external anal sphincter* pada bagian ujung bawah dari lubang anus (Tim Pengajar Anatomi, 2001).

## 2.2 Kanker kolon

### 2.2.1 Epidemiologi

Kanker kolon menduduki peringkat ketiga pada tingkat insiden dan mortalitas di dunia. Pada tahun 2002 terdapat lebih dari satu juta insiden kanker kolon dengan tingkat mortalitas lebih dari 50%. 9,5 persen pria penderita kanker terkena kanker kolon, sedangkan pada wanita angkanya mencapai 9,3 persen dari total jumlah penderita kanker (Fahlevi, 2008).

Angka insiden tertinggi terdapat pada Eropa, Amerika, Australia dan Selandia Baru, sedangkan angka insiden terendah terdapat pada India, Amerika Selatan dan Arab Israel. Di Eropa, penyakit ini menempati urutan kedua sebagai kanker yang paling sering terjadi pada pria dan wanita pada tingkat insidensi dan mortalitas. Pada tahun 2004 di Eropa terdapat 2.886.800 insiden kanker yang terdiagnosa dan sebanyak 90% terjadi kematian karena kanker. Insiden kanker yang paling sering adalah kanker paru-paru (13,3%), diikuti oleh kanker kolon (13,2%). Kanker paru juga merupakan kanker yang tersering menyebabkan kematian (341.800) diikuti oleh kanker kolon (203.700), kanker lambung (137.900) dan kanker payudara (129.900) (Boyle P, Ferlay J, dalam Fahlevi, 2008).

Kanker kolon di Amerika merupakan penyebab kematian tersering setelah kanker paru dan menduduki peringkat ketiga pada kanker yang terdapat pada pria dan wanita dengan lebih dari 130.000 kasus baru tiap tahun dan sebanyak 42% mengalami kematian per tahun. Berdasarkan data penelitian secara *follow up* selama 19 tahun pada insiden kanker kolon di Swedia tahun 1960 pada 53.377 kasus ditemukan (52% pria dan 48% wanita), didapatkan suatu hubungan yaitu: 1) terdapat perbedaan insiden pada pria dan wanita yang berusia lanjut, yang meningkat seiring dengan usia; 2) meningkatnya insiden kanker kolon seiring dengan kepadatan penduduk; 3) rendahnya insiden pada pria yang belum pernah menikah dibandingkan dengan pria lainnya (Gerhardsson M et al., dalam Fahlevi, 2008).

Perkiraan insiden kanker di Indonesia adalah 100 per 100.000 penduduk. Namun, hanya 3,2% dari kasus kanker yang baru mencari perawatan di Rumah Sakit. Program yang dilaksanakan oleh proyek pengawasan kanker terpadu yang berbasis komunitas di Sidoarjo menunjukkan kenaikan 10-20% dari kasus kanker yang menerima perawatan dari Rumah Sakit (WHO, 2003). Dewasa ini kanker kolon telah menjadi salah satu dari kanker yang banyak terjadi di Indonesia, data yang dikumpulkan dari 13 pusat kanker menunjukkan bahwa kanker kolon merupakan salah satu dari lima kanker yang paling sering terdapat pada pria maupun wanita (Soeripto, 2007).

Dari berbagai laporan, di Indonesia terdapat kenaikan jumlah kasus kanker kolon. Sejak tahun 1994-2003, terdapat 372 keganasan kolon yang datang berobat ke RS Kanker Dharmais (RSKD). Berdasarkan data rekam medik hanya didapatkan 247 penderita dengan catatan lengkap, terdiri dari 203 (54,57%) pria dan 169 (43,45%) wanita berusia antara 20-71 tahun (Depkes, 2006).

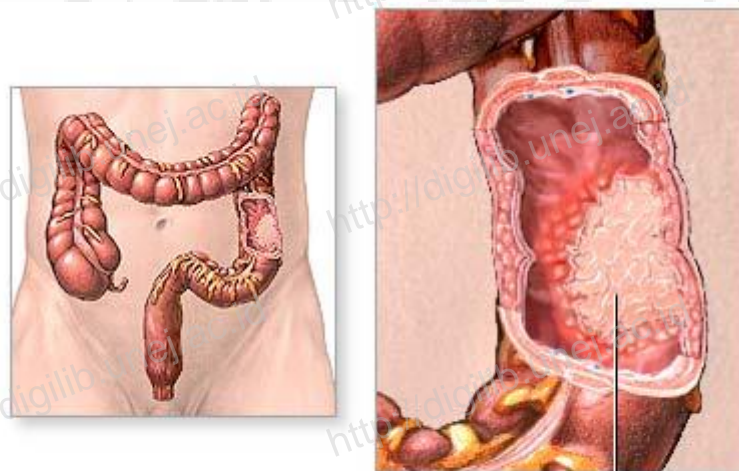
Berdasarkan register Poli Penyakit Dalam RSD Soebandi, angka kejadian kanker kolon pada tahun 2008 sampai 2009 mengalami peningkatan. Pada tahun 2008 tercatat pasien dengan kanker kolon sebanyak 29 orang. Sedangkan pada tahun 2009 terjadi peningkatan kasus sebanyak 2 kali lipat, yaitu tercatat pasien dengan kanker kolon sebanyak 62 orang. Kejadian kanker kolon ini di RSD Soebandi merupakan kejadian kanker terbanyak ketiga setelah kanker payudara dan kanker *lympoma*. Angka kejadian yang semakin meningkat menimbulkan kematian yang semakin meningkat pula karena sebagian besar pasien yang datang berobat menderita kanker kolon pada stadium lanjut dan sulit untuk disembuhkan (Inventaris RSD Soebandi Jember, 2008).

### 2.2.2 Definisi Kanker Kolon

Kanker adalah istilah generik untuk sekumpulan penyakit yang menyerang berbagai bagian tubuh, istilah lainnya disebut juga *malignant tumours* dan *neo-*

*plasms*. Kanker terjadi bila pembentukan sel yang abnormal secara cepat diluar area biasanya, dan kadang akan menjalar ke area lain disekitarnya serta menjalar juga ke organ tubuh yang lain, proses inilah yang disebut metastasis dan ini adalah penyebab utama kematian akibat kanker. Sedangkan kanker kolon (*Colon Cancer*) ditujukan pada tumor ganas yang ditemukan di kolon, rektum dan *appendix* (usus buntu).

Kolon dan rektum adalah bagian dari usus besar pada sistem pencernaan yang disebut juga *traktus gastrointestinal*. Kolon dan rektum merupakan bagian dari saluran pencernaan atau saluran gastrointestinal dimana fungsinya adalah untuk menghasilkan energi bagi tubuh dan membuang zat-zat yang tidak berguna (Alamsyah, 2007).



Gambar 2.2 Jaringan Kanker Kolon

Kanker merupakan suatu proses pembelahan sel-sel (proliferasi) yang tidak mengikuti aturan baku proliferasi yang terdapat dalam tubuh (proliferasi abnormal). Proliferasi ini dibagi atas non-neoplastik dan neoplastik, nonneoplastik dibagi atas:

- a. Hiperplasia adalah proliferasi sel yang berlebihan. Hal ini dapat normal karena bertujuan untuk perbaikan dalam kondisi fisiologis tertentu misalnya kehamilan.
- b. Hipertrofi adalah peningkatan ukuran sel yang menghasilkan pembesaran organ tanpa ada penambahan jumlah sel.
- c. Metaplasia adalah perubahan dari satu jenis tipe sel yang membelah menjadi tipe yang lain, biasanya dalam kelas yang sama tapi kurang terspesialisasi.
- d. Displasia adalah kelainan perkembangan selular, produksi dari sel abnormal yang mengiringi hiperplasia dan metaplasia. Perubahan yang termasuk dalam hal ini terdiri dari bertambahnya mitosis, produksi dari sel abnormal pada jumlah besar dan tendensi untuk tidak teratur (Alamsyah, 2007).

Umumnya tumor kolorektal adalah adenokarsinoma yang berkembang dari *polyp* adenoma. Insidensi tumor dari kolon kanan meningkat, meskipun umumnya masih terjadi di rektum dan kolon *sigmoid*. Pertumbuhan tumor secara tipikal tidak terdeteksi, menimbulkan beberapa gejala. Pada saat timbul gejala, penyakit mungkin sudah menyebar ke dalam lapisan lebih dalam dari jaringan usus dan organ-organ yang berdekatan. Kanker kolon menyebar dengan perluasan langsung ke sekeliling permukaan usus, submukosa, dan dinding luar usus. Struktur yang berdekatan, seperti hepar, *kurvatura mayor* lambung, *duodenum*, usus halus, pankreas, limpa, saluran *genitourinary*, dan dinding abdominal juga dapat dikenai oleh perluasan. Metastasis ke kelenjar getah bening regional sering berasal dari penyebaran tumor. Tanda ini tidak selalu terjadi, bisa saja kelenjar yang jauh sudah dikenai namun kelenjar regional masih normal. Sel-sel kanker dari tumor primer dapat juga menyebar melalui sistem limpatik atau sistem sirkulasi ke area sekunder seperti hepar, paru-paru, otak, tulang, dan ginjal. "Penyemaian" dari tumor ke area lain dari rongga peritoneal dapat terjadi bila tumor meluas melalui serosa atau selama pembedahan (Fahlevi, 2008).

Awalnya sebagai nodul, kanker usus sering tanpa gejala hingga tahap lanjut karena pola pertumbuhan lamban, 5 sampai 15 tahun sebelum muncul gejala. Manifestasi tergantung pada lokasi, tipe dan perluasan, dan komplikasi. Perdarahan sering sebagai manifestasi yang membawa klien datang berobat. Gejala awal yaitu terjadi perubahan kebiasaan buang air besar, *diarrhea* atau konstipasi. Karakteristik lanjut adalah nyeri, *anorexia*, dan kehilangan berat badan. Mungkin dapat teraba massa di abdomen atau rektum. Biasanya klien tampak anemis akibat dari perdarahan (William, 2005).

### 2.2.3 Etiologi Kanker Kolon

Secara umum kanker selalu dihubungkan dengan: bahan-bahan kimia, bahan-bahan radioaktif, dan virus. Umumnya kanker usus besar terjadi dihubungkan dengan faktor genetik dan lingkungan. Serta dihubungkan juga dengan faktor predisposisi diet rendah serat, kenaikan berat badan, *intake* alkohol.

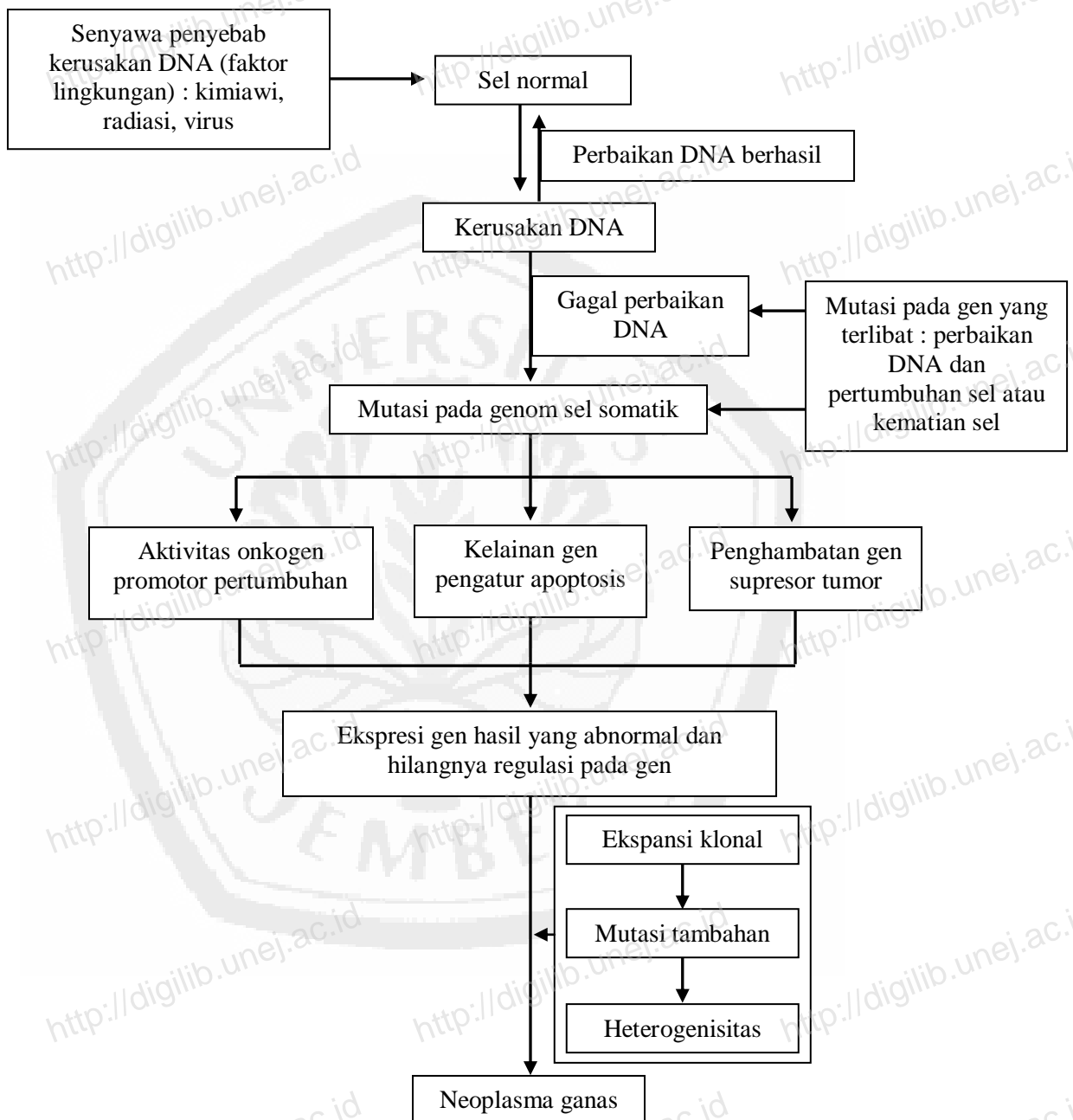
Tabel 2.1 Faktor Risiko Kanker Kolon

Sporadic colorectal cancer (88-94%)	Colorectal cancer in inflammatory bowel disease (1-2%)	Hereditary colorectal cancer (5-10 %)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Older age</li> <li>- Male sex</li> <li>- Cholecystectomy</li> <li>- Ureterocolic anastomosis</li> <li>- Hormona factor</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ulcerativa colitis</li> <li>- Crohn colitis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Polyposis syndrom</li> <li>- Familial Adenomatous Polyposis (FAP)</li> <li>- Gardnes's syndrome</li> <li>- Turcot's syndrome</li> </ul>
<u>Environmental factors</u>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diet rich in meat and fat, and poor in fibre, folate and calcium</li> <li>- Seditary lifestyle</li> <li>- Obesity</li> <li>- Smoking</li> <li>- Previous irradiation</li> <li>- High alcohol intake</li> </ul>		
<u>Personal history of sporadic tu-mor</u>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>- History of colorectal polyps</li> <li>- History of colorectal cancer</li> <li>- History of small bowel, endometrial</li> <li>- Familial colorectal cancer</li> </ul>		

Dorundi S, Banerjea A. *Colorectal cancer: early diagnosing and predisposing causes.* Surgery 2006;24;131-136.



### 2.2.4 Patofisiologi Kanker Kolon



Gambar 2.3 Proses Molekuler Terjadinya Keganasan (Rundle et al., 2000)

Kanker dinyatakan sebagai proses kerusakan fungsi sel yang paling berbahaya. Perubahan di dalam sel yang pertama adalah terjadinya mutasi. Substansi

karsinogenik mengalami modifikasi molekular di dalam sel sehingga dapat menyebabkan kanker. Substansi karsinogenik memodifikasi gen dengan jalan mengikatkan diri pada inti DNA, proses ini disebut aktivasi. Dalam berbagai kondisi, gangguan siklus DNA tersebut dapat diperbaiki dan proses tidak berlanjut. Namun jika gangguan siklus ini tidak dapat diperbaiki maka akan terbentuk sel kanker. Salah satu perubahan awal yang terdeteksi adalah hilangnya pengaturan jumlah sel secara normal, hiperplasia dan ketidakstabilan genetik. Selanjutnya terjadi peningkatan ekspresi onkogen dan penurunan ekspresi atau fungsi gen penekan tumor serta perubahan struktur sel. Disamping itu terjadi peningkatan ekspresi angiogenik yang mengakibatkan terhambatnya aktivasi gen yang menginduksi apoptosis (Rundle et al., 2000).

#### a. Proliferasi

Perubahan lain yang terjadi pada awal progresitas sel normal menjadi sel kanker adalah peningkatan proliferasi sel. Progresivitas sel neoplastik merupakan cermin dari sifat dan perangai sel yang telah berubah menjadi maligna. Sel-sel kanker yang tumbuh berlebihan terjadi akibat proses aktivitas proliferasi sel yang berlebihan. Kenaikan aktivitas proliferasi pada jaringan yang terinisiasi adalah perubahan yang sangat penting pada stadium awal dari promosi tumor yang merupakan tanda khas lesi prekanker (Asri, 2004).

Tumor ganas sering memperlihatkan aktivitas mitosis yang berlebihan dibandingkan dengan sel normal. Pada sediaan histologi, mitosis ditemukan cukup banyak, dengan bentuk yang sering abnormal, yaitu tripolar dan lainnya dengan susunan yang kasar tak teratur. Aktivitas proliferasi seluler dapat diperkirakan dengan menghitung jumlah mitosis yang tidak normal, ukuran DNA dan beberapa penentuan protein yang berhubungan dengan siklus sel (Underwood, 1999).

#### b. Apoptosis

Apoptosis adalah suatu proses kematian sel yang terprogram atau disebut juga PCD (*Programmed Cell Death*), diatur secara genetik, bersifat aktif, ditandai

dengan adanya kondensasi *chromatin*, fragmentasi sel dan pagositosis sel tersebut oleh sel tetangganya. Kresno dalam tulisannya, apoptosis adalah kematian sel terprogram yang merupakan proses penting dalam pengaturan homeostasis normal, proses ini menghasilkan keseimbangan dalam jumlah sel jaringan tertentu melalui eliminasi sel yang rusak dan proliferasi fisiologis dan dengan demikian memelihara agar fungsi jaringan normal (Kresno, 2001).

Deregulasi apoptosis mengakibatkan keadaan patologis, termasuk proliferasi sel secara tidak terkontrol seperti dijumpai pada kanker Apoptosis dikendalikan oleh dua perangkat gen dengan fungsi yang antagonistik yaitu memacu dan menghambat. Gen tersebut adalah p53 (gen tumor supresor/memicu apoptosis) dan gen Bcl-2 (*B Cell Lymphoma*), salah satu gen yang menghambat apoptosis (Asri, 2004). Gangguan regulasi dan proliferasi sel baik akibat aktivitas onkogen dominan maupun inaktivasi tumor suppressor genes ada hubungannya dengan kontrol apoptosis. Beberapa jenis virus onkologik melaksanakan proses transformasi sel dengan cara mengganggu fungsi apoptosis dalam sel, misalnya SV40, herpes dan adenovirus, polioma maupun *Virus Epstein Barr* (EBV).

Dalam literatur lain menyebutkan apoptosis merupakan suatu bentuk kematian sel yang didesain untuk menghilangkan sel-sel host yang tidak diinginkan melalui aktivasi serangkaian peristiwa yang terprogram secara internal melalui serangkaian produk gen. Adapun terjadinya penyebab diatas sebagai berikut:

- a. Selama proses perkembangan.
- b. Sebagai suatu mekanisme homeostatik untuk memelihara sel di jaringan.
- c. Sebagai suatu mekanisme pertahanan seperti reaksi imun.
- d. Apabila sel-sel dihancurkan oleh penyakit atau agent-agent yang berbahaya.
- e. Proses Penuaan.

Proses apoptosis dibagi menjadi *initiation phase* selama *caspase* menjadi aktif mengkatalisis dan *excution phase* yaitu selama enzim bereaksi menjadikan

sel apoptosis. Mekanisme apoptosis dibagi menjadi dua yaitu mekanisme ekstrinsik dan mekanisme intrinsik (Kumar dan Fausto, 2005).

Mekanisme ekstrinsik diawali oleh sel *surface death receptor* dari berbagai macam sel. *Death receptor* adalah anggota dari *tumor necrosis factor receptor family* (TNF) mempunyai *cytoplasmic domain* yang berisi protein interaksi disebut *death domain*, penting untuk mengirim *apoptotic signals*. Beberapa TNF receptor family tidak mempunyai *cytoplasmic death domain*, mekanisme apoptosisnya sedikit diketahui. *Death receptor* antara lain adalah *Type I TNF receptor* (TNFR I) dan protein yang berhubungan disebut Fas (CD95). Mekanisme apoptosis diinduksi oleh *death receptor* diilustrasikan dengan baik oleh Fas (Kumar dan Fausto, 2005).

Diawali *Fas ligand* (FasL) melepaskan *Fas* dari ligandnya. Molekul *Fas* menuju ke sitoplasma yang terdapat *death domain*, tempat untuk berikatan dengan adapter protein yang juga mempunyai *death domain* dan disebut FADD (*fas associated death domain*). FADD yang dilekatkan pada *death receptors* kembali berikatan dengan inaktif dari *caspase-8* (di manusia, *caspase 10*) melalui *death domain*. Multiple *pro caspase-8* molekul kemudian dibawa ke dekatnya dan mereka saling berikatan untuk mengaktifkan *caspase-8*, yang kemudian enzim tersebut akan mengaktifkan *cascade-caspase* dengan mengikat dan mengaktifkan *pro-caspase* yang lain serta mengaktifkan enzim yang melaksanakan *execution phase* dari apoptosis. Mekanisme apoptosis dapat dihambat oleh protein yang disebut FLIP, yang berikatan dengan *procaspase-8* tetapi tidak dapat berikatan dan mengaktifkan enzim karena kurang mempunyai aktifitas enzim. Beberapa virus dan sel normal memproduksi FLIP dan digunakan untuk menghambat dan memproteksi infeksi dan memproteksi sel normal dari *Fas mediated apoptosis* (Kumar dan Fausto, 2005).

Mekanisme intrinsik diawali dari mitokondria yang disebabkan stimulus internal seperti kerusakan DNA dan stress oksidatif. Jalur intrinsik disebabkan

oleh peningkatan permeabilitas mitokondria dan pelepasan molekul *pro apoptotic* ke sitoplasma. *Growth factor* dan *survival signal* menstimulasi produksi *anti-apoptotic members* dari *Bcl-2 family*. *Bcl-2 family* mempunyai lebih dari 20 macam protein, yang semuanya berfungsi regulasi apoptosis. Dua protein yang berfungsi anti apoptosis adalah Bcl-2 dan Bcl-X. Protein anti apoptosis dalam keadaan normal berada disekitar membran mitokondria dan sitoplasma. Ketika sel kehilangan kemampuan mempertahankan diri atau mengalami stress, Bcl-2 dan/atau Bcl-x akan menghilang dari membrane mitokondria dan digantikan kelompok protein pro apoptotis seperti Bax, Bak dan Bim. Ketika Bcl-2/Bcl-x menurun, terjadi peningkatan permeabilitas membran mitokondria menyebabkan keluarnya beberapa protein yang akan mengaktifkan *caspase cascade* (Kumar dan Fausto, 2005).

Salah satu dari protein tersebut adalah *cytochrome c*. Didalam *cytosol cytochrome c* berikatan dengan Apaf-1 (*apoptosis activating factor-1*) dan mengaktifkan *caspase-9*. ( Bcl-2 dan Bcl-x secara langsung menghambat aktivasi Apaf-1 dan kemudian menghilang dari sel yang menyebabkan dapat terjadi aktivasi Apaf-1). Protein mitokondria yang lain seperti *apoptosis initiating factor* (AIF) memasuki sitoplasma yang akan berikatan untuk menetralkan berbagai macam inhibitor apoptosis. Hal tersebut akan mengaktifkan *caspase cascade* (Kumar dan Fausto, 2005).

Pada banyak jenis kanker diketahui bahwa terjadi mutasi homozigot dari gen p53 sehingga apoptosis tidak dapat terjadi dan mutasi tidak dapat dicegah. Demikian juga dengan gen Bcl-2, mengalami ekspresi berlebihan, sehingga yang seharusnya terbunuh melalui apoptosis tetap hidup dan dapat menimbulkan kanker. Payne C. et al. 1995 meneliti apoptosis pada biopsi kolon manusia dengan riwayat kanker kolon, adenoma, kolitis dan tanpa neoplasia dan menemukan bahwa rata-rata indeks apoptosis pada orang normal dan kanker kolon berbeda secara signifikan.

Tujuan terapi kanker adalah membunuh sel kanker dan melindungi sel normal dari akibat terapi. Salah satu upaya mengatasi masalah kanker adalah mengembalikan fungsi gen yang terganggu, yaitu mengembalikan fungsi apoptosis atau menginduksi apoptosis. Hingga saat ini kemoterapi maupun radiasi ditujukan untuk membunuh sel kanker melalui apoptosis, tetapi seperti telah diuraikan di atas fungsi apoptosis pada kanker seringkali terganggu, sehingga tidak jarang menyebabkan resistensi terhadap terapi. Karena itu pengetahuan rinci tentang jalur apoptosis dapat membantu kita untuk memberikan terapi yang lebih spesifik (Ceruti dan Abbraccio, 2003).

Terdapat berbagai metode untuk menghitung apoptosis, yang bervariasi dari segi biologik dan utilitasnya. Hu Y et al (2002) membandingkan jumlah sel apoptotik dengan metode TUNEL (*Terminal Deoxycytidyl Transferase-mediated dUTP Nick and Labeling*) lebih tinggi daripada HE (*Hematoxylin-eosin*), hal ini disebabkan TUNEL sangat sensitif sehingga dapat mendeteksi pecahnya ikatan DNA walau belum terjadi perubahan inti yang nyata. Tetapi metode ini tentunya lebih mahal dan kompleks.

Prinsip metoda ini adalah perpaduan antara reaksi molekular dengan imunohistokimia, dimana reaksi olekular ditandai adanya ligasi antar fragmentasi DNA dengan *degoxigenin* dengan bantuan enzim TdT (*terminal deoxynucleotide transferase*) dan reaksi imunohisto-kimia yang ditandai adanya reaksi imunologi yaitu reaksi antara antigen dan antibodi serta reaksi kimiawi yaitu adanya reaksi enzim dengan substrat. Pemeriksaan Tunel menggunakan *TdT-FragEL detection kit*, pada pemeriksaan ini, ikatan TdT untuk menampakkan akhir 3-OH dari fragmentasi DNA, penambahan katalisa dari *biotin-labeled* dan *unlabeled deoxy-nucleotides* pada bagian ini. *Biotinylated nucleotides* akan dideteksi menggunakan ikatan *streptavidinhorseradix peroxidase*. Reaksi *diamino-benzidine* dengan sampel yang dilabel akan menyebabkan warna pada DNA fragmentation (Sudiana, 2004).

### 2.2.5 Pencegahan

#### a. *Screening*

*National Cancer Institute (NCI), American College of Surgeons, American College of Physicians, dan American Cancer Society* merekomendasikan pada pasien *asymptomatic* yang berumur 50 tahun atau lebih untuk dilakukan pemeriksaan sigmoidoskopi setiap 3 sampai 5 tahun. *Screening* dengan menggunakan kolonoskopi juga direkomendasikan untuk seseorang dengan risiko sedang setiap 10 tahun. *Screening* kolonoskopi pada seseorang yang mempunyai risiko tinggi dengan riwayat keluarga yang menderita kanker kolon tetapi tidak ada bukti yang jelas dari FAP (*Familial Adenomatous Polyposis*) atau HNPCC (*Hereditary non Polyposis Colorectal Cancer*) harus mulai *screening* pada saat umur 40 tahun (Alamsyah, 2007).

#### b. Endoskopi

Sigmoidoskopi atau kolonoskopi dapat mengidentifikasi dan mengangkat polip dan menurunkan insiden dari kanker kolon pada pasien yang menjalani kolonoskopi polipektomi. Bagaimanapun juga belum ada penelitian prospektif *randomized clinical trial* yang menunjukkan bahwa sigmoidoskopi efektif untuk mencegah kematian akibat kanker kolon, meskipun penelitian trial untuk tes ini sedang dalam proses. Adanya polip pada *rektosigmoid* dihubungkan dengan polip yang berada diluar jangkauan sigmoidoskopi, sehingga pemeriksaan kolonoskopi harus dilakukan (Alamsyah, 2007).

#### c. Diet

Peningkatan dari diet serat menurunkan insiden dari kanker pada pasien yang mempunyai diet tinggi lemak. Diet rendah lemak telah dijabarkan mempunyai efek proteksi yang lebih baik daripada diet tanpa lemak. *The National Research Council* telah merekomendasikan pola diet pada tahun 1982. Rekomendasi ini diantaranya : (a) menurunkan lemak total dari 40 ke 30% dari total kalori, (b) meningkatkan konsumsi makanan yang mengandung serat, (c) mem-

batasi makanan yang diasinkan, diawetkan dan diasapkan, (d) membatasi makanan yang mengandung bahan pengawet, (e) mengurangi konsumsi alkohol (Alamsyah, 2007).

d. *Non Steroid Anti Inflammation Drug* (NSAID)

Penelitian pada pasien familial poliposis dengan menggunakan NSAID *sulindac* dosis 150 mg secara signifikan menurunkan rata-rata jumlah dan diameter dari polip bila dibandingkan dengan pasien yang diberi plasebo. Ukuran dan jumlah dari polip bagaimanapun juga tetap meningkat tiga bulan setelah perlakuan dihentikan. Data lebih jauh menunjukkan bahwa aspirin mengurangi formasi, ukuran dan jumlah dari polip; dan menurunkan insiden dari kanker kolon, baik pada kanker kolon familial maupun non familial. Efek protektif ini terlihat membutuhkan pemakaian aspirin yang berkelanjutan setidaknya 325 mg perhari selama 1 tahun (Alamsyah, 2007).

e. *Hormon Replacement Therapy* (HRT)

Penelitian oleh *the Nurses Health Study* yang melibatkan partisipan sebanyak 59.002 orang wanita *postmenopause* menunjukkan hubungan antara pemakaian HRT dengan kanker kolon dan adenoma. Pemakaian HRT menunjukkan penurunan risiko untuk menderita kanker kolon sebesar 40%, dan efek protektif dari HRT menghilang antara 5 tahun setelah pemakaian HRT dihentikan (Alamsyah, 2007).

### 2.3 Karsinogen

Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) memperkirakan bahwa 80-90% penyakit kanker disebabkan oleh faktor lingkungan, 10-20% karena faktor genetik dan mungkin virus. Beberapa faktor lingkungan adalah asap rokok 40%, konsumsi makanan 25-30%, dan udara di sekitar tempat tinggal 10%. Sedangkan berdasarkan data yang disiarkan beberapa media massa, dapat disimpulkan bahwa “apapun” dapat menyebabkan kanker. Di antaranya adalah bahan kimia, tetapi ha-



nya  $\pm 30$  senyawa yang diidentifikasi sebagai karsinogen (zat penyebab kanker). Sekitar 300 senyawa lainnya menyebabkan kanker pada binatang secara laboratorium (Tati, 2003).

Zat-zat yang terkandung dalam makanan (faktor diet) dapat menjadi promotor untuk menimbulkan keganasan yang secara tidak langsung menimbulkan tumor atau kanker. Zat-zat tersebut digolongkan sebagai karsinogen. Selain karsinogen ada juga prokarsinogen yang bersifat mengubah zat kimiawi sehingga merupakan pencetus (*prekursor*) kanker (Tati, 2003).

Karsinogen dalam makanan dapat ditemukan pada hasil pengolahan makanan yang menimbulkan karsinogen *polisiklik hidrokarbon* yaitu akibat proses pengasapan makanan, zat kimia nitrosamin, zat fisik karena radiasi nuklir, atau zat biologi yang ada di alam seperti racun pada tembakau. Zat karsinogen tersebut akan merusak keutuhan sel dan intinya sehingga bersifat mutagenik yaitu sel-sel normal setelah dicemari zat tersebut menjadi sel ganas dan berkembang biak tak terkendali (Tati, 2003).

Selain itu zat karsinogen ditemukan juga pada makanan-makanan dengan pengolahan yang tidak tepat, misalnya: pemanasan terlampaui tinggi suhunya dan lama (menimbulkan zat *trans fatty acid*), cara penggorengan yang berlebihan dan penggunaan minyak goreng yang berulang kali (menimbulkan radikal bebas seperti: peroksida, epioksida, dsb.), pengawetan dengan pengasapan yang berlebihan (Tati, 2003).

Tidak semua karsinogen berupa bahan kimia sintetis. *Safrole* dalam *sassafras* dan *aflatoksin* diproduksi oleh jamur pada makanan, merupakan senyawa alam. Beberapa peneliti memperkirakan 99,99% karsinogen yang kita cerna adalah alamiah. Tumbuh-tumbuhan memproduksi senyawa tertentu untuk melindungi mereka terhadap jamur, serangga, dan binatang termasuk manusia. Beberapa senyawa yang diproduksi ini adalah karsinogen yang ditemukan pada jamur, basil, seledri, kurma, bumbu, lada, adas, parsnips, dan minyak citrus. Karsinogen juga

dihasilkan selama pemasakan dan sebagai produk dari metabolisme normal (Ismunandar, 2003).

Senyawa kimia karsinogen bervariasi, yang akan diuraikan di sini hanya beberapa karsinogen utama. Beberapa karsinogen yang sangat berbahaya adalah hidrokarbon aromatik, yang paling dikenal adalah *3,4-benzpirena*. Hidrokarbon karsinogenik terbentuk selama pembakaran tidak sempurna dari hampir setiap senyawa organik. Mereka ditemukan dalam batubara, asap rokok, pembakaran kendaraan bermotor, kopi, gula gosong dan sebagainya. Tidak semua hidrokarbon aromatik polisiklik merupakan karsinogen. Terdapat korelasi yang erat kekar-sinogenan dengan ukuran dan bentuk tertentu dari molekul (Ismunandar, 2003).

Jenis karsinogen yang lain adalah amina aromatik. Dua di antaranya adalah *b-naftilamina* dan *benzidina*. Kedua senyawa ini pernah digunakan di industri zat warna. Senyawa ini bertanggung jawab untuk kanker kandung kemih pada pekerja yang kontak lama dengan senyawa tersebut. Beberapa pewarna aminoazo juga menunjukkan karsinogen, misalnya *4-dimetilaminobenzena*. Senyawa ini dikenal sebagai “pewarna kuning mentega”. Senyawa ini digunakan untuk pewarna mentega sebelum diketahui sifat karsinogennya (Ismunandar, 2003).

### 2.3.1 DMBA (*7,12-Dimethylbenz(a)anthracene*)

DMBA (*7,12-Dimethylbenz(a)anthracene*) merupakan senyawa yang telah sering digunakan pada penelitian kanker yang berfungsi sebagai radikal bebas. Kanker payudara dapat dibentuk pada hewan coba tikus melalui pemberian DMBA per oral, yang kemudian mengaktifkan reseptor DMBA yang ada di sitosol yaitu *aryl hydrocarbon receptor* (AhR) (Trombino et al., 2000). *7,12-Dimethylbenz (a) anthracene* adalah suatu zat karsinogenik yang biasa digunakan di laboratorium untuk penelitian kanker. DMBA bekerja sebagai zat pencetus tumor melalui terjadinya mutasi. DMBA sebagai analog PAH (*polycyclic aro-*

*matic hydrocarbon*) dimana PAH menginduksi oksidan (radikal bebas) melalui mutasi DNA yang kemudian menyebabkan kanker (Rundle et al., 2000).

Senyawa *7,12-dimetilbenz (α) antrasen* (DMBA) adalah zat kimia yang termasuk dalam PAH yang dikenal bersifat mutagenik, teratogenik, karsinogenik, sitotoksik, dan immunosupresif. Menurut *Division of Occupational Health and Safety National Institutes of Health*, DMBA yang mempunyai 4 cincin benzene termasuk dalam tujuh PAH yang dapat menyebabkan kanker pada manusia (Lukitaningsih dan Noegrohati, 2000; Al-Attar, 2004; Anon, 2004 dalam Ranita, 2010). Secara alami DMBA dapat ditemukan di alam sebagai hasil dari proses pembakaran yang tidak sempurna, seperti dalam asap tembakau, asap pembakaran kayu, asap pembakaran gas, bensin, minyak, batubara atau daging. Senyawa *7,12-dimetilbenz (α) antrasen* dapat ditemukan di dalam air, tanah maupun udara (Ranita et.al, 2010).

Kontaminasi DMBA biasa terjadi melalui makanan atau per oral, inhalasi maupun kontak kulit (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, 1995). *7,12-dimetilbenz (α) antrasen* juga dilaporkan sebagai karsinogen poten pada hewan coba, dengan target utama pada kulit dan *glandula mammae* (Haschek dan Rousseaux, 1991; Mun'im et al., 2006; Russo dan Russo, 1996). Dosis tinggi DMBA yang diberikan secara kronik pada hewan coba dapat menyebabkan nekrosis pada adrenal (Haschek dan Rousseaux, 1991).

Pada tikus, DMBA muncul secara selektif dan tidak ditemukan pada sel parenkim kolon. Metabolit aktif dari DMBA akan berikatan dengan DNA epitel *colon* (DNA *adduct*), selanjutnya ikatan dengan DNA akan turun hingga 50% 16 jam pasca paparan dengan DMBA. Namun demikian, apabila paparan DMBA dilakukan terus menerus selama 42 hari, maka akan terjadi ikatan yang menetap antara metabolit aktif DMBA dan DNA yang akan memicu munculnya kanker (Van Nostrand Reinhold Co, 1981 dalam Budi dan Widyarini, 2010). Penelitian mengenai efek pemberian DMBA secara oral terhadap saluran pencernaan Syrian

hamster, telah diteliti oleh Chu pada tahun 1965 menyebabkan terjadinya perubahan berupa keratinisasi sel epitel skuamus pada lambung, dan adenokarsinoma pada usus halus. Keratinisasi dan metaplasia glandula saliva juga ditemukan pada tikus yang diberi DMBA secara oral dengan dosis berulang (Ziu et al., 1994 dalam Budi dan Widyarini, 2010).

### 2.3.2 Karsinogenesis Kolon

Karsinogenesis merupakan suatu proses yang memberikan hasil suatu transformasi sel normal menjadi sel neoplastik yang disebabkan oleh perubahan genetik yang menetap atau mutasi (Underwood, 1999). Perkembangan sel normal menjadi kanker merupakan proses yang kompleks dan bertahap. Tahap perkembangan sel kanker tersebut antara lain inisiasi, promosi dan progresi (Putra, 1997).

Perubahan genetik terjadi pada tahap inisiasi, tetapi untuk mengubah sel normal menjadi sel kanker diperlukan mutasi pada lebih dari satu gen. sel tersebut mengalami perubahan/mutasi pada gennya tetapi secara fenotip masih normal. Tahap promosi adalah proses dimana sel yang terinisiasi terpapar terhadap promoter tumor yang menyebabkan sel mengalami ekspansi klonal secara fenotipik. Sel yang terinisiasi akan dirangsang untuk berproliferasi. Promoter tumor dapat menghambat apoptosis, sehingga sel yang terinisiasi tersebut terakumulasi sebagai sel yang disfungsional dan tidak berdiferensiasi (Putra, 1997).

Progresi adalah proses yang paling kompleks dari ketiga tahap ini, karena membutuhkan perubahan genetik dan fenotip dan ekspansi seluler berlangsung dengan cepat. Sensitivitas terhadap komponen dalam diet, inhibitor pertumbuhan, pemicu diferensiasi secara bertahap akan menghilang sehingga tumor menjadi otonom secara progresif dan dapat dikendalikan hanya oleh intervensi yang lebih drastis (Putra, 1997).

Bruce W.R et al (2000) menyatakan bahwa terdapat dua mekanisme yang diduga terjadi dalam karsinogenesis kolon yang berhubungan dengan inflamasi.

Pertama, defek pada barier epitelial (yang bisa disebabkan oleh bahan kimiawi seperti karsinogen) menimbulkan iritasi lokal ; iritasi akan menyebabkan respon inflamasi dimana terjadi aktivasi enzim COX-2 dan terbentuknya prostaglandin dari asam arakhidonat. Ini akan memicu sel radang, dimana sel radang akan melepaskan radikal bebas, yang bersifat mutagenik dan mitogenik dan mempromosi karsinogenesis kolon. Mekanisme kedua, defek barier epitelial akan menimbulkan ketidakseimbangan elektrolit berupa *efflux* kalium dan *influx* natrium dan kalsium. Gangguan elektrolit ini menyebabkan terjadinya oksidatif dan pembentukan radikal bebas. Radikal bebas sebaliknya juga akan menginduksi COX-2 dan prostaglandin yang akan mempromosi karsinogenesis.

Kanker usus besar berkembang melalui rangkaian perubahan yang dikenal dengan *Adenoma-Carcinoma Sequence*. Perubahan mukosa adalah sebagai akibat perubahan genetik progresif yang terjadi pada waktu-waktu tertentu selama karsinogenesis. Karsinogenesis kolon merupakan proses yang memerlukan interaksi antara genetik dan faktor lingkungan. Faktor lingkungan yang berperan ternyata terdiri dari banyak faktor yang saling berinteraksi melalui berbagai mekanisme. Faktor lingkungan berasal dari endogen maupun eksogen, misalnya diet (lemak, protein, serat), bakteri usus, rokok, alkohol, yang semuanya mempunyai peran yang berbeda-beda (Putra, 1997).

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

### 2.4.1 Morfologi dan Habitat Kedelai



Gambar 2.4 Biji Kedelai

Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill), diduga berasal dari kedelai liar Cina, Manchuria, dan Korea. Rhumpius melaporkan bahwa pada tahun 1750 kedelai sudah mulai dikenal sebagai bahan makanan dan pupuk hijau di Indonesia. Kedelai merupakan salah satu tanaman sumber protein yang penting di Indonesia. Berdasarkan luas panen, di Indonesia kedelai menempati urutan ketiga sebagai tanaman palawija setelah jagung dan ubi kayu. Rata-rata luas pertanaman per-tahun sekitar 703.878 ha, dengan total produksi 518.204 ton (Suprpto, 2001).

Kedudukan tanaman kedelai dalam sistematik tumbuhan (taksonomi) menurut Sudarsono et. al. 2003 adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dycotiledonae
Ordo	: Rosales
Famili	: Leguminosae
Genus	: <i>Glycine</i>
Spesies	: <i>Glycine max</i> (L.) Merrill dengan <i>Glycine soya</i> (L.) Sieb

Menurut Budisantoso, 1994 (dalam Suprpto, 2001), terdapat empat jenis kedelai, yaitu sebagai berikut:

- Kedelai kuning: kedelai yang kulit bijinya berwarna kuning, putih atau hijau, yang bila dipotong melintang memperlihatkan warna kuning pada irisan keping bijinya, yang biasanya dijadikan susu.
- Kedelai hitam: kedelai yang kulit bijinya berwarna hitam.
- Kedelai hijau: kedelai yang kulit bijinya berwarna hijau, yang bila dipotong melintang memperlihatkan warna hijau pada irisan keping bijinya.
- Kedelai coklat: kedelai yang kulit bijinya berwarna coklat.



karena kedelai merupakan makanan unik sumber isoflavon, suatu group fitokimia. Isoflavon adalah subkelas flavonoid, yakni kelompok besar antioksidan polifenol yang banyak dijumpai secara alami dalam buah-buahan, sayuran, kacang-kacangan dan minuman, seperti teh dan minuman anggur, produk fermentasi buah anggur. Jenis isoflavon utama yang ditemukan dalam kedelai adalah *genistein* dan *daidzein*.

Jumlah isoflavon dalam kedelai bervariasi, tergantung pada jenis kedelai, daerah geografis budidaya dan pengolahan kedelai. Produk seperti kedelai matur/masak, kedelai panggang dan tepung kedelai merupakan sumber isoflavon yang unggul dan menyediakan isoflavon total sekitar 5,1–5,5 mg/g protein kedelai. Kandungan isoflavon beberapa produk kedelai setiap 100 gr dapat dilihat pada Tabel 2. 3.

Tabel 2.3 Kandungan Isoflavon Beberapa Produk Kedelai Setiap 100 gr

Produk Kedelai	Kandungan Isoflavon ( <i>genistein dan daidzein</i> )mg
Kedelai hijau, tak dimasak	54,8
Kedelai matur, tak dimasak	188,8
Kedelai panggang	194,2
Susu kedelai	8,8
Tahu, tak dimasak	33,6
Tempe, tak dimasak	53,1
Tepung kedelai	208,6

Anderson et. al. (1999), dalam Afriansyah 2000.

#### 2.4.3 Kedelai sebagai Zat Anti Kanker

Kedelai adalah salah satu tanaman golongan kacang-kacangan dan merupakan komoditi pertanian yang unggul di Indonesia. Di bidang kesehatan, manfaat kedelai sudah banyak diungkap tetapi perlu pengkajian yang lebih mendalam. Pada kedelai banyak terdapat antioksidan dalam bentuk isofalvon. Seperti halnya vitamin C, E dan karotenoid, isoflavon adalah antioksidan yang sangat dibutuhkan tubuh manusia yang berfungsi untuk menghentikan reaksi pembentukan radikal bebas. Terdapat tiga jenis isoflavon didalam kedelai yaitu *daidzein*,



*glisitein*, dan *genistein*. Beberapa penelitian membuktikan bahwa *genistein* dan *phytoestrogen* yang terdapat pada kedelai dapat mencegah kanker prostat, payudara dan penuaan (*aging*) (Lamartiniere, 1992).

Hasil-hasil penelitian di berbagai bidang kesehatan telah membuktikan bahwa konsumsi produk-produk kedelai berperan penting dalam menurunkan risiko terkena berbagai penyakit degeneratif. Isoflavon kedelai dapat menurunkan risiko penyakit jantung dengan membantu menurunkan kadar kolesterol darah. Protein kedelai telah terbukti mempunyai efek menurunkan kolesterol, yang dipercaya karena adanya isoflavon di dalam protein tersebut. Studi epidemiologi juga 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, oleh karena itu dapat menghambat perkembangan sel-sel kanker dan angiogenesis (Koswara, 2006).

Terdapat beberapa komponen dalam kedelai yang dipercaya mempunyai sifat anti kanker. Senyawa tersebut antara lain : *inhibitor protease*, *phitat*, *sapoinin*, *phitosterol*, asam lemak omega-3 dan isoflavon. Diantara anti kanker tersebut, perhatian terbesar ditujukan terhadap isoflavon. Isoflavon saat ini banyak diteliti karena potensinya dalam mencegah dan mengatasi terhadap banyak gangguan kesehatan lainnya. 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).

Percobaan pada hewan menunjukkan bahwa hewan yang diberi kedelai mengalami lebih sedikit kanker payudara dibandingkan dengan yang tidak diberi. Studi-studi epidemiologi dan laboratorium telah menunjukkan bahwa konsumsi kedelai dapat mengurangi risiko perkembangan beberapa jenis kanker, antara lain kanker payudara, prostat dan kanker kolon. Pada risiko kardiovaskuler, isoflavon

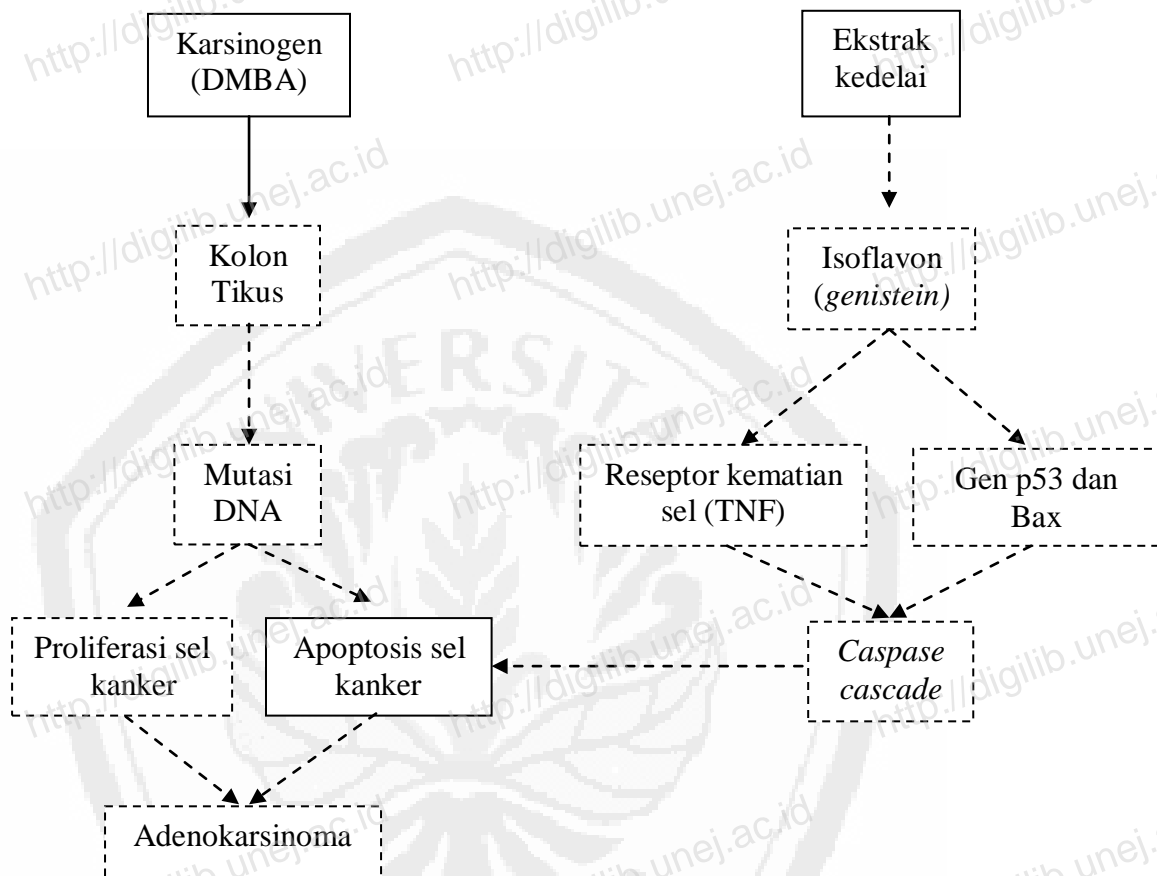
kedelai yaitu *genistein* diketahui dapat menghambat tirosin kinase pada kultur sel endotel, menurunkan apoB pada laki-laki yang mengkonsumsi kedelai. Studi metanalisis percobaan klinik menunjukkan bahwa pemberian kedelai pada 38 orang dapat menurunkan kolesterol total (9%), kolesterol LDL (13%), trigliserida (11%) dengan konsumsi protein kedelai rata-rata 47 g/hari (Koswara, 2006).

Efek antioksidan kedelai dilaporkan melalui kemampuannya untuk dapat menghambat produksi *superoxide* dari *enzym xanthine oxidase* dan menghambat lipid peroksidasi. Penelitian pada hewan percobaan, kedelai dapat meningkatkan aktifitas *enzim superoxide dismutase, glutathion peroxidase* dan *reductase* serta *catalase* (Liu et al., 2005).

*Genistein* isoflavon adalah fitoestrogen yang ditemukan dalam konsentrasi tinggi pada kedelai dan produknya, bekerja pada enzim tirosin protein kinase, pengaruh apoptosis, proliferasi sel-sel, angiogenesis dan kemudiannya dapat mempengaruhi jaringan adiposa melalui mekanisme ini. Penelitian eksperimental telah menunjukkan penghambatan pertumbuhan sel dari berbagai sel-sel kanker budidaya termasuk leukemia, payudara, kanker prostat, dan limfoma oleh *genistein*. *Genistein* juga dapat menghambat respon terhadap stres yang dapat mencegah terjadinya apoptosis sehingga apoptosis tetap terjadi. Secara ekstrintik, *genistein* pada isoflavon kedelai berkaitan dengan reseptor TNF. *Genistein* dalam kedelai juga dapat menginduksi apoptosis sel kanker melalui jalur intrinsik pada gen p53 dan protein Bax (Yiwey et. al., 1999).

Kedelai telah menjadi makanan sehari-hari penduduk Asia. Pada sebagian besar negara Asia, konsumsi isoflavon diperkirakan antara 25 – 45 mg/hari. Jepang merupakan negara yang mengkonsumsi isoflavon terbesar, diperkirakan konsumsi harian orang Jepang adalah 200 mg/hari. Di negara-negara Barat konsumsinya kurang dari 5 mg isoflavon per hari (Koswara, 2006).

## 2.5 Kerangka Konseptual



Modifikasi dari : Rundle et. al. (2000) dan Liu et. al. (2005)

Keterangan :

= diteliti  
 = tidak diteliti

Gambar 2.5 Kerangka Konseptual Penelitian

DMBA (*7,12-dimetilbenz (α) antrasen*) merupakan senyawa karsinogen yang dapat menyebabkan kanker. DMBA masuk melalui saluran pencernaan kemudian dimetabolisme oleh tubuh. Apabila zat tersebut tidak mampu dimetabolisme oleh tubuh, maka akan berikatan dengan DNA sel sehingga menyebabkan

mutasi pada sel. Jika terdapat pada kolon maka akan berikatan dengan DNA sel kolon. Mutasi genetik yang terjadi mengakibatkan sel menjadi abnormal dan mengalami peningkatan proliferasi berlebihan dan penurunan apoptosis. Keganasan yang terjadi pada sel kolon tersebut disebut adenokarsinoma kolon.

Kedelai mengandung isoflavon yang dapat menghambat pertumbuhan sel kanker kolon. *Genistein* pada isoflavon kedelai berkaitan dengan reseptor kematian (TNF) yang dapat menginduksi caspase penyebab apoptosis. Selain itu, genistein juga berkaitan dengan p53 dan Bax yang berperan sebagai induktor apoptosis. Pada penelitian ini, variabel yang diteliti yaitu DMBA sebagai zat karsinogen, kedelai melalui ekstrak kedelai sebagai diet pencegah kanker, dan apoptosis sel kanker sebagai indikator perkembangan kanker.

## 2.6 Hipotesis

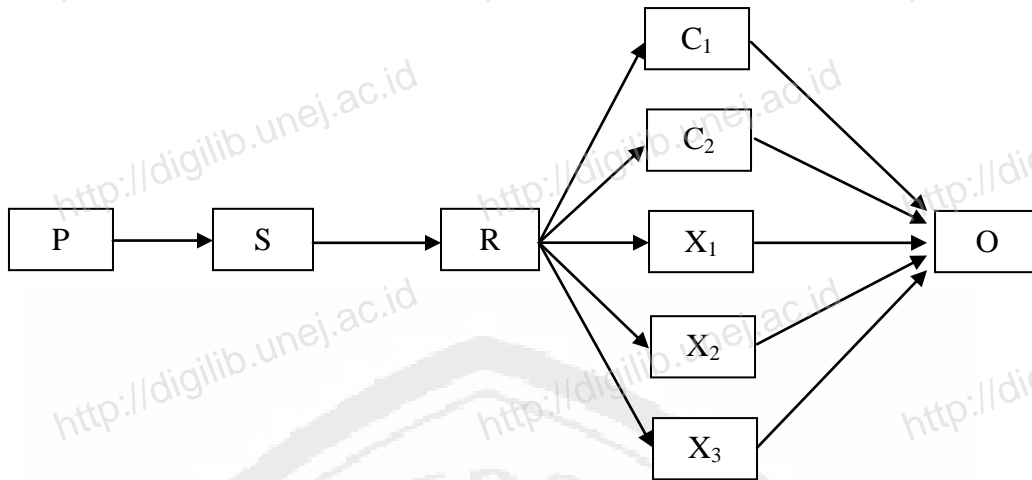
Ada pengaruh ekstrak kedelai terhadap apoptosis sel kanker kolon pada tikus putih (*Rattus Norvegicus strain Wistar*) yang diinduksi DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene).

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *True Experimental* dengan desain *Randomized Post Test Control Group* yang dilakukan dengan *Completely Randomized Design*. Dalam epidemiologi, studi eksperimental digunakan untuk mengukur pengaruh suatu perlakuan (intervensi) pada populasi dengan cara membandingkan hasil-hasil perlakuan pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Penelitian *True Experimental* (eksperimen yang betul-betul) merupakan penelitian eksperimen dimana peneliti dapat mengontrol semua variabel luar yang mempengaruhi jalannya eksperimen. Dengan demikian validitas internal (kualitas pelaksanaan rancangan penelitian) dapat menjadi tinggi. Ciri penelitian eksperimental yaitu adanya kelompok kontrol, randomisasi sampel, dan replikasi (pengulangan) (Sugiyono, 2009).

*Randomized Post Test Control Group* merupakan salah bentuk desain *True Experimental*. Dalam desain ini terdapat dua kelompok yang masing-masing dipilih secara random. Kelompok pertama diberi perlakuan (X) dan kelompok yang lain tidak. Pengujian terhadap pengaruh perlakuan hanya dilakukan setelah perlakuan selesai (Sugiyono, 2009). Sedangkan *Completely Randomized Design* (Rancangan Acak Lengkap) merupakan desain eksperimen random yang paling mendasar. Dalam desain ini, semua subyek dari populasi studi langsung dialokasikan random ke dalam kelompok perlakuan atau kelompok kontrol. Tujuan randomisasi supaya semua variabel yang dependen (di luar perlakuan itu sendiri) yang potensial perancu akan tersebar merata ke dalam kelompok perlakuan dan kelompok kontrol (Murti, 2003). Penelitian ini dilakukan di laboratorium secara *in vivo* menggunakan tikus putih (*Rattus Norvegicus strain Wistar*) sebagai model.



Keterangan :

- P = Populasi  
 S = Sampel  
 R = Randomisasi  
 C<sub>1</sub> = Kontrol normal (tidak diinduksi DMBA dan tidak diberi ekstrak kedelai)  
 C<sub>2</sub> = Kontrol negatif (diinduksi DMBA 35 mg/BB dan tidak diberi ekstrak kedelai)  
 X<sub>1</sub> = Perlakuan I (diinduksi DMBA 35 mg/BB dan diberi ekstrak kedelai 5 mg/BB)  
 X<sub>2</sub> = Perlakuan II (diinduksi DMBA 35 mg/BB dan diberi ekstrak kedelai 10 mg/BB)  
 X<sub>3</sub> = Perlakuan III (diinduksi DMBA 35 mg/BB dan diberi ekstrak kedelai 20 mg/BB)  
 O = Observasi/pengamatan pengaruh perlakuan melalui uji TUNEL

Gambar 3.1 Rancangan Percobaan

### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

#### 3.2.1 Tempat Penelitian

Tempat penelitian ini adalah Laboratorium Biomedis Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember dan Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Laboratorium Biomedis Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember sebagai tempat proses persiapan hewan coba, perlakuan DMBA, pemberian ekstrak kedelai, dan pembedahan tikus. Sedangkan Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang sebagai

tempat pembuatan preparat sekaligus pengukuran variabel tergantung yaitu pengujian apoptosis sel kanker melalui uji TUNEL.

### 3.2.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Februari – Mei 2011 yang meliputi tahap penyusunan proposal, persiapan hewan coba, perlakuan DMBA dan pemberian ekstrak kedelai, pengukuran variabel tergantung, analisis hasil penelitian, penyusunan laporan sampai hasil dapat diseminarkan.

## 3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

### 3.3.1 Populasi Penelitian

Populasi adalah keseluruhan objek yang diteliti (Murti, 2003). Populasi dalam penelitian ini adalah tikus wistar betina berusia 8 – 12 minggu dengan berat badan 100 – 200 gram.

### 3.3.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah sebagian atau seluruh anggota yang diambil dari seluruh objek yang diteliti dan dianggap mewakili seluruh populasi (Notoatmodjo, 2003). Penentuan besar sampel dengan rumus Federrer, yaitu :  $(t - 1)(n - 1) \geq 15$ , dimana  $t$  adalah kelompok perlakuan, dan  $n$  adalah jumlah sampel per kelompok atau jumlah replikasi perlakuan. Jumlah tikus yang digunakan sebagai sampel adalah 30 ekor yang terbagi dalam 5 kelompok perlakuan ( $t$ ), dimana tiap kelompok terdiri dari 6 ekor ( $n$ ).

Pemilihan sampel berdasarkan kriteria inklusi yaitu:

- Tikus wistar betina.
- Berumur 8-12 minggu.
- Berat badan 100-200 gram.
- Dalam keadaan sehat.
- Aktivitas dan tingkah laku normal.

Sedangkan kriteria eksklusi pada penelitian ini yaitu:

- a. Gerakan tikus aktif.
- b. Mengalami diare selama penelitian yang ditandai dengan feses yang tidak terbentuk.
- c. Tikus mati dalam masa penelitian.

Untuk memperoleh variabilitas dari tikus yang digunakan sebagai sampel penelitian, maka tikus pada tiap kelompok diberi kesempatan untuk terpilih sebagai sampel dengan cara random.

### 3.4 Variabel dan Definisi Operasional

#### 3.4.1 Variabel

Variabel adalah atribut atau karakteristik yang dapat berubah atau bervariasi, dapat dinyatakan dalam lebih dari sebuah nilai atau kategori. Variabel-variabel diukur atau diamati peneliti sehingga menghasilkan suatu set data (Murti, 2003). Penelitian ini menggunakan 2 (dua) variabel yaitu:

- a. Variabel Bebas (*independent*).

Variabel independen atau variabel bebas adalah variabel yang dihipotesiskan mempengaruhi variabel lainnya (Murti, 2003). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak kedelai.

- b. Variabel Terikat (*dependent*)

Variabel dependen atau variabel terikat adalah variabel yang dihipotesiskan dipengaruhi oleh variabel lain (Murti, 2003). Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah apoptosis sel kanker kolon.

#### 3.4.2 Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini setiap konsep dapat dijabarkan seperti pada Tabel 3.1.



Tabel 3.1 Variabel, Definisi Operasional, Alat Ukur, dan Skala Data

Variabel Yang Diteliti	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala Data
1	2	3	4
<b>Variabel Independen</b>			
Dosis ekstrak kedelai	Jumlah bubuk kedelai dalam 1 ml air yang kemudian diberikan pada tikus sebanyak 1 cc.	Neraca analitik	Rasio
<b>Variabel Dependen</b>			
Jumlah apoptosis sel kanker	Jumlah kematian sel kanker yang ditandai fragmentasi sitoplasma dan DNA pada preparat kolon tikus	Uji TUNEL	Rasio

### 3.5 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah eter timbangan, neraca analitik, waskom, pengaduk, *hand scone*, gelas ukur, nampan, kandang tikus, sonde, dan seperangkat alat bedah minor. Sedangkan bahan penelitian yang digunakan antara lain makanan tikus (BR-1), DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene) (Sigma, USA), minyak wijen, ekstrak kedelai, eter, dan formalin.

### 3.6 Prosedur Penelitian

#### 3.6.1 Persiapan Kandang

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

#### 3.6.2 Persiapan Hewan Coba

- Seleksi hewan yang akan digunakan sebagai model sesuai kriteria yang telah ditetapkan, dalam hal ini tikus putih (*Rattus Norvegicus strain Wistar*).

- Dilakukan adaptasi setelah tikus diseleksi, yaitu tikus dimasukkan dalam kandang yang sudah disiapkan dengan diberi pakan biasa dan minum selama 1 minggu.

### 3.6.3 Induksi DMBA

Metode pembuatan tikus model kanker kolon dengan pemberian DMBA merujuk pada Reza *et al*, (2005); Misty *et al*, (2005) (dalam Asri, 2004). DMBA 35 mg/kg BB dilarutkan dalam minyak wijen dan diberikan ke tikus per oral. Pemberian DMBA dilakukan setiap hari pada kelompok kontrol negatif, kelompok perlakuan I, kelompok perlakuan II, dan kelompok perlakuan III. DMBA diberikan melalui sonde lambung dalam 1 ml minyak wijen tiap hewan coba setiap hari selama 42 hari (Van Nostrand Reinhold Co, 1981 dalam Budi dan Widyarini, 2010).

### 3.6.4 Perlakuan Ekstrak Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill)

Ekstrak kedelai diberikan melalui sonde dengan dosis 5 mg/kg BB untuk kelompok III (perlakuan I), 10 mg/kg BB untuk kelompok VI (perlakuan II), dan 20 mg/kg BB untuk kelompok V (perlakuan III). Penentuan dosis ekstrak kedelai merujuk pada Mun'im *et.al*. (2006), Ranita *et.al*. (2010), Shim dan Ae-Son (2010), dan William (2005). Pemberian ekstrak kedelai dilakukan setiap hari selama 42 hari. Pemberian ekstrak kedelai ini dilakukan secara bersamaan dengan pemberian DMBA dalam satu hari dengan selang waktu 4 jam.

### 3.6.5 Proses Perlakuan pada Tikus

- a. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, seperti yang disajikan pada tabel 3.2. Sebelumnya tikus diadaptasikan dengan lingkungan laboratorium selama 1 minggu dengan kondisi pencahayaan ruangan gelap 12 jam dan terang 12 jam serta mempunyai kemudahan akses mendapatkan air.

Tabel 3.2 Kelompok Perlakuan dalam Penelitian

Kelompok	Dosis Karsinogen	Dosis Ekstrak kedelai
1	-	-
2	35 mg/BB DMBA dalam 1 ml minyak wijen	-
3	35 mg/BB DMBA dalam 1 ml minyak wijen	5 mg/kg BB dalam 1 ml air
4	35 mg/BB DMBA dalam 1 ml minyak wijen	10 mg/kg BB dalam 1 ml air
5	35 mg/BB DMBA dalam 1 ml minyak wijen	20 mg/kg BB dalam 1 ml air

- b. Pada awal percobaan semua tikus ditimbang berat badannya kemudian dilakukan randomisasi agar setiap hewan memiliki peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan. Selanjutnya berat badan tikus akan ditimbang setiap minggu sekali.
- c. DMBA disondekan sebanyak 35 mg/BB dalam 1 ml minyak wijen setiap hari. Ekstrak kedelai diberikan 4 jam setelah pemberian DMBA. Pemeriksaan kondisi tikus dilakukan setiap hari melalui palpasi untuk mengetahui adanya benjolan pada badan tikus terutama pada daerah perut. Sebelum dilakukan pengambilan sampel darah dan pembedahan, tikus dipuasakan 1 hari untuk menetralkan pengaruh perlakuan.

### 3.6.6 Cara Pembedahan dan Pengambilan Sel Kanker

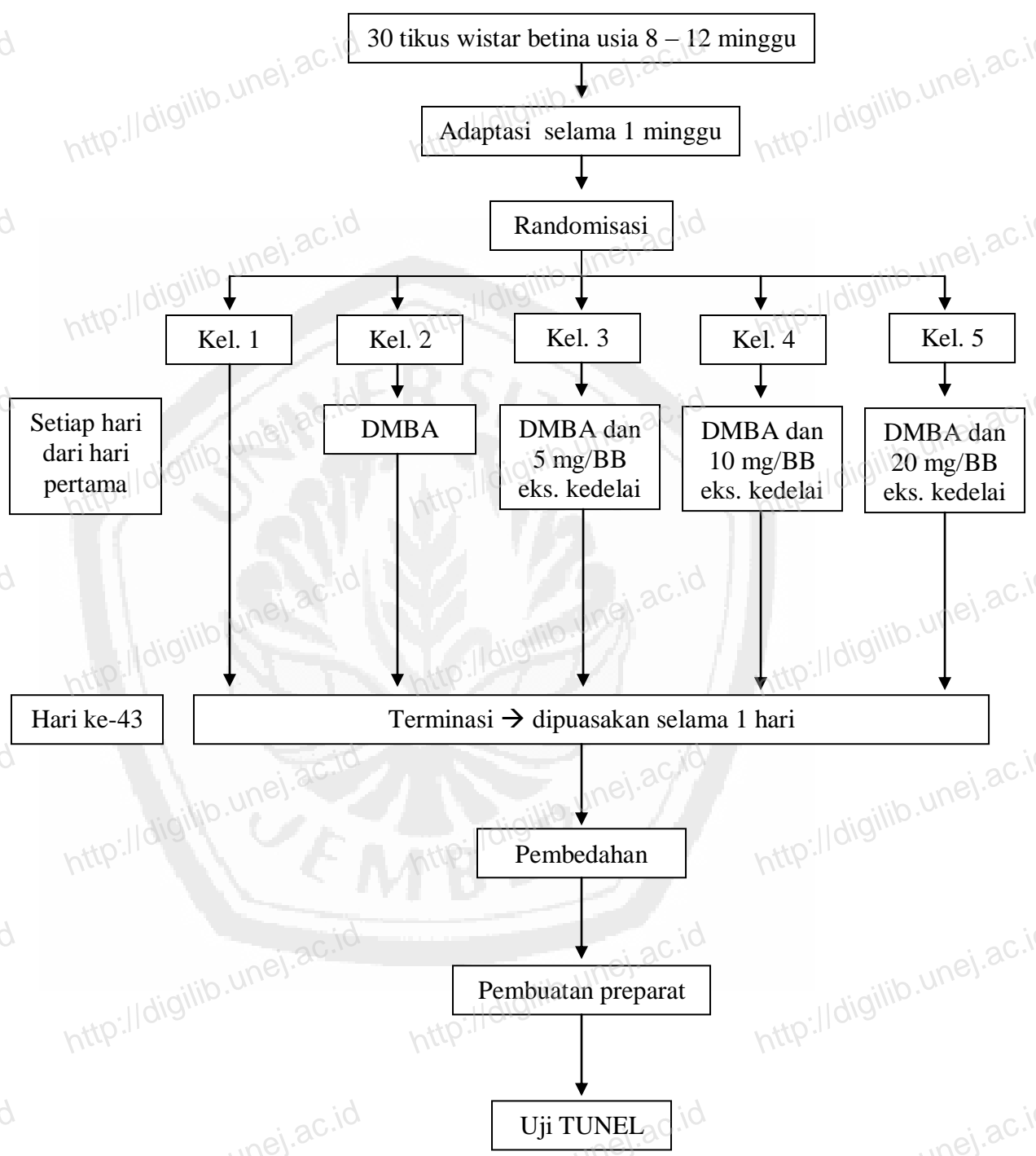
Pengambilan sel kanker pada tikus dilakukan dengan membius menggunakan eter kemudian tikus dibedah dengan menggunakan seperangkat alat bedah minor, lalu diambil usus besar pada bagian yang mencurigakan atau bagian yang sudah terbentuk tumor. Setiap jaringan usus besar tikus diambil 2 potong jaringan yang masing-masing dibuat blok parafin. Selanjutnya dilakukan *proce-sing* jaringan untuk pengujian apoptosis sel.

### 3.6.7 Pemeriksaan Apoptosis dengan Metode Pelabelan Fragmentasi DNA Sistem TUNEL

Sel pada jaringan kolon apoptosis yang diidentifikasi dengan pengecatan *Hematoxylen-Eosin* (HE) selanjutnya dikonfirmasi dengan pewarnaan immuno-

histo-kimia TUNEL, sebagai berikut : Slide preparat kolon dicuci menggunakan PBS pH 7,4 dan inkubasi pada 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 15 menit dan selanjutnya dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit, kemudian diinkubasi dengan TUNEL Fragmentasi DNA labelling selama 60 menit pada suhu 37°C. Kemudian dicuci menggunakan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Inkubasi dengan substrat DAB (*Diamono Benzidine*) selama 40 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya dicuci menggunakan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. *Counterstaining* menggunakan *Mayer Hematoxillen* yang diinkubasi selama 10 menit dan dicuci menggunakan tap water. Kemudian bilas dengan menggunakan dH<sub>2</sub>O dan kering anginkan dan mounting menggunakan entellen dan tutup dengan *cover glass*. Amati pada mikroskop cahaya (Hu Y *et al.* 2002 dalam Asri, 2004).

Fragmentasi DNA yang terjadi pada proses apoptosis akan berlangsung selama beberapa jam, sebelum akhirnya akan mengalami proses fagositosis. DNA yang mengalami fragmentasi dapat dideteksi secara enzimatik pada labeling ujung 3'-OH, dengan menggunakan *digoxigenin enzim* berlabel *peroksidase* akan memberi warna coklat pada inti yang mengalami apoptosis (fragmentasi DNA). Pengujian dilakukan di bawah bimbingan ahli fisiologi Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.



Gambar 3.2 Prosedur Penelitian

### 3.7 Teknik Penyajian dan Analisis Data

Data yang telah diperoleh akan disajikan dalam tabel mean  $\pm$  SD berdasarkan kelompok penelitian. Penyajian data dalam bentuk tabel adalah suatu penyajian yang sistemik dari data numerik yang tersusun dalam kolom atau jajaran (Notoatmodjo, 2005). Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan menggunakan teknik statistik yaitu untuk mengetahui perbedaan dan pengaruh perlakuan pada setiap kelompok tikus dalam penelitian. Analisis secara statistik menggunakan bantuan program komputer melalui uji F (*One way ANOVA* dengan  $\alpha = 0,01$ ).

*Analysis of variance* atau ANOVA merupakan salah satu teknik analisis yang berfungsi untuk membedakan rata-rata lebih dari dua kelompok data dengan cara membandingkan variansinya. *One-Way ANOVA* dilakukan untuk menguji perbedaan tiga kelompok atau lebih berdasarkan satu variabel independen. Asumsi yang digunakan pada ANOVA yaitu :

- Populasi berdistribusi normal.
- Varians dari populasi tersebut adalah sama.
- Sampel tidak berhubungan satu dengan yang lain (Ghozali, 2009).

Adapun langkah-langkah dalam prosedur *One-Way ANOVA* adalah sebagai berikut :

- Tes Homogenitas Varian (*Test of Homogeneity of Variance*)

Asumsi dasar dari ANOVA adalah bahwa seluruh kelompok yang terbentuk harus memiliki varian sama. Hipotesis yang digunakan dalam tes homogenitas varian adalah :

$H_0$  : Diduga bahwa seluruh varians populasi adalah sama.

$H_1$  : Diduga bahwa seluruh varians populasi adalah berbeda.

Dasar dari pengambilan keputusan adalah:

Jika probabilitas  $> 0,01$ , maka  $H_0$  diterima

Jika probabilitas  $< 0,01$ , maka  $H_0$  ditolak, (Ghozali, 2009).

b. Uji F

Uji statistik yang digunakan untuk menguji hipotesis nol bahwa semua kelompok mempunyai mean populasi yang sama adalah Uji F. Harga F diperoleh dari rata-rata jumlah kuadrat (*mean square*) antar kelompok yang dibagi dengan rata-rata jumlah kuadrat dalam kelompok. Hipotesis yang digunakan dalam pengujian ANOVA adalah :

$H_0$  : Diduga bahwa seluruh kelompok memiliki rata-rata populasi yang sama.

$H_1$  : Diduga bahwa seluruh kelompok memiliki rata-rata populasi yang berbeda.

Dasar dari pengambilan keputusan adalah:

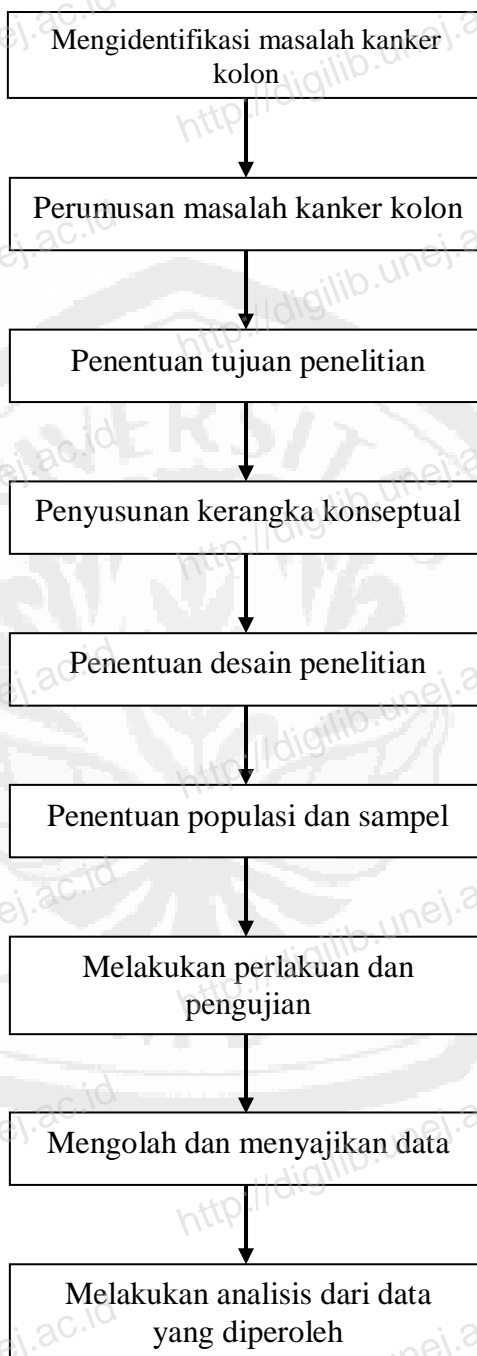
Jika  $F_{hitung} > F_{tabel}$  0,01, maka  $H_0$  diterima

Jika  $F_{hitung} < F_{tabel}$  0,01, maka  $H_0$  ditolak, (Ghozali, 2009).

c. Tes Post Hoc (*Post Hoc Test*)

Dari hasil ANOVA (F test) telah diketahui bahwa secara umum seluruh kelompok memiliki perbedaan (tidak sama). Untuk mengetahui lebih lanjut perbedaan yang terjadi antar kelompok maka digunakan *Post Hoc Test* dengan menggunakan salah satu fungsi *Tukey*. Sebaliknya, untuk mengetahui kelompok yang tidak berbeda secara signifikan dapat dilihat pada tabel *Homogeneous Subsets* (Ghozali, 2009).

### 3.8 Kerangka Alur Penelitian



Gambar 3.3 Kerangka Alur Penelitian

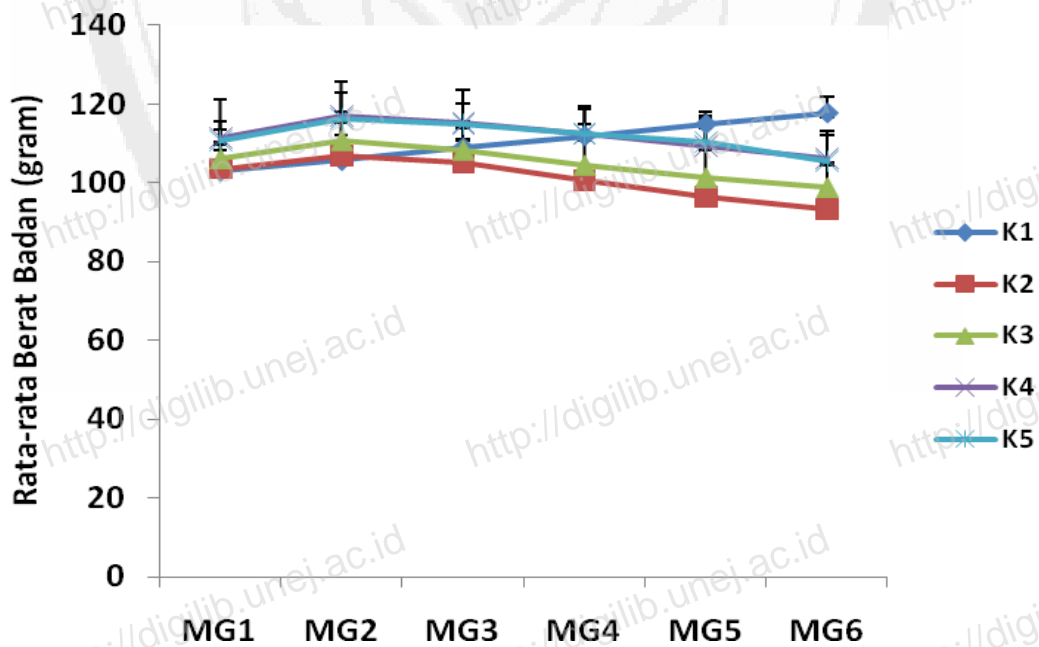


## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil

#### 4.1.1 Apoptosis Sel Kolon pada Setiap Kelompok Perlakuan

Selama penelitian berlangsung, pada minggu pertama percobaan terdapat satu ekor tikus yang dieksklusikan karena mati oleh suatu infeksi, namun diganti dengan sampel cadangan, sehingga jumlah tikus tetap memenuhi syarat yang telah ditetapkan. Pengukuran berat badan dilakukan setiap minggu dari awal perlakuan (minggu ke-1) sampai pada minggu terakhir perlakuan (minggu ke-6). Pengukuran terhadap berat badan hewan uji pada minggu ke-2 memperlihatkan kenaikan rata-rata berat badan pada seluruh kelompok perlakuan. Pada minggu ke-3 mulai terjadi penurunan berat badan pada seluruh kelompok kecuali kelompok kontrol normal yang terus mengalami peningkatan. Data selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Rata-rata dan Standar Deviasi Berat Badan Tikus Selama Masa Pengamatan

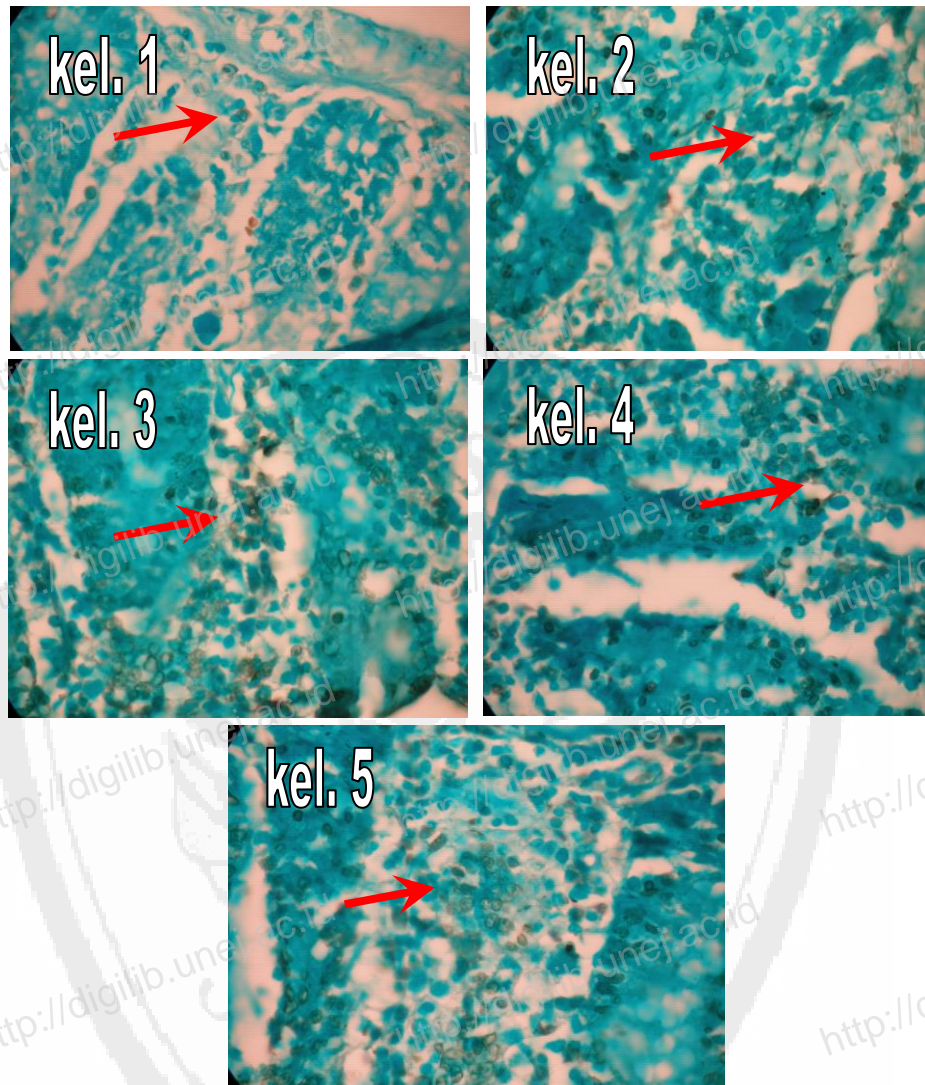
Kejadian tumor selama penelitian berlangsung diidentifikasi melalui palpasi. Pengamatan kejadian tumor melalui palpasi yang dilakukan setiap hari diperoleh data bahwa tidak ditemukan adanya benjolan yang dapat teraba atau pertumbuhan tumor pada permukaan tubuh hewan uji dari seluruh kelompok. Sedangkan dari hasil palpasi terhadap organ kolon setelah dilakukan pembedahan terhadap hewan uji pada hari ke-44 diperoleh data kejadian tumor yang tercantum pada Tabel 4.1. Berdasarkan tabel tersebut, kelompok yang mengalami benjolan di daerah kolon yaitu terdapat pada kelompok yang mendapatkan induksi DMBA. Sedangkan pada kelompok 1 tidak ditemukan tumor. Jumlah keseluruhan tikus yang mengalami tumor pada organ kolon yaitu sebanyak 9 ekor.

Tabel 4.1 Data Kejadian Tumor pada Organ Setelah Dilakukan Pembedahan

Kelompok	Benjolan pada Kolon
Kelompok 1 (kontrol normal)	-
Kelompok 2 (kontrol negatif)	+ 3 ekor
Kelompok 3 (perlakuan 1)	+ 2 ekor
Kelompok 4 (perlakuan 2)	+ 3 ekor
Kelompok 5 (perlakuan 3)	+ 1 ekor
Total	+ 9 ekor

Keterangan : + = terdapat tumor, - = tidak terdapat tumor

Setelah 42 hari perlakuan, seluruh tikus dibedah kemudian diambil organ kolonnya. Kolon tikus yang diduga mengalami tumor dipotong dan dijadikan blok parafin yang akan dilakukan pengujian TUNEL. Pengujian dilakukan dibawah bimbingan ahli fisiologi Laboratorium Fisiologi Kedokteran Universitas Brawijaya. Hasil pengujian TUNEL berupa gambaran mikroskopik dengan pembesaran 1000 kali dapat dilihat pada gambar 4.2.



Gambar 4.2 Pewarnaan Imunohistokimia untuk Sel Apoptosis Menggunakan TUNEL, Ditunjukkan Adanya Pewarnaan Coklat pada Inti yang Mengalami Penyusutan/*Shinkage* dan Dikelilingi oleh Halo Jernih.

Berdasarkan gambar mikroskopik tersebut dapat dilihat bahwa terdapat perbedaan jumlah apoptosis yang ditandai pewarnaan coklat pada masing-masing preparat. Pada kelompok 1 terdapat sedikit apoptosis yang terjadi dan jaringan berada dalam kondisi normal. Pada kelompok 2 terdapat apoptosis yang relatif sedikit dan jaringan mengalami tumor. Sedangkan pada kelompok 3 terdapat jum-

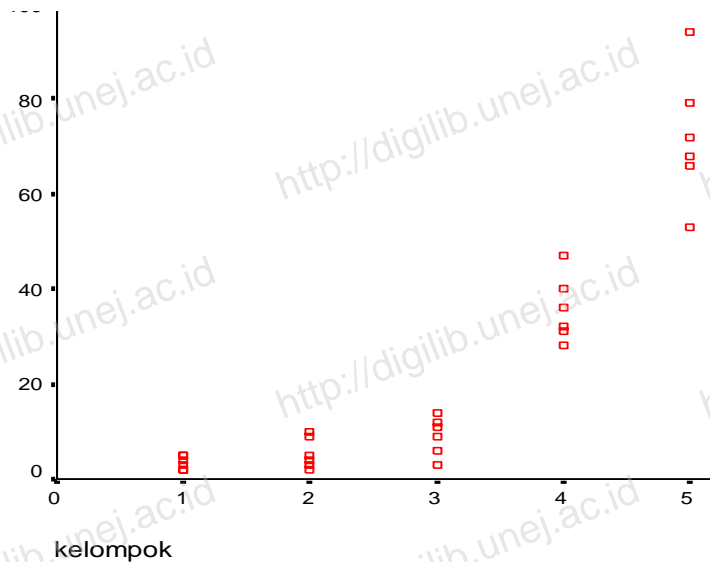
lah apoptosis yang relatif lebih banyak daripada kelompok 2. Jumlah apoptosis tampak meningkat jumlahnya pada kelompok 4 dan kelompok 5. Untuk mengetahui perbedaan jumlah apoptosis pada masing-masing kelompok selanjutnya dilakukan perhitungan.

Jumlah apoptosis sel kanker kolon tikus dihitung berdasarkan jumlah rata-rata kematian sel kanker yang ditandai fragmentasi sitoplasma dan DNA berwarna coklat pada 10 lapang pandang preparat kolon tikus setelah uji TUNEL melalui mikroskop cahaya. Penghitungan jumlah apoptosis pada preparat kolon tikus dilakukan oleh dua tenaga ahli independen yang tidak terkait dengan penelitian ini. Hasil penghitungan jumlah apoptosis sel kanker kolon tikus selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.2 serta plot data kelompok perlakuan (X) dan jumlah apoptosis (Y) dapat dilihat pada Gambar 4.3.

Tabel 4.2 Mean dan Standar Deviasi (SD) Jumlah Apoptosis Sel Kanker Kolon

Kelompok	Mean	SD
Kelompok 1	3,5	1,378
Kelompok 2	5,5	3,271
Kelompok 3	9,2	4,070
Kelompok 4	35,7	6,947
Kelompok 5	72	13,755

Berdasarkan hasil penghitungan apoptosis, terdapat perbedaan rata-rata jumlah apoptosis pada setiap kelompok tikus. Kelompok 1 memiliki jumlah apoptosis sel kolon yang relatif sedikit. Sedangkan kelompok 2 memiliki jumlah apoptosis yang lebih banyak dibandingkan pada kelompok 1. Rata-rata jumlah apoptosis sel kanker pada kelompok 3, kelompok 4 dan kelompok 5 juga berbeda. Data ekstrim peningkatan rata-rata jumlah apoptosis yaitu pada kelompok 4 dan kelompok 5.



Gambar 4.3 Plot Data Kelompok Perlakuan (X) dan Jumlah Apoptosis (Y)

Berdasarkan plot data kelompok perlakuan (X) dan jumlah apoptosis (Y) pada Gambar 4.3, dapat dinyatakan bahwa ada perbedaan jumlah apoptosis pada masing-masing kelompok perlakuan. Selain itu, pada setiap kelompok perlakuan menunjukkan peningkatan jumlah apoptosis. Hal ini dapat dikatakan bahwa terdapat kecenderungan pengaruh perlakuan pada masing-masing kelompok terhadap jumlah apoptosis. Pada grafik tersebut juga menunjukkan adanya kuadratik. Besarnya perbedaan yang mengindikasikan pengaruh ekstrak kedelai terhadap sel kanker kolon yang terjadi dianalisis secara uji statistik.

#### 4.1.2 Analisis Pengaruh Ekstrak Kedelai terhadap Jumlah Apoptosis Sel Kanker Tikus yang Diinduksi Karsinogenesis Kolon

Data hasil penelitian berupa rata-rata apoptosis dianalisis secara statistik menggunakan *One Way ANOVA*. Data yang diperoleh pada penelitian ini yaitu data dengan skala rasio. ANOVA merupakan salah satu teknik analisis yang berfungsi untuk membedakan rata-rata lebih dari dua kelompok data dengan cara membandingkan variansinya. Beberapa asumsi yang harus dipenuhi ANOVA yaitu populasi/data berdistribusi normal, varian dari populasi/kelompok tersebut

adalah sama (kesamaan ragam), dan sampel tidak berhubungan satu dengan yang lain (Ghozali, 2009).

a. Uji Normalitas Data

Untuk mengetahui data berdistribusi normal atau tidak dilakukan uji normalitas data dengan *Kolmogorov Smirnov Test*. Hasil uji normalitas data dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Hasil Uji Normalitas Data (*One-Sample Kolmogorov Smirnov*)

	Kelompok	Jumlah apoptosis
N	30	30
Parameter Normal (a,b)	Rata-rata	25.17
	Standar Deviasi	27.435
Kolmogorov-Smirnov Z	.857	1.413
Taraf Signifikansi (2-tailed)	.454	.037

a. Data Berdistribusi Normal.

b. Dikalkulasi berdasarkan data

Hasil pengujian menunjukkan *p-value* lebih dari  $\alpha = 0,01$  yaitu sebesar 0,037. Oleh sebab itu dapat disimpulkan bahwa asumsi pertama pada ANOVA terpenuhi yaitu data berdistribusi normal.

b. Tes Homogenitas Varian (*Test of Homogeneity of Variance*)

Asumsi kedua pada ANOVA yaitu varian dari populasi/kelompok tersebut adalah sama (kesamaan ragam). Kesamaan ragam merupakan asumsi dasar dari ANOVA (Ghozali, 2009). Hasil Tes Homogenitas Varian dapat dilihat pada Tabel

4.4.

Tabel 4.4 *Test of Homogeneity of Variance*

Uji Statistik	df1	df2	Sig.
3.330	4	25	.026

Berdasarkan *Test Homogeneity of Variance* di atas, nilai *p-value* lebih dari  $\alpha = 0,01$  yaitu sebesar 0,026. Hal ini dapat dinyatakan bahwa seluruh varians populasi adalah sama. Oleh karena itu, asumsi kesamaan ragam terpenuhi.

### c. Uji F

Uji statistik yang digunakan untuk menguji hipotesis awal bahwa semua kelompok mempunyai mean populasi yang sama adalah Uji F (Ghozali, 2009). Hasil uji F dapat dilihat pada Tabel 4.5. Hasil uji F (ANOVA) dapat dilihat pada *p-value* ANOVA yaitu sebesar 0,000. Nilai signifikansi tersebut kurang dari  $\alpha = 0,01$  sehingga hipotesis awal ditolak. Hal ini berarti minimal ada satu di antara kelima kelompok perlakuan itu yang memberikan pertambahan jumlah apoptosis atau rata-rata jumlah apoptosis yang berbeda.

Tabel 4.5 ANOVA

	Jumlah Kuadrat	df	Rata-rata Kuadrat	F	Sig.
Di antara Kelompok	20495.000	4	5123.750	96.082	.000
Di dalam Kelompok	1333.167	25	53.327		
Total	21828.167	29			

#### 4.1.3 Analisis Perbedaan Pengaruh Ekstrak Kedelai terhadap Jumlah Apoptosis Sel Kanker Tikus yang Diinduksi Karsinogenesis Kolon antar Kelompok Perlakuan

Berdasarkan hasil ANOVA dinyatakan bahwa terdapat perbedaan pengaruh perlakuan terhadap jumlah apoptosis sel kolon. Untuk mengetahui lebih lanjut perbedaan yang terjadi antar kelompok maka digunakan *Post Hoc Test* dengan menggunakan salah satu fungsi *Tukey* (Ghozali, 2009). Hasil *Post Hoc Test* dapat dilihat pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 *Multiple Comparisons*

	(I) kelompok	(J) kelompok	Perbedaan rata-rata (I-J)	Sig.
Tukey HSD	kelompok kontrol normal	kelompok kontrol negatif	-2.00	.989
		kelompok perlakuan I	-5.67	.667
		kelompok perlakuan II	-32.17(*)	.000
	kelompok kontrol negatif	kelompok perlakuan III	-68.50(*)	.000
		kelompok kontrol normal	2.00	.989
		kelompok perlakuan I	-3.67	.905
		kelompok perlakuan II	-30.17(*)	.000
		kelompok perlakuan III	-66.50(*)	.000

(I) kelompok	(J) kelompok	Perbedaan rata-rata (I-J)	Sig.
kelompok perlakuan I	kelompok kontrol normal	5.67	.667
	kelompok kontrol negatif	3.67	.905
	kelompok perlakuan II	-26.50(*)	.000
kelompok perlakuan II	kelompok perlakuan III	-62.83(*)	.000
	kelompok kontrol normal	32.17(*)	.000
	kelompok kontrol negatif	30.17(*)	.000
kelompok perlakuan III	kelompok perlakuan I	26.50(*)	.000
	kelompok perlakuan III	-36.33(*)	.000
	kelompok kontrol normal	68.50(*)	.000
	kelompok kontrol negatif	66.50(*)	.000
	kelompok perlakuan I	62.83(*)	.000
	kelompok perlakuan II	36.33(*)	.000

\* Perbedaan rata-rata yang signifikan terletak pada level 0.1.

Berdasarkan hasil *Post Hoc Test* diketahui beberapa kelompok yang berbeda secara signifikan ( $p\text{-value} < \alpha = 0,01$ ) yaitu:

- 1) Antara kelompok 1 dan kelompok 4.
- 2) Antara kelompok 1 dan kelompok 5.
- 3) Antara kelompok 2 dan kelompok 4.
- 4) Antara kelompok 2 dan kelompok 5.
- 5) Antara kelompok 3 dan kelompok 4.
- 6) Antara kelompok 3 dan kelompok 5.
- 7) Antara kelompok 4 dan kelompok 5.

Sebaliknya, untuk mengetahui kelompok yang tidak berbeda secara signifikan dapat dilihat pada tabel *Homogeneous Subsets*. Berdasarkan hasil uji, kelompok perlakuan dapat dibagi ke dalam tiga golongan yang berbeda secara signifikan. Hasil tes *Homogeneous Subsets* dapat dilihat pada Tabel 4.7.

Tabel 4.7 *Homogeneous Subsets*

Kelompok	N	Perhitungan untuk alfa = .01		
		1	2	3
Tukey HSD(a)				
kelompok kontrol negatif	6	3.50		
kelompok kontrol positif	6	5.50		
kelompok perlakuan I	6	9.17		



Kelompok	N	Perhitungan untuk alfa = .01		
		1	2	3
kelompok perlakuan II	6		35.67	
kelompok perlakuan III	6			72.00
Sig.		.667	1.000	1.000

## 4.2 Pembahasan

### 4.2.1 Pengaruh Ekstrak Kedelai terhadap Jumlah Apoptosis Sel Kanker Tikus yang Diinduksi Karsinogenesis Kolon

Kolon adalah bagian dari sistem pencernaan yang disebut juga *traktus gastrointestinal*. Fungsi utama kolon adalah mengabsorpsi air dan elektrolit dari kimus untuk membentuk *feces* yang padat dan penimbunan bahan *feces* sampai dapat dikeluarkan. Setengah bagian proksimal kolon berhubungan dengan absorpsi dan setengah distal kolon berhubungan dengan penyimpanan. Mukosa usus besar mempunyai kemampuan absorpsi aktif natrium yang tinggi dan klorida juga ikut terabsorpsi (Ganong, 1994). Selain itu, zat kimiawi bersifat karsinogen yang masuk dalam katup ileosekal juga dapat terabsorpsi oleh kolon. Zat karsinogen yang terserap mampu menyebabkan iritasi serta mutasi gen pada sel kolon yang pada akhirnya menimbulkan terjadinya keganasan pada kolon (Tati, 2003).

Bruce W.R et al (2000) menyatakan bahwa terdapat dua mekanisme yang diduga terjadi dalam karsinogenesis kolon yang berhubungan dengan inflamasi. Pertama, defek pada barrier epitelial (yang bisa disebabkan oleh bahan kimiawi seperti karsinogen) menimbulkan iritasi lokal ; iritasi akan menyebabkan respon inflamasi dimana terjadi aktivasi enzim COX-2 (*cyclooxygenase-2*) dan terbentuknya prostaglandin dari *asam arakhidonat*. Ini akan memicu sel radang, dimana sel radang akan melepaskan radikal bebas, yang bersifat mutagenik dan mitogenik dan mempromosi karsinogenesis kolon. Mekanisme kedua, defek barrier epitelial akan menimbulkan ketidakseimbangan elektrolit berupa *efflux* kalium dan *influx* natrium dan kalsium. Gangguan elektrolit ini menyebabkan terjadinya oksidatif

dan pembentukan radikal bebas. Radikal bebas sebaliknya juga akan menginduksi COX-2 dan prostaglandin yang akan mempromosi karsinogenesis.

Induksi karsinogen berupa DMBA pada penelitian ini bertujuan untuk menimbulkan adanya kanker pada kolon tikus. Senyawa DMBA adalah zat kimia yang termasuk dalam PAH yang dikenal bersifat mutagenik, teratogenik, dan karsinogenik. DMBA juga dilaporkan sebagai karsinogen poten pada hewan coba, dengan target utama pada kulit dan *glandula mammae* (Haschek dan Rousseaux, 1991; Mun'im et al., 2006; Russo dan Russo, 1996). Metabolit aktif dari DMBA akan berikatan dengan DNA epitel *colon* (DNA *adduct*), selanjutnya ikatan dengan DNA akan turun hingga 50% 16 jam pasca paparan dengan DMBA. Apabila paparan DMBA dilakukan terus menerus selama 42 hari, maka akan terjadi ikatan yang menetap antara metabolit aktif DMBA dan DNA yang akan memicu munculnya tumor atau kanker (Van Nostrand Reinhold Co, 1981 dalam Budi dan Widyarini, 2010). Induksi DMBA pada penelitian ini telah menimbulkan adanya benjolan atau tumor pada kolon tikus yang pada akhirnya akan menimbulkan keganasan sel atau kanker.

Salah satu upaya penanggulangan kejadian kanker kolon yaitu melalui kemopreventif. Kemopreventif berpotensi untuk menjadi komponen utama kontrol kanker. Walaupun masyarakat ilmiah telah mengetahui kontribusi potensial kemopreventif untuk pencegahan dan kontrol kanker kolon, pendekatan optimal untuk preventif kanker ini adalah kombinasi antara manipulasi nutrisi dan pemberian bahan kemopreventif (Asri, 2004). Sedangkan tujuan terapi kanker adalah membunuh sel kanker dan melindungi sel normal dari akibat terapi. Salah satu upaya mengatasi masalah kanker adalah mengembalikan fungsi gen yang terganggu, yaitu menginduksi apoptosis (Ceruti et al, 2003).

Deregulasi apoptosis mengakibatkan keadaan patologis, termasuk proliferasi sel secara tidak terkontrol seperti pada kanker. Pada keadaan transformasi keganasan, sel yang mengalami perubahan tersebut tidak dapat lagi disingkirkan

dengan mekanisme apoptosis, oleh karena timbulnya mutasi gen pengatur apoptosis sehingga terjadi resistensi apoptosis. Hal ini menjadi salah satu mekanisme kerja zat kemopreventif yaitu melalui peningkatan apoptosis (Asri, 2004).

Terdapat berbagai bukti yang menyatakan kontrol apoptosis dikaitkan dengan gen yang mengatur berlangsungnya siklus sel. Apoptosis dalam hal ini dikendalikan oleh dua perangkat gen dengan fungsi yang antagonistik yaitu memacu dan menghambat. Gen tersebut adalah p53 (gen tumor supresor/memicu apoptosis) dan gen Bcl-2 (*B Cell Lymphoma*), salah satu gen yang menghambat apoptosis (Asri, 2004). Gangguan regulasi dan proliferasi sel baik akibat aktivitas onkogen dominan maupun inaktivasi tumor suppressor gen ada hubungannya dengan kontrol apoptosis (Kresno, 2001).

Pada banyak jenis kanker diketahui bahwa terjadi mutasi homozigot dari gen p53 sehingga apoptosis tidak dapat terjadi dan mutasi tidak dapat dicegah. Demikian juga dengan gen Bcl-2, mengalami ekspresi berlebihan, sehingga yang seharusnya terbunuh melalui apoptosis tetap hidup dan dapat menimbulkan kanker. Payne C. et al. 1995 meneliti apoptosis pada biopsi kolon manusia dengan riwayat kanker kolon, adenoma, kolitis dan tanpa neoplasia dan menemukan bahwa rata-rata indeks apoptosis pada orang normal dan kanker kolon berbeda secara signifikan.

Kacang-kacangan polong seperti kedelai, sudah lama diakui sebagai sumber protein, serat larut dan berbagai zat gizi mikro yang memiliki kontribusi unggul dalam pola makan (Afriansyah, 2000). Aspek gizi kedelai telah diteliti secara intensif selama 5-10 tahun lalu, karena kedelai merupakan makanan unik sumber isoflavon, suatu group fitokimia. Isoflavon adalah subkelas flavonoid, yakni kelompok besar antioksidan polifenol yang banyak dijumpai secara alami.

Berdasarkan hasil uji statistik pada penelitian ini dinyatakan bahwa terdapat perbedaan rata-rata jumlah apoptosis pada setiap kelompok. Selain itu juga disebutkan bahwa terdapat kecenderungan pengaruh pemberian ekstrak

kedelai terhadap jumlah apoptosis sel kanker kolon tikus. Adanya penambahan dosis ekstrak kedelai terhadap kelompok 3, kelompok 4 dan kelompok 5 menyebabkan rata-rata jumlah apoptosis meningkat.

Pemberian ekstrak kedelai pada penelitian ini berpengaruh pada jumlah apoptosis sel kanker kolon. Mekanisme yang banyak diketahui sebagai anti kanker dari isoflavon pada kedelai adalah aktivitas anti estrogen, menghambat aktivitas enzim penyebab kanker, aktivitas anti oksidan dan meningkatkan fungsi kekebalan sel (Koswara, 2006). Isoflavon kedelai terbukti melalui penelitian *in vitro* dapat menghambat tirosin kinase yang berperan dalam pertumbuhan sel. Aktivitas tirosin kinase yang meningkat ternyata merupakan salah satu ciri sel-sel kanker. Oleh karena itu, isoflavon pada kedelai dapat menghambat perkembangan sel-sel kanker dan angiogenesis (Koswara, 2006). Isoflavon kedelai terdiri dari *deidzein*, *genistein* dan *glycitein*. Komponen bioaktif isoflavon yang berupa *genistein* dan *daidzein* telah dihubungkan dengan aktivitas penurunan gula darah. Selain itu, beberapa penelitian membuktikan bahwa *genistein* dan *phytoestrogen* pada kedelai dapat mencegah kanker prostat, payudara dan penuaan (*aging*) (Lamartiniere, 1992).

Salah satu zat isoflavon yang telah diketahui manfaatnya terhadap perkembangan kanker dan menjadi perhatian saat ini yaitu *genistein*. *Genistein* isoflavon adalah fitoestrogen yang ditemukan dalam konsentrasi tinggi pada kedelai dan produknya, bekerja pada enzim tirosin protein kinase, mempengaruhi apoptosis, proliferasi sel-sel, angiogenesis dan kemudian dapat mempengaruhi jaringan adiposa melalui mekanisme ini. Penelitian eksperimental telah menunjukkan penghambatan pertumbuhan sel dari berbagai sel-sel kanker budidaya termasuk leukemia, payudara, kanker prostat, dan limfoma oleh *genistein*. *Genistein* juga dapat menghambat respon terhadap stres yang dapat mencegah terjadinya apoptosis sehingga apoptosis tetap terjadi (Yiwey et. al., 1999).

#### 4.2.2 Perbedaan Pengaruh Ekstrak Kedelai terhadap Jumlah Apoptosis Sel Kanker Tikus yang Diinduksi Karsinogenesis Kolon antar Kelompok Perlakuan

Apoptosis adalah suatu proses kematian sel yang terprogram, diatur secara genetik, bersifat aktif, ditandai dengan adanya kondensasi *chromatin*, fragmentasi sel dan pagositosis sel tersebut oleh sel tetangganya (Kresno, 2001). Salah satu penyebab terjadinya apoptosis yaitu adanya kerusakan sel oleh zat-zat berbahaya seperti zat karsinogenik. Pada penelitian ini, kelompok tikus kontrol normal memiliki rata-rata jumlah apoptosis sel kolon yang lebih kecil daripada kelompok kontrol negatif yang mendapatkan induksi zat karsinogenik (DMBA) walaupun secara statistik tidak memiliki perbedaan yang signifikan.

Pemberian dosis ekstrak kedelai sebanyak 5 mg/BB setelah induksi DMBA pada kelompok 3 telah menyebabkan perbedaan rata-rata jumlah apoptosis sel kanker kolon dibandingkan pada kelompok 2 yang hanya diinduksi DMBA. Namun secara statistik, kedua kelompok tersebut tidak berbeda secara signifikan. Penambahan dosis ekstrak kedelai pada kelompok 4 sebanyak 10 mg/BB meningkatkan jumlah rata-rata apoptosis dan berbeda secara signifikan. Penambahan 20 mg/BB dosis ekstrak kedelai pada kelompok 5 juga menunjukkan peningkatan jumlah apoptosis dan berbeda secara signifikan.

Studi-studi epidemiologi dan laboratorium telah menunjukkan bahwa konsumsi kedelai dapat mengurangi risiko perkembangan beberapa jenis kanker, antara lain kanker payudara, prostat dan kanker kolon. Pada risiko kardiovaskuler, isoflavon kedelai yaitu *genistein* diketahui dapat menghambat tirosin kinase pada kultur sel endotel, menurunkan apoB pada laki-laki yang mengkonsumsi kedelai (Archivio et al, 2008). Studi metanalisis percobaan klinik menunjukkan bahwa pemberian kedelai pada 38 orang dapat menurunkan kolesterol total (9%), kolesterol LDL (13%), trigliserida (11%) dengan konsumsi protein kedelai rata-rata 47 g/hari (Koswara, 2006).

Proses apoptosis dikendalikan oleh berbagai tingkat sinyal sel, yang dapat berasal dari pencetus ekstrinsik maupun intrinsik. Pencetus ekstrinsik terdiri dari beberapa sinyal yaitu hormon, faktor pertumbuhan, *nitric oxide* dan *cytokine*. Sinyal intrinsik apoptosis merupakan suatu respon yang diinisiasi oleh sel sebagai respon terhadap stress dan akhirnya dapat mengakibatkan kematian sel. Sebelum terjadi proses kematian sel melalui enzim, sinyal apoptosis harus dihubungkan dengan *pathway* kematian sel melalui regulasi protein. Pada regulasi ini terdapat dua metode yang dikenali untuk mekanisme apoptosis, yaitu melalui mitokondria (jalur intrinsik) dan penghantaran sinyal secara langsung melalui jalur ekstrinsik.

*Genistein* pada isoflavon kedelai dapat menginduksi apoptosis baik melalui jalur ekstrinsik maupun jalur instrinsik. Secara ekstrintik, *genistein* pada isoflavon kedelai berkaitan dengan reseptor TNF (Yiwey et. al., 1999). Jalur ekstrinsik diawali oleh sel *surface death receptor* dari berbagai macam sel. *Death receptor* adalah anggota dari TNF mempunyai *cytoplasmic domain* yang berisi protein interaksi disebut *death domain*, penting untuk mengirim *apoptotic signals*. Beberapa TNF *receptor family* tidak mempunyai *cytoplasmic death domain*, mekanisme apoptosisnya sedikit diketahui. *Death receptor* (DR) antara lain adalah *Type I TNF receptor* (TNFR I), DR4 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2) dan protein yang berhubungan disebut Fas (CD95). Reseptor-reseptor di atas berikatan dengan ligan yang sesuai seperti CD95-L (APO-1-L/Fas-L), TNF- $\alpha$ , dan TNF-related *apoptosis inducing ligand* (TRAIL). Mekanisme apoptosis diinduksi oleh *death receptor* diilustrasikan dengan baik oleh Fas (Kumar et. al., 2005).

Reseptor yang dicirikan dengan baik (APO-1 atau CD95) diaktivasi dengan pengikatan *Fas ligand* (FasL). Molekul *Fas* menuju ke sitoplasma yang terdapat *death domain* (DD). Rangsangan ligan terhadap reseptor menyebabkan trimerisasi dan menginduksi pembentukan *death-inducing signaling complex* (DISC) yang mengandung adaptor sitoplasma spesifik dan *caspase-8*. Beberapa protein adaptor seperti TNF-R-associated *death domain* (TRADD) berasosiasi

dengan TNF-R1. DD berikatan dengan TRADD membentuk *fas-associated death domain* (FADD). Kemudian FADD berikatan dengan reseptor CD95 dan DR4/5. FADD yang dilekatkan pada *death receptors* kembali berikatan dengan inaktif dari *caspase-8* (di manusia *caspase 10*) melalui *death domain*. *Multiple pro caspase-8* molekul kemudian dibawa ke dekat *death domain* dan mereka saling berikatan untuk mengaktifkan *caspase-8*, yang kemudian enzim tersebut akan mengaktifkan *cascade-caspase* dengan mengikat dan mengaktifkan *pro-caspase* yang lain serta mengaktifkan enzim yang melaksanakan *execution phase* dari apoptosis (Kumar et. al., 2005).

Yuwey et. al. 1999 dalam penelitiannya menyebutkan bahwa *genistein* dalam kedelai juga dapat menginduksi apoptosis sel kanker melalui jalur intrinsik pada gen p53 dan protein Bax. Fungsi gen p53 yaitu memperbaiki DNA yang rusak dan mengistirahatkan siklus sel di G1 sampai perbaikan selesai. Jika perbaikan gagal dan terdapat kerusakan DNA yang hebat, gen p53 akan memicu penghapusan sel dengan apoptosis (Underwood, 1999).

Mekanisme apoptosis jalur intrinsik diawali dari mitokondria yang disebabkan stimulus internal. Jalur intrinsik disebabkan oleh peningkatan permeabilitas mitokondria dan pelepasan molekul *pro apoptotic* ke sitoplasma. *Growth factor* dan *survival signal* menstimulasi produksi *anti-apoptotic members* dari *Bcl-2 family*. *Bcl-2 family* mempunyai lebih dari 20 macam protein, yang semuanya berfungsi regulasi apoptosis. Dua protein yang berfungsi anti apoptosis adalah Bcl-2 dan Bcl-X. Sedangkan protein pro apoptosis yaitu Bax, Bok, Bak, Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa, dan PUMA (Kumar, 2005).

Protein anti apoptosis dalam keadaan normal berada disekitar membran mitokondria dan sitoplasma. Ketika sel kehilangan kemampuan mempertahankan diri atau mengalami stress, Bcl-2 dan/atau Bcl-x akan menghilang dari membran mitokondria dan digantikan kelompok protein pro apoptotis seperti Bax, Bak dan Bim. Ketika Bcl-2/Bcl-x menurun, terjadi peningkatan permeabilitas membran

mitokondria menyebabkan keluarnya beberapa protein yang akan mengaktifkan *caspase cascade* (Kumar, 2005).

Salah satu dari protein tersebut adalah *cytochrome c*. Didalam *cytosol cytochrome c* berikatan dengan Apaf-1 (*apoptosis activating factor-1*) dan mengaktifkan *caspase-9*. Bcl-2 dan Bcl-x secara langsung menghambat aktivasi Apaf-1 dan kemudian menghilang dari sel yang menyebabkan dapat terjadi aktivasi Apaf-1. Protein mitokondria yang lain seperti *apoptosis initiating factor* (AIF) memasuki sitoplasma yang akan berikatan untuk menetralkan berbagai macam inhibitor apoptosis. Hal tersebut akan mengaktifkan *caspase cascade* (Kumar, 2005).

Pada jalur mitokondria tersebut di atas, protein p53 sebagai faktor transkripsi, berperan menginduksi apoptosis dengan meningkatkan ekspresi beberapa gen yang akan meningkatkan apoptosis seperti Fas, DR5, Bax, Noxa, IGFBP3, FIG3, dan PAG608. Protein Bax dan Noxa akan membebaskan *cytochrome c* dari mitokondria. Pembebasan *cytochrome c* dari ruang inter-membran mitokondria ke dalam sitosol, merupakan kunci untuk mengaktifkan *caspase-9*. *Cytochrome c* akan berinteraksi dengan *apoptotic protease-activating factor-1* (Apaf-1), ATP/dATP, dan *caspase-9*, dengan membentuk badan yang disebut apoptosom. Apoptosom ini bertindak sebagai aktivator pada inisiator *caspase*. *Caspase-9* bentuk aktif ini kemudian mengaktifkan *caspase-3*, *caspase-6*, dan *caspase-7* yang menyebabkan program kematian sel melalui proses-proses proteolitik berbagai target (Kumar, 2005).



## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

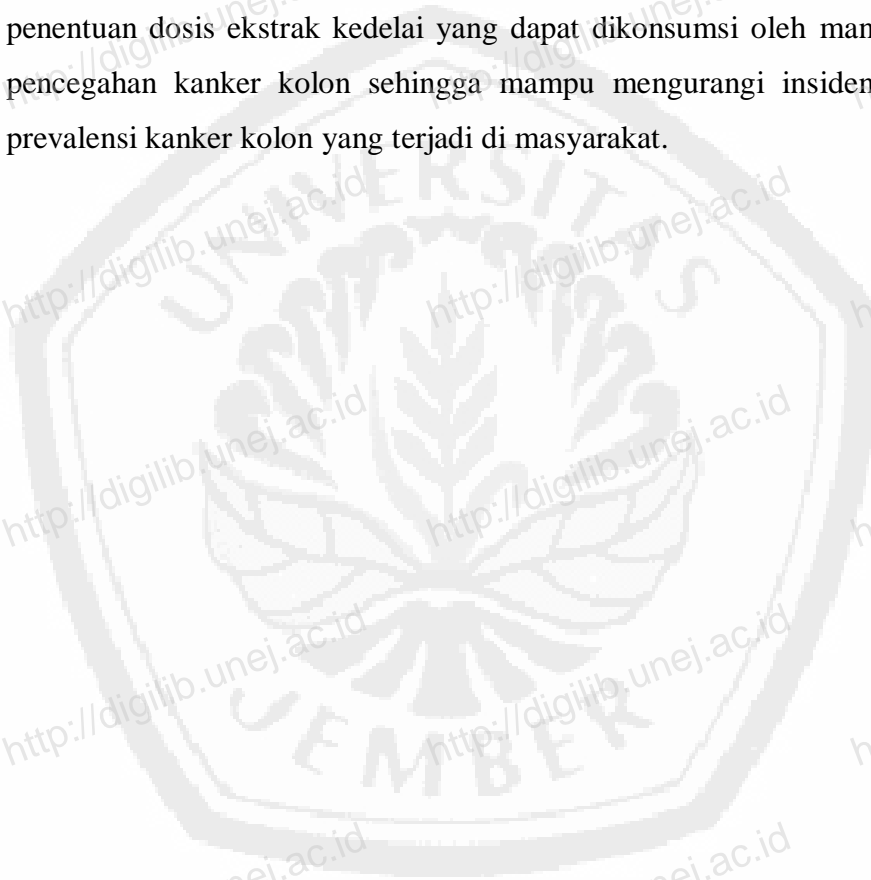
### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan tentang Pengaruh Ekstrak Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) terhadap Apoptosis Sel Kanker Kolon pada Tikus Putih (*Rattus Norvegicus Strain Wistar*) yang Diinduksi DMBA (7,12-Dimethylbenz( $\alpha$ ) Anthracene) (Studi In Vivo pada Tikus Putih Galur Wistar), dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

- a. Terdapat perbedaan rata-rata jumlah apoptosis antara kelompok yang tidak diinduksi DMBA dan tidak diberi ekstrak kedelai, kelompok yang diinduksi DMBA dan tidak diberi ekstrak kedelai, dan kelompok yang diinduksi DMBA dan diberi ekstrak kedelai.
- b. Terdapat minimal ada satu kelompok di antara kelima kelompok perlakuan yang memiliki rata-rata jumlah apoptosis yang berbeda dan dapat dinyatakan bahwa terdapat kecenderungan adanya pengaruh pemberian ekstrak kedelai terhadap apoptosis sel kanker kolon tikus yang diinduksi DMBA.
- c. Beberapa kelompok yang memiliki rata-rata jumlah apoptosis berbeda secara signifikan yaitu kelompok 1 dan kelompok 4, kelompok 1 dan kelompok 5, kelompok 2 dan kelompok 4, kelompok 2 dan kelompok 5, kelompok 3 dan kelompok 4, kelompok 3 dan kelompok 5, serta kelompok 4 dan kelompok 5.

## 5.2 Saran

- a. Perlu adanya penelitian lanjutan untuk mengetahui jenis-jenis kandungan gizi kedelai yang mampu mencegah kejadian kanker kolon.
- b. Berdasarkan hasil penelitian yaitu ekstrak kedelai mempunyai efek yang baik terhadap pencegahan terjadinya kanker kolon pada tikus yang terpapar kar-sinogen, maka perlu adanya pengembangan kelanjutan penelitian untuk penentuan dosis ekstrak kedelai yang dapat dikonsumsi oleh manusia dalam pencegahan kanker kolon sehingga mampu mengurangi insidensi maupun prevalensi kanker kolon yang terjadi di masyarakat.



## DAFTAR PUSTAKA

- Afriansyah, Nurfi. 2000. *Tempe Dapat Hambat Kanker Prostat*. [Serial On Line]. <http://www.kompas.com/kompas-cetak/0004/02/ipitek/temp.21.htm>. (diakses 10 desember 2010).
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1995. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*. USA.
- Alamsyah, Gontar Siregar. 2007. *Deteksi Dini dan Penatalaksanaan Kanker Usus Besar*. Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar Tetap dalam Bidang Ilmu Penyakit Dalam pada Fakultas Kedokteran. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Asri, Aswiyanti. 2004. *Pengaruh Pemberian Perasan Seledri Terhadap Aktivitas Proliferasi Sel, Indeks Apoptosis dan Perubahan Histopatologi Mukosa Kolon Wistar (Kajian Karsinogenesis Kolon)*. Semarang: Program Pasca-sarjana Universitas Diponegoro.
- Bruce WR, Giacca A, dan Medline A. 2000. *Possible Mechanism Relating Diet and Risk of Colon Cancer*. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. [Serial on Line]. <http://cebp.aacrjournal.org/cgi/content/full/9/12/1271>. (diakses 12 Maret 2011).
- Budi dan Widyarini. 2010. *Dampak Induksi Karsinogenesis Glandula Mammar dengan 7, 12-dimetilbenz(α)antrasen terhadap Gambaran Histopatologis Lambung Tikus Sprague Dawley*. *Jurnal Veteriner* Maret 2010. Vol. 11 No. 1 : 17-23. ISSN: 1411 – 8327. Yogyakarta : Universitas Gadjah Mada.
- Ceruti S, Mazolla A dan Abbracchio MP. 2005. *Resistance of human astrocytoma cells to apoptosis induced in mitochondria damaging agents. Possible implications for anticancer therapy*. *J Pharmacol & Therapy* 2005; 324: 825-37
- Departemen Kesehatan. 2006. *Deteksi Dini Kanker Usus Besar*. [Serial On Line]. <http://www.litbang.depkes.go.id/aktual/kliping/KankerUsus011106.htm>. (diakses 10 Desember 2010).
- Dorundi S, Banerjea A. 2006. *Colorectal Cancer: Early Diagnosing and Predisposing Causes*. *Surgery*: 24;131-136.

- Fahlevi, Reza. 2008. *Kanker Kolorektal*. [Serial On Line]. <http://usebrains.com/2008/09/14/kanker-kolorektal/>. (diakses 12 desember 2010).
- Ganong W. F. 1994. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Edisi 17*. Jakarta: EGC
- Ghozali, Imam. 2009. *Aplikasi Analisis Multivariate dengan Program SPSS*. Semarang: BP UNDIP.
- Guyton A. C, dan Hall J. E. 2008. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Edisi 11*. Jakarta: EGC.
- Haschek WM, dan Rousseaux C. G. 1991. *Handbook of Toxicology Pathology. London*. Academic Press Inc.
- Hu Y, Martin J, Leu RL. 2002. *The Colonic Respon to Genotoxic Carcinogens in the Rat :regulation by Dietary Fibre. Carsinogenesis*. [Serial On line]. <http://carcin.oupjournals.org/cgi/content/full/23/7/1131>. (Diakses 24 Januari 2011).
- Inventaris RSD Soebandi Jember. 2008. *Data Kejadian Kanker di Register Poli Penyakit Dalam RSD Soebandi Jember (2008-2009)*. Jember: RSD Soebandi Jember.
- Ismunandar. 2003. *Pembentukan Karsinogen dalam Makanan*. [Serial On Line]. [http://www.chem-is-try.org/artikel\\_kimia/berita/pembentukan\\_karsinogen\\_dalam\\_makanan/](http://www.chem-is-try.org/artikel_kimia/berita/pembentukan_karsinogen_dalam_makanan/). (diakses 28 Maret 2011).
- Koswara, Sutrisno. 2006. *Isoflavon, Senyawa Multi-Manfaat dalam Kedelai*. [Serial On Line]. <http://www.ebookpangan.com/ARTIKEL/ISOFLAVON%20%20ZAT%20MULTI%20MANFAAT%20%20DALAM%20KEDELAI.pdf>. (diakses 10 desember 2010).
- Kresno SB. 2001. *Ilmu Onkologi Dasar*. Jakarta: Bagian Patologi Klinik FKUI.
- Kumar V, Abbas, dan Fausto, AK. 2005. *Pathologic Basis of Disease. 7th ed*. Philadelphia, Pennsylvania. Elsevier Saunders; p 26-32, 89-91,812-13, 880-881, 956-59, 1129-38.
- Lamartiniere CA, Holland MB. 1992. *Neonatal diethylstilbestrol prevents spontaneously developing mammary tumors. In: Li JJ, Nandi S, Li SA, eds. Hormonal carcinogenesis*. New York: Springer Verlag, 1992:305-8.

- Lima, M. P. Corrêa dan Gomes-da-Silva, M. H. G..2005. *Colorectal cancer: lifestyle and dietary factors. Department of Food and Nutrition. Mato Grosso Federal University. Cuiabá, Brasil.* [Serial On Line]. <http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v20n4/01CancerColorectal.pdf>. (Diakses 28 Maret 2011).
- Liu Y-J, Johnson GD, dan Gordon J. 1992. *Germinal centers in T-cell dependent antibody response. Immunol Today.* 1992; 13: 17-21.
- Mun'im A, Andrajati, dan Susilowati, H. 2006. *Uji Hambatan Tumorigenesis Sari Buah Merah (Pandanus Conoideus Lam) terhadap Tikus Putih Betina yang Diinduksi 7, 12 dimetilbenz (α) antrasen (DMBA).* MIK III(3):153 – 161.
- Murti, Bhisma. 2003. *Prinsip dan Metode Riset Epidemiologi.* Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Notoatmodjo. 2003. *Metode Penelitian Kesehatan.* Jakarta: Rineka Cipta.
- Notoatmodjo, S. 2005. *Metodologi Penelitian Kesehatan.* Jakarta: Rineka Cipta.
- Payne C, Bernstein C, Garewal H, Sampliner, dan Warneke. 1995. *Resistance to Apoptosis in Colon Carcinogenesis.* [Serial On Line]. <http://sup.ultrakohl.com/uscap/payne.htm>. (Diakses 20 Maret 2011).
- Peterson, R. K. D. 1995. *Insects,disease, and military history: the Napoleonic campaigns and historical perception. American Entomologist.* 41:147-160. [Serial On Line]. <http://entomology.montana.edu/historybug/napoleon/wheel.htm>. (Diakses 28 Maret 2011)
- Prawesti, Ayu, Ibrahim Kusman, dan Nuraeni, Aan. 2007. *Kualitas Hidup Pasien yang Menjalani Pemasangan Stoma Usus di Wilayah Kota Bandung.* Laporan Penelitian Dasar (LITSAR) UNPAD. Bandung : Lembaga Penelitian Universitas Padjadjaran.
- Putra, Suhartono. 1997. *Patologi Molekuler Kanker. dalam Biologi Molekuler Kedokteran. Edisi pertama.* Surabaya : Airlangga University Press.
- Ranita, Budi, Tri M., dan Widyarini, Sitarina. 2010. *Dampak Induksi Karsinogenesis Glandula Mammariae dengan 7, 12-dimetilbenz(α)antrasen terhadap Gambaran Histopatologis Lambung Tikus Sprague Dawley.* Jurnal Veteriner. Vol. 11 No. 1 : 17-23. Yogyakarta : FKH UGM.
- Riana, Apit. 2005. *Kacang Kedelai.* [Serial On Line] <http://www.asiamaya.com/nutrients/kedelai.htm>. (Diakses 30 Maret 2011).

- RSK Dharmais. 2007. *10 Besar Kanker Tersering RSK Rawat Jalan (Kasus Baru) tahun 2007*. [Serial on Line]. <http://www.dharmais.co.id/index.php/cancer-statistic.html>. (diakses 25 April 2011)
- Rundle, A., Tang, D., Hibshoosh, H., Estabrook, A., Schnabel, F., Cao, W., Grumet, S., and Perera, F. P. 2000. *The relationship between genetic damage from polycyclic aromatic hydrocarbons in breast tissue and breast cancer*. *Journal Carcinogenesis.*, 2000; 21: (1281–9).
- Russo IH, dan Russo J. 1996. *Mammary Gland Neoplasia In Long Term Rodent Studies*. *Environ Health Perspect* 104 (9): 938-967.
- Sanif, R. 2001. *Sinopsis Onkologi Ginekologi*. Sub bagian Onkologi Ginekologi Bagian Obstetri dan Ginekologi FKUI/RSUPN dr. Cipto Mangun kusumo. Jakarta.
- Shim, Jae-Young dan Ae-Son Om. 2010. *Anticancer Effects of Isoflavones and Probiotics in Colon Cancer Induced Rats*. Department of Food & Nutrition, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea. [Serial On Line]. [http://www.asaimkorea.org/data/library/out/bean\\_om\\_fu.doc](http://www.asaimkorea.org/data/library/out/bean_om_fu.doc) . (Diakses 20 Maret 2011).
- Sudiana, IK. 2004. *Pewarnaan apoptosis*. In: *Teknologi Ilmu Jaringan Dan Imunohistokimia*. Jakarta: Sagung Seto.
- Sudarsono, Ratnawati dan Budiwati. 2003. *Taksonomi Tumbuhan Tinggi*. Yogyakarta: Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta.
- Soeripto. 2007. *Gastro-intestinal Cancer in Indonesia*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. [Serial On Line] 2003; Vol. 4, No. 4, [http://www.apocp.org/cancer\\_download/Vol4\\_No4/Soeripto.pdf](http://www.apocp.org/cancer_download/Vol4_No4/Soeripto.pdf). (diakses 4 Desember 2010).
- Sugiyono, Prof., Dr. 2009. *Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif dan R&D*. Bdanung: ALFABETA.
- Suprpto. 2001. *Bertanam Kedelai*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Tati, Suhartati, Ph.D. 2003. *Ancaman Karsinogen Disekitar Kita (Artikel)*. *Majalah Natural Edisi-9*. Lampung: FMIPA Universitas Lampung.
- Tim Pengajar Anatomi. 2001. *Situs Abdominis*. Surabaya: Laboratorium Anatomi Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Trombino, A. F., Near, R. I., Matulka, R. A., Yang, S., Hafer, L. J., Toselli, P. A., Kim, D.W., Rogers, A. E., Sonenshein, G. E., dan Sherr, D. H. 2000. *Expression of the aryl hydrocarbon receptor/transcription factor (AhR) dan AhR-regulated CYP1 gene transcripts in a rat model of mammary tumorigenesis*. Journal Breast Cancer Res Treat., 2000; 63: (117–31).

Underwood, J.C.E. 1999. *Patologi Umum dan Sistemik. Vol 1.* –Ed. 2-. Jakarta: EGC.

WHO. 2003. *Artikel mengenai Trend Dalam Pengembangan Kebijakan, Trend Dalam Pembangunan Sosial Ekonomi, Kesehatan dan Lingkungan, Sumber-Sumber Kesehatan, Pengembangan Sistem Kesehatan, Pelayanan Kesehatan, Trend Dalam Status Kesehatan, Pdanangan ke Depan*. [Serial On line]. <http://www.who.or.id/ind/products/ow6/sub2/display.asp?id=1> . (diakses 10 Desember 2010)

WHO. 2006. *The Impact of Cancer*. [Serial On Line]. [http://www.who.int/ncd\\_surveillance/infobase/web/InfoBasePolicyMaker/reports/ReporterFullView.aspx?id=5](http://www.who.int/ncd_surveillance/infobase/web/InfoBasePolicyMaker/reports/ReporterFullView.aspx?id=5). (diakses 8 Desember 2010).

William, Yohannes P. 2005. *Pengaruh Pemberian Diet Selulosa Terhadap Gambaran Histopatologik Limpa Tikus Wistar yang Diinduksi Karsinogenesis Kolon (Penelitian Eksperimental Laboratorik pada Wistar yang Diinduksi 1, 2 Dimetilhidrazin Subkutan plus Diet Tinggi Lemak dan Tinggi Protein)*. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

Williams, L.S., dan Hopper, P.D. 2003. *Understaning medical-surgical nursing, second edition*. Philadelphia: F.A. Davis Company.

Yiwei Li, Upadhyay Sunil, Bhuiyan Mahbubur dan Sarkar H Fazlul. 1999. *Induksi Apoptosis pada Sel Kanker Payudara MDA-MB-231 oleh Genistein*. Departemen Patologi, Karmanos Institut Kanker di Wayne State University School of Medicine, Detroit Michigan, USA.

## LAMPIRAN A. PROSEDUR PENGUJIAN TUNEL

For research use only

### **Apo-BrdU-IHC™ In Situ DNA Fragmentation Assay Kit**

#### **Protocols : Staining of Paraffin Embedded Tissue (PET)**

##### **PET A. Deparaffinization and Rehydration**

1. Immerse slides in xylene for 5 minutes at room temperature. Repeat using fresh xylene for second 5 minutes incubation.
2. Immerse slides in 100% ethanol for 5 minutes at room temperature. Repeat using fresh 100% ethanol for second 5 minutes.
3. Immerse slides in 90% ethanol for 3 min. then 80 % ethanol for 3 min. and then 70% ethanol for 3 minutes at room temperature
4. Immerse slides briefly into 1x PBS and carefully dry the glass slide around the specimen.

##### **PET B. Permeabilization, Inactivation of Endogenous Peroxidase, & Equilibration.**

5. Dilute only enough Proteinase K (pink cap) needed 1: 100 in 10 mM Tris pH 8. Cover the entire specimen with 100µl proteinase K. incubate at room temperature for 20 minutes. **DO NOT OVER INCUBATE.**
6. Rinse slide with 1x PBS. Gently tap off excess liquid and carefully dry the glass slide around the specimen.
7. Dilute 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1:10 in methanol. Cover the entire specimen with 100 µl of 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Incubate at room temperature for 5 minutes **DO NOT OVER INCUBATE.**

*Bio Vision, inc., 980 Linda Vista Avenue, Mountain View, CA 95043 USA.*

[www.biovision.com](http://www.biovision.com)



8. Rinse slide with 1X PBS. Gently tap off excess liquid and carefully dry the glass slide around the specimen.
9. Dilute only enough 5X Reaction Buffer (green cap) as needed 1:5 with dH<sub>2</sub>O. cover the entire specimen with 100 µl of the 1X Reaction Buffer. Incubate at room temperature for 10 to 30 minutes while preparing the labeling reaction mixture below.

### **PET C. End Labeling Reaction and Detection**

10. Prepare the complete labelling reaction mixture as follows (Note:mix only enough DNA Labeling Solution to complete the assay prepared per session. The DNA labeling Solution is active for approximately 24 hours)
11. Carefully blot the 1X reaction buffer from the specimen, taking care not to touch the specimen . immediately apply 50 µl. Completely labeling reaction mixture (prepared above) onto each specimen except for the control slides which require only µl each.
12. Cover the specimen with a piece of parafilm cut slightly larger than the specimen. Place slides in a humid chamber and incubate at 37<sup>0</sup>C for 1 to 1,5 hours.
13. Remove parafilm cover slip and rinse slide with PBS. Gently tap off excess liquid and carefully dry the glass around specimen
14. Cover the entire specimen with 100 µl of blocking buffer (white cap). Incubate at room temperature for 10 minutes. Carefully blot the blocking buffer from the specimen, taking care not to touch the specimen.
15. Immediately cover specimen with 100 µl of antibody solution.
16. Incubate with the antibody solution in the dark for 1-1,5 hours at room temperature.

17. Rinse slide in PBS. Gently tap off excess liquid and carefully dry the glass around the specimen. Cover the entire specimen with 100  $\mu$ l of blocking Buffer (white cap).
18. Dilute only enough of the 200X Conjugate (black cap) needed 1:200 in Blocking Buffer.
19. Carefully blot the blocking Buffer from the specimen, taking care not to touch the specimen. Immediately apply 100  $\mu$ l of dilute conjugate to the specimen. Incubate at room temperature for 30 minutes.
20. Five minutes before concluding incubation prepare DAB solution by dissolving one tablet of DAB (amber vial) and one tablet of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/urea (amber vial) in one ml of tap H<sub>2</sub>O. this yields enough DAB solution for 10 specimens.
21. Rinse slides with 1X PBS. Gently tap off liquid and carefully dry the glass slide around the specimen. Cover the entire specimen with 100  $\mu$ l of DAB Solution. Incubate at room temperature for 15 minutes. Rinse slide with H<sub>2</sub>O and blot.

#### **PET D. Counterstain**

22. Immediately cover the entire specimen with 100  $\mu$ l of Methyl Green Counterstain (natural cap) solution. Incubate at room temperature for 3 minutes. Press edge of the slide against an absorbent towel to draw off most the counterstain and place in a coplin jar slide holder.
23. Blot slides briefly on an absorbent towel. Dip slides into xylene. Wipe excess xylene from back of slide and around specimen.
24. Mounts a glass slip using a mounting media such as permount (r) over the specimen.

LAMPIRAN B. Nilai Rata-Rata (Mean) Jumlah Apoptosis Sel Kolon Tikus pada Sepuluh Lapang Pandang

Kelompok	Tikus	Lapang Pandang										Mean
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
<b>1</b>	1	3	4	6	3	7	3	5	3	3	3	4
	2	1	2	2	2	2	3	2	3	1	2	2
	3	2	2	2	2	3	4	1	1	1	2	2
	4	5	3	3	3	4	4	4	7	8	9	5
	5	6	7	6	7	6	7	4	3	2	2	5
	6	1	2	1	2	1	2	4	5	6	6	3
<b>2</b>	1	7	7	11	13	11	8	8	8	9	8	9
	2	3	6	7	5	7	8	3	4	4	3	5
	3	7	1	3	1	3	1	1	1	1	1	2
	4	12	12	13	14	11	7	8	8	8	7	10
	5	5	3	5	4	5	3	1	1	2	1	3
	6	2	1	5	6	5	7	2	4	4	4	4
<b>3</b>	1	3	4	5	5	1	2	1	2	4	3	3
	2	7	8	9	2	3	4	6	9	8	4	6
	3	12	13	12	13	14	10	9	9	9	9	11
	4	15	12	13	14	10	10	9	13	12	12	12
	5	17	13	12	15	15	16	12	15	10	15	14
	6	12	10	6	10	9	10	8	9	7	9	9
<b>4</b>	1	47	45	50	51	43	58	45	41	40	50	47
	2	35	36	40	31	29	25	29	28	29	28	31
	3	30	30	32	26	27	25	24	26	29	31	28
	4	35	37	38	49	45	35	40	45	38	38	40
	5	30	30	37	34	38	42	36	38	39	36	36
	6	28	34	35	29	30	33	32	35	32	32	32
<b>5</b>	1	67	66	67	68	69	71	56	57	60	79	66
	2	80	89	88	70	75	78	77	77	78	78	79
	3	69	78	77	75	57	56	67	70	71	60	68
	4	76	78	78	77	67	69	68	66	68	73	72
	5	89	94	99	79	89	99	101	99	98	93	94
	6	67	68	57	45	44	47	49	47	53	53	53

LAMPIRAN C. HASIL UJI STATISTIK

**Uji Normalitas Data**

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

	kelompok	jumlah apoptosis
N	30	30
Normal Parameters(a,b)	Mean	25.17
	Std. Deviation	27.435
Most Extreme Differences	Absolute	.258
	Positive	.258
	Negative	-.199
Kolmogorov-Smirnov Z	.857	1.413
Asymp. Sig. (2-tailed)	.454	.037

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

**ONE WAY ANOVA**

**Descriptives**

jumlah apoptosis

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
kelompok kontrol negatif	6	3.50	1.378	.563	2.05	4.95
kelompok kontrol positif	6	5.50	3.271	1.335	2.07	8.93
kelompok perlakuan I	6	9.17	4.070	1.662	4.90	13.44
kelompok perlakuan II	6	35.67	6.947	2.836	28.38	42.96
kelompok perlakuan III	6	72.00	13.755	5.615	57.57	86.43
Total	30	25.17	27.435	5.009	14.92	35.41

**Test of Homogeneity of Variances**

jumlah apoptosis

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.330	4	25	.026

## ANOVA

jumlah apoptosis

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	20495.000	4	5123.750	96.082	.000
Within Groups	1333.167	25	53.327		
Total	21828.167	29			

## Post Hoc Tests

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: jumlah apoptosis

	(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Sig.
Tukey HSD	kelompok kontrol negatif	kelompok kontrol positif	-2.00	.989
		kelompok perlakuan I	-5.67	.667
		kelompok perlakuan II	-32.17(*)	.000
		kelompok perlakuan III	-68.50(*)	.000
	kelompok kontrol positif	kelompok kontrol negatif	2.00	.989
		kelompok perlakuan I	-3.67	.905
		kelompok perlakuan II	-30.17(*)	.000
		kelompok perlakuan III	-66.50(*)	.000
	kelompok perlakuan I	kelompok kontrol negatif	5.67	.667
		kelompok kontrol positif	3.67	.905
		kelompok perlakuan II	-26.50(*)	.000
		kelompok perlakuan III	-62.83(*)	.000
kelompok perlakuan II	kelompok kontrol negatif	32.17(*)	.000	
	kelompok kontrol positif	30.17(*)	.000	
	kelompok perlakuan I	26.50(*)	.000	
	kelompok perlakuan III	-36.33(*)	.000	
kelompok perlakuan III	kelompok kontrol negatif	68.50(*)	.000	
	kelompok kontrol positif	66.50(*)	.000	
	kelompok perlakuan I	62.83(*)	.000	
	kelompok perlakuan II	36.33(*)	.000	

\* The mean difference is significant at the .01 level.

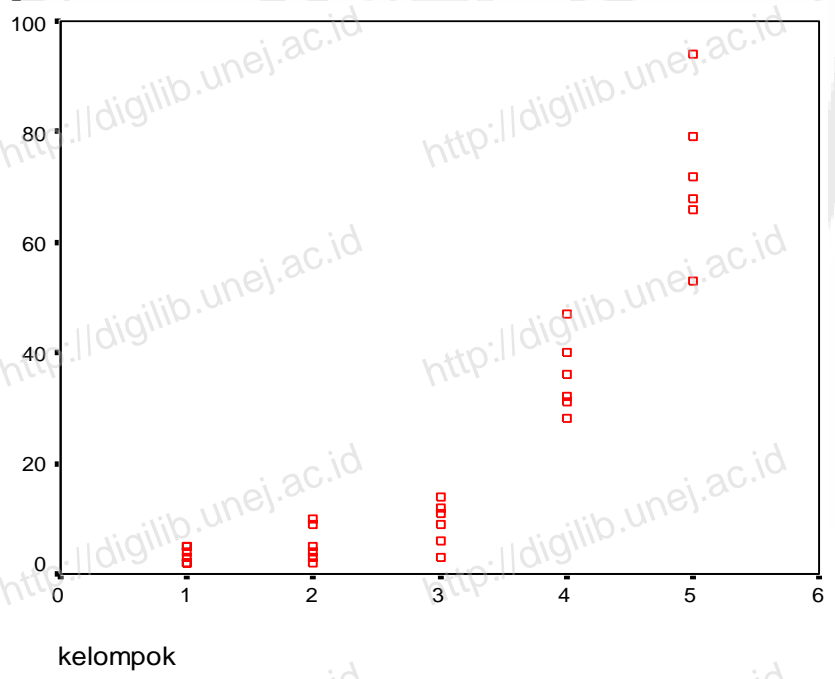
**Homogeneous Subsets**

jumlah apoptosis

	kelompok	N	Subset for alpha = .01		
			1	2	3
Tukey HSD(a)	kelompok kontrol negatif	6	3.50		
	kelompok kontrol positif	6	5.50		
	kelompok perlakuan I	6	9.17		
	kelompok perlakuan II	6		35.67	
	kelompok perlakuan III	6			72.00
	Sig.			.667	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
 a Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

**Plot Data Variabel X (kelompok perlakuan) dan Variabel Y (Jumlah Apoptosis)**



LAMPIRAN D. DOKUMENTASI PENELITIAN



Tempat Penelitian



Alat dan Bahan Penelitian



Hewan Coba



Kandang Hewan Coba



Induksi DMBA



Pemberian Ekstrak Kedelai



Penimbangan Berat Badan



Palpasi



Pembedahan Tikus



Pengambilan Organ Kolon

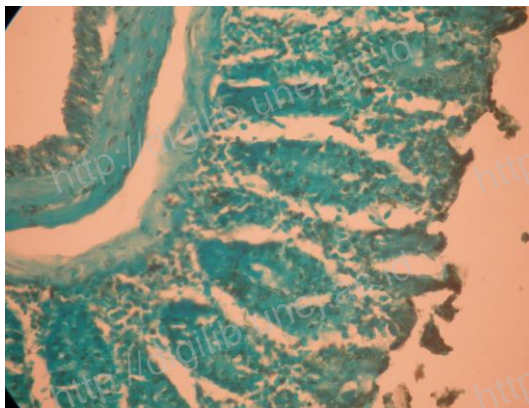


Preparat Kolon Tikus

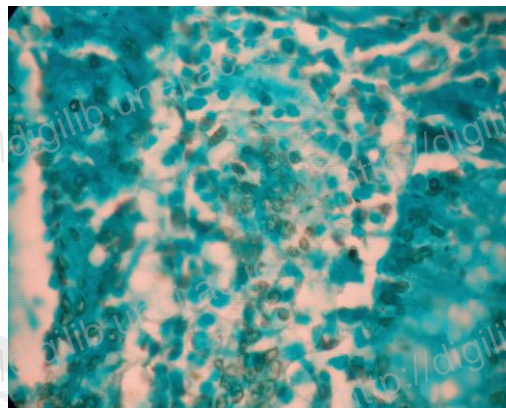


TUNEL Assay Kit





Gambaran Mikroskopik Preparat Hasil Uji TUNEL Pembesaran 400x



Gambaran Mikroskopik Preparat Hasil Uji TUNEL Pembesaran 1000x

