

FF  
FKA  
TKD 35/11  
Siregar

## TESIS

**EFEK ASAM BUTIRAT SEBAGAI HASIL FERMENTASI KARBOHIDRAT  
OLEH MIKROFLORA KOLON TERHADAP EKSPRESI P53 DAN  
APOPTOSIS PADA SEL EPITEL KOLON MENCIT Balb/c JANTAN  
SETELAH DIINDUKSI 9,10-dimethyl-1,2-benz(a)anthracene (DMBA)**



**Cherry Siregar  
090710001 M**

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

**PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2009**

**EFEK ASAM BUTIRAT SEBAGAI HASIL FERMENTASI KARBOHIDRAT  
OLEH MIKROFLORA KOLON TERHADAP EKSPRESI P53 DAN  
APOPTOSIS PADA SEL EPITEL KOLON MENCIT Balb/c JANTAN  
SETELAH DIINDUKSI 9,10-dimethyl-1,2-benz(a)anthracene (DMBA)**

**TESIS**

**Untuk memperoleh Gelar Magister  
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar  
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

**Oleh :**

**Cherry Siregar  
090710001 M**

**PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2009**

Lembar pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI  
TANGGAL 14 JULI 2009

Oleh

Pembimbing Ketua



Dr H Eddy Bagus Wasito dr, MS, SpMK  
NIP 130 676 011

Pembimbing



Dr I Ketut Sudiana, drs, MS  
NIP 130 877 636

Mengetahui  
Ketua Program Studi


Prof. Retno Handajani dr, MS, PhD  
NIP 130 541 984

Telah diuji pada  
Tanggal 14 Juli 2009  
PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : dr Budiono, Mkes

Anggota : 1. Dr H Eddy Bagus Wasito dr, MS, SpMK  
2. Dr I Ketut Suidiana, drs, MS  
3. dr Edhi Rianto, MS  
4. dr Troef Soemarno, MS, SpPA(K)  
5. dr Mohammad Hanafi, MBBS, MS

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur yang tak terhingga saya panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah berkenan melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis ini dengan sebaik-baiknya. Tesis ini merupakan bagian akhir dari seluruh rangkaian kegiatan pendidikan Magister Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar, Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Terimakasih sebesar-besarnya dan penghargaan setinggi-tingginya saya saya sampaikan dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati yang paling dalam kepada :

H. Eddy Bagus Wasito dr, MS, SpMK, sebagai pembimbing ketua, yang telah penuh perhatian memberikan dorongan, arahan, masukan dan bimbingan sejak penulisan proposal hingga akhir penulisan tesis ini; beserta dosen dan staf.

Dr I Ketut Sudiana, drs, MS, juga sebagai pembimbing yang dengan penuh kesabaran telah banyak memberikan bimbingan, arahan, dan motivasi sehingga saya dapat menyelesaikan tesis dengan sebaik-baiknya.

Prof Dr Fasichul Lisan Apt, selaku Rektor Universitas Airlangga Surabaya; Prof Dr Muhammad Amin dr, SpP(K), selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya; Prof Dr Harjanto JM dr, AIF, selaku Ketua Tim Koordinasi Program Studi Magister (TKPSM) Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya; Prof Retno Handajani dr, MS, PhD, selaku Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar (IKD) Fakultas Kedokteran Unair Surabaya; Setio Harsono dr, MS, SpMK, selaku Ketua Departemen Mikrobiologi FK Unair Surabaya dan Tim Penguji Tesis yang telah memberikan masukan bagi perbaikan tesis ini.

Teman-teman seangkatan ilmu kedokteran dasar, minat studi mikrobiologi kedokteran ( Sulistiastratik, dra; Kuswiyanto SSi, Mkes; Narwati SSi, Mkes; Agrijanti SPd; Ali Sodhikin, dr ; Ratna Wahyuni SSi), yang telah menjadi sahabat dan saudara selama menempuh pendidikan, yang banyak memberikan bantuan dan dorongan pada penyelesaian tesis ini. Semoga persahabatan kita tetap terjaga.

Binti Yunariyah, Skep.Ns dan drg Sarianofermi, terimakasih telah menjadi teman berbagi pengadaan bahan penelitian dan dukungannya untuk menyelesaikan penelitian ini.

Bapak Heri di Unit Hewan Coba Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran UNAIR, yang telah banyak membantu saya pada saat melakukan perlakuan terhadap hewan coba.

Bapak Eko di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo, yang telah membantu saya dalam pembuatan sediaan blok parafin.

Leny, Amd di Laboratorium Patobiologi - Gramik Fakultas Kedokteran UNAIR, yang telah membantu pengerjaan pewarnaan imunohistokimia dan TUNNEL assay.

Kepada kedua orang tua saya tercinta, drs Rahim Siregar, MA dan Chairani Harahap yang dengan penuh kasih sayang dan kesabaran, membesarkan dan mendidik saya serta selalu memberikan dorongan dan dukungan kepada saya agar terus menuntut ilmu. Juga semua doa yang papa mama berikan kepada saya sehingga saya dapat menyelesaikan pendidikan ini.

Kepada kedua mertua saya, A.Gani (alm) dan Asmahwati Ibrahim, terimakasih atas segala dukungan dan doanya kepada saya selama ini.

Kepada kakak dan adik-adik saya, Kel. Irvan Siregar, SE; Julianta Siregar, ST; Kel.Andi Siregar Ssos,MSp; Dicky Zikrika Siregar, SE; Faradilla Savitri Siregar, terima kasih atas segala kasih sayang, bantuan dan perhatiannya selama saya menempuh pendidikan.

Untuk Suami tercinta, dr Zainal Safri, SpPD yang dengan kesabarannya selalu mendorong saya untuk tetap menyelesaikan pendidikan disaat saya merasa tidak mampu, menjadi teman diskusi disaat saya mengalami kesulitan. Kepada kedua anak ku tersayang, Rayhan Maulana Ryzan dan Haikal Hamdi Ryzan, terimakasih telah menemani selama menempuh pendidikan, menjadi pelipur lara disaat letih, dan juga atas pengorbanannya berpisah sementara dengan kedua orang tua, maafkan jika waktu bersama menjadi terbatas selama menempuh pendidikan ini. Semoga semua perjalanan hidup dan pengorbanan ini menjadi jalan menuju kehidupan yang lebih baik. Amin.

Seluruh pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu, namun tanpa bantuan mereka, penelitian ini tidak akan berjalan dengan baik.

Akhirul kalam, izinkan saya menyampaikan permohonan maaf yang sebesar-besarnya atas segala sesuatu yang kurang berkenan selama saya menempuh pendidikan ini. Semoga Allah SWT melimpahkan rahmat dan karunia-Nya bagi kita semua. Amin

Surabaya, Juli 2009  
Penulis

## RINGKASAN

### Efek Asam Butirat Sebagai Hasil Fermentasi Karbohidrat Oleh Mikroflora Kolon Terhadap Ekspresi p53 dan Apoptosis Pada Sel Epitel Kolon Mencit Balb/C Jantan Setelah Diinduksi 9,10-dimethyl-1,2-benz(a)anthracene (DMBA)

Kanker kolorektal merupakan salah satu kanker yang sering terjadi diseluruh dunia, menempati urutan keempat penyebab kematian yang disebabkan kanker. Pencegahan serta deteksi dini sangat penting dalam upaya menurunkan angka morbiditas dan mortalitas kanker kolorektal.

Butirat merupakan hasil akhir fermentasi karbohidrat oleh bakteri an-aerob di kolon manusia yang memiliki efek protektif terhadap terjadinya karsinogenesis kolon melalui kemampuannya sebagai antiproliferatif sel dan rangsangan apoptosis sel yang dihubungkan dengan kemampuan menginduksi hiperasetilasi histon. Namun efek proteksi butirat terhadap kanker kolon melalui penurunan ekspresi protein p53 mutan belum jelas diketahui.

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efek proteksi butirat terhadap ekspresi protein p53 mutan sel epitel kolon mencit dan apoptosis sel epitel kolon mencit setelah diinduksi DMBA.

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental sesungguhnya (*true experimental*) menggunakan hewan coba mencit (*Mus musculus*) strain Swiss Webster (Balb/c) jantan berumur 12 minggu, berat badan 25-35 gram; terbagi menjadi tiga kelompok masing-masing 9 ekor mencit. Kelompok perlakuan 1 tanpa diberi butirat dan tanpa diberi DMBA. Kelompok perlakuan 2 tanpa diberi butirat namun diberi DMBA dengan dosis 10 mg/ 100 g berat badan. Kelompok perlakuan 3 diberi butirat dengan dosis 2,5 g / kg BB selama 14 hari kemudian pada hari ke 15 diberi DMBA dengan dosis 10 mg/ 100 g berat badan. Pada hari ke 20 mencit dimatikan dan diambil jaringan kolonnya untuk dibuat parafin blok kemudian dilakukan pewarnaan Immunohistokimia untuk menilai ekspresi p53 mutan dan Tunel *assay* untuk deteksi sel epitel kolon yang mengalami apoptosis.

Data penelitian yang berdistribusi normal dianalisis dengan uji *one way* Anova, jika terdapat perbedaan yang bermakna dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*) dengan  $\alpha = 0,05$ ; sedangkan data yang tidak berdistribusi normal dianalisis dengan uji *Kruskal-Wallis* dan jika terdapat perbedaan yang bermakna dilanjutkan uji *Mann-Whitney* dengan  $\alpha = 0,05$ .

Hasil analisis *Kruskal-Wallis* dan uji *Mann-Whitney* data protein p53 mutan didapati jumlah sel epitel kolon yang mengekspresikan p53 mutan pada kelompok yang diberi butirat dan diberi DMBA lebih sedikit daripada kelompok perlakuan yang tidak diberi butirat namun diberi DMBA ( $p < 0,05$ ). Hasil uji *oneway* Anova untuk data apoptosis menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan jumlah sel yang mengalami apoptosis pada semua kelompok perlakuan ( $p > 0,05$ ).

Kesimpulan penelitian ini adalah butirat memiliki efek protektif terhadap karsinogenesis kolon melalui hambatan terhadap ekspresi p53 mutan pada sel epitel kolon yang diinduksi DMBA tanpa peningkatan apoptosis sel.

## SUMMARY

### **Effect of Butyric Acid as a Result of Carbohydrate Fermentation by Colon Microflora on p53 Expression and Apoptosis in Colon Epithelial Cells in Male Balb/C Mice after Induction with 9,10-dimethyl-1,2-benz(a)anthracene (DMBA)**

Colorectal cancer is one of the malignancies commonly found in the world, occupying the fourth rank of death resulting from cancer. Early prevention and detection is highly important in order to reduce the morbidity and mortality rate of colorectal cancer. Butyric is the end result of carbohydrate fermentation by anaerobic bacteria in human colon. It has protective effect on the occurrence of colon carcinogenesis by its ability as cell antiproliferation and cell apoptotic stimulation that is correlated with its ability to induce histone hyperacetylation. However, the protective effect of butyric on colon cancer through the reduction of mutant p53 protein expression remains unclear. The objective of this study was to prove the effect of protective effect of butyric acid on the expression of mutant p53 protein of mice colon epithelial cells and the apoptosis of mice colon epithelial cells after being induced with DMBA.

This was a true experimental study using male Swiss Webster (Balb/c) strain mice (*Mus musculus*) aged 12 weeks with body weight of 25-35 grams. The animals were divided into three groups, each comprising 9 mice. Treatment group 1 received no butyric and no DMBA. Treatment group 2 did not receive butyric but receiving DMBA in a dose of 10 mg/100 g body weight. Treatment group 3 received butyric in a dose of 2.5 g/kg body weight for 14 days, and on day 15 the group received DMBA in a dose of 10 mg/100 g body weight. On day 20 the mice were sacrificed and their colon tissues were taken for paraffin blocks and immunohistochemical staining was performed to assess the mutant p53 expression and Tunel assay was also performed to detect apoptotic colon epithelial cells.

Research data with normal distribution were analyzed with one-way Anova. If significant difference was found, it was followed-up with LSD (Least Significant Difference) with  $\alpha = 0.05$ . Data with no normal distribution were analyzed with Kruskal-Wallis test, and if significant difference was found, it was followed-up with Mann-Whitney test with  $\alpha = 0.05$ .

The result of Kruskal-Wallis and Mann-Whitney analysis of mutant p53 protein revealed that colon epithelial cells expressing mutant p53 in group receiving butyric and receiving DMBA was lower than that in treatment group receiving no butyric but receiving DMBA ( $p < 0.05$ ). The result of one-way Anova for apoptosis data showed that there was no difference in apoptotic cell count in all treatment groups ( $p > 0.05$ ).

In conclusion, butyric has protective effect on colon carcinogenesis through the inhibition of mutant p53 expression in DMBA-induced colon epithelial cells without the increase of cell apoptosis.



**ABSTRACT****Effect of Butyric Acid as a Result of Carbohydrate Fermentation by Colon Microflora on p53 Expression and Apoptosis in Colon Epithelial Cells in Male Balb/C Mice after Induction with 9,10-dimethyl-1,2-benz(a)anthracene (DMBA)**

The objective of this study was to prove the protective effect of butyric acid on the expression of mutant p53 protein of mice colon epithelial cells and the apoptosis of mice colon epithelial cells after being induced with DMBA.

This was a true experimental study using male Swiss Webster (Balb/c) strain mice (*Mus musculus*) aged 12 weeks with body weight of 25-35 grams. The animals were divided into three groups, each comprising 9 mice. Treatment group 1 received no butyric and no DMBA. Treatment group 2 did not receive butyric but receiving DMBA in a dose of 10 mg/100 g body weight. Treatment group 3 received butyric in a dose of 2.5 g/kg body weight for 14 days, and on day 15 the group received DMBA in a dose of 10 mg/100 g body weight. On day 20 the mice were sacrificed and their colon tissues were taken for paraffin blocks and immunohistochemical staining was performed to assess the mutant p53 expression and TUNEL assay was also performed to detect apoptotic colon epithelial cells.

Research data with normal distribution were analyzed with one-way Anova. If significant difference was found, it was followed-up with LSD (Least Significant Difference) with  $\alpha = 0.05$ . Data with no normal distribution were analyzed with Kruskal-Wallis test, and if significant difference was found, it was followed-up with Mann-Whitney test with  $\alpha = 0.05$ .

The result of Kruskal-Wallis and Mann-Whitney analysis of mutant p53 protein revealed that colon epithelial cells expressing mutant p53 in group receiving butyric and receiving DMBA was lower than that in treatment group receiving no butyric but receiving DMBA ( $p < 0.05$ ). The result of one-way Anova for apoptosis data showed that there was no difference in apoptotic cell count in all treatment groups ( $p > 0.05$ ).

In conclusion, butyric has protective effect on colon carcinogenesis through the inhibition of mutant p53 expression in DMBA-induced colon epithelial cells without the increase of cell apoptosis.

**Keywords :** butyric, DMBA, p53 mutant inhibition

## DAFTAR ISI

Sampul Depan .....	i
Sampul Dalam .....	ii
Prasyarat Gelar .....	iii
Persetujuan .....	iv
Penetapan Panitia .....	v
Ucapan terima kasih .....	vi
Ringkasan.....	viii
Summary .....	ix
Abstract .....	x
DAFTAR ISI .....	xi
DAFTAR TABEL .....	xii
DAFTAR GAMBAR .....	xiv
DAFTAR SINGKATAN .....	xv
BAB 1 PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang Masalah .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	5
1.3 Tujuan Penelitian .....	6
1.4 Manfaat Penelitian .....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1 Tinjauan tentang Mikroflora Kolon.....	8
2.1.1 Komposisi mikroflora kolon.....	8
2.1.2 Karakteristik fermentasi karbohidrat di kolon.....	11
2.2 Tinjauan tentang Asam butirat.....	14
2.2.1 Efek metabolik asam butirat di kolon.....	14
2.2.2 Efek asam butirat terhadap kanker kolon.....	15
2.3 Anatomi dan Fisiologi Kolon.....	17
2.4 Tinjauan tentang Karsinogenesis.....	19
2.4.1 Dasar molekular karsinogenesis.....	19
2.4.2 Karsinogenesis kolon.....	20
2.4.3 Tinjauan tentang gen p53.....	22
2.4.4 Tinjauan tentang apoptosis.....	24
2.5 Tinjauan tentang Dimethyl-1,2-benz(a)anthracene.....	25
2.6 Imunohistokimia.....	26
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS.....	28
3.1 Kerangka Konseptual .....	28
3.2 Hipotesis .....	30

BAB 4	METODE PENELITIAN .....	31
4.1	Jenis dan Rancangan Penelitian .....	31
4.2	Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel.....	32
4.3	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional .....	33
4.3.1	Klasifikasi variabel .....	33
4.3.2	Definisi operasional variabel.....	33
4.4	Bahan Penelitian .....	34
4.5	Instrumen Penelitian .....	34
4.6	Lokasi dan Waktu Penelitian .....	35
4.7	Prosedur Pengumpulan Data .....	35
4.8	Analisa Data .....	37
4.9	Kerangka Operasional Penelitian .....	38
BAB 5	HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN.....	39
5.1	Berat Badan Mencit Balb/c Jantan.....	39
5.2	Hasil Pemeriksaan Imunohistokimia Sel Epitel yang Mengekspresikan p53 mutan Pada Kolon Mencit Balb/c Jantan.....	40
5.3	Hasil Pemeriksaan Sel Epitel yang Mengalami Apoptosis Pada Kolon Mencit Balb/c Jantan.....	42
5.4	Hasil Pewarnaan Imunohistokimia serta TUNEL <i>assay</i> .....	44
BAB 6	PEMBAHASAN .....	48
BAB 7	PENUTUP.....	57
7.1	Kesimpulan .....	57
7.2	Saran .....	58

Daftar Pustaka

Lampiran

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
Tabel 5.1 : Rerata dan SD berat badan mencit Balb/c jantan ( g) .....	39
Tabel 5.2 : Nilai median jumlah sel epitel yang mengekspresikan p53 mutan pada kolon mencit Balb/c jantan.....	40
Tabel 5.3 : Nilai rerata dan SD jumlah sel epitel yang mengalami apoptosis pada kolon mencit Balb/c jantan.....	43

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 : Regio kolon manusia .....	9
Gambar 2.2 : Skema umum komposisi dan efek dari mikroflora predominan di usus besar terhadap kesehatan.....	10
Gambar 2.3 : Diagram jalur utama fermentasi karbohidrat di kolon.....	13
Gambar 2.4 : Dinding kolon ( potongan melintang).....	18
Gambar 2.5 : Diagram perjalanan adenoma menjadi karsinoma kolorektal.....	22
Gambar 5.1 : Nilai median jumlah sel epitel kolon yang mengekspresikan p53 mutan pada kolon mencit Balb/c jantan.....	42
Gambar 5.2 : Nilai rerata jumlah sel epitel kolon yang mengalami apoptosis pada kolon mencit Balb/c jantan.....	40
Gambar 5.3 : Sayatan kolon mencit Balb/c jantan dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodiminoklonal P53 mutan pada kelompok perlakuan yang tidak diberi butirir dan tidak diberi DMBA (P1).....	45
Gambar 5.4 : Sayatan kolon mencit Balb/c jantan dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodiminoklonal P53 mutan pada kelompok perlakuan yang tidak diberi butirir dan diberi DMBA (P2), pembesaran 400x .....	45
Gambar 5.5 : Sayatan kolon mencit Balb/c jantan dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodiminoklonal P53 mutan pada kelompok perlakuan yang diberi butirir dan diberi DMBA (P3), pembesaran 400x.....	46
Gambar 5.6 : Hasil pewarnaan dengan TUNEL <i>assay</i> pada sayatan kolon mencit Balb/c jantan kelompok perlakuan yang tidak diberi butirir dan tidak diberi DMBA (P1), pembesaran 400x.....	46
Gambar 5.7 : Hasil pewarnaan dengan TUNEL <i>assay</i> pada sayatan kolon mencit Balb/c jantan kelompok perlakuan yang tidak diberi butirir dan diberi DMBA (P2), pembesaran 400x.....	47
Gambar 5.8 : Hasil pewarnaan dengan TUNEL <i>assay</i> pada sayatan kolon mencit Balb/c jantan kelompok perlakuan yang diberi butirir dan diberi DMBA (P3), pembesaran 400x.....	47

**DAFTAR SINGKATAN**

Apaf1	=	<i>Apopotic protease activating factor 1</i>
APC	=	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
CDK	=	<i>Cyclin Dependent protein Kinase</i>
CPK-K2	=	<i>Cystein-Protein Kinase-K2</i>
DAB	=	<i>3,3 diaminobenzidine</i>
FAP	=	<i>Familial Adenomatous Polyposis</i>
G1	=	<i>Gap 1</i>
G2	=	<i>Gap 2</i>
M	=	<i>Mitosis</i>
HNPCC	=	<i>Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer</i>
MDM2	=	<i>Murine Double Minute 2</i>
MMR	=	<i>Mismatch Repair</i>
PKC	=	<i>Protein Kinase-C</i>
S	=	<i>Sintesis</i>
DMBA	=	<i>9,10-dimethyl-1,2-benz(a)anthracene</i>
PAH	=	<i>Polycyclic Aromatic Hidrocarbon</i>
HDAC	=	<i>Histon Deacetylase</i>
GADD 45	=	<i>Growth Arrest and Damage 45</i>
TSA	=	<i>trichostatin A</i>

**BAB 1****PENDAHULUAN****1.1 Latar Belakang**

Kanker kolorektal merupakan salah satu kanker yang sering terjadi diseluruh dunia, menempati urutan keempat penyebab kematian yang disebabkan kanker (Hijova & Chmelarova, 2007). Angka kejadian kanker kolorektal di Amerika Serikat masih tinggi sekitar lebih dari 145.290 kasus baru dengan angka kematian mencapai 56.290 pada tahun 2005 serta merupakan penyebab kematian kedua terbanyak dari seluruh pasien kanker (American Cancer Society, 2005). Sedangkan di Indonesia, berdasarkan data dari Biro Registrasi Kanker Departemen Patologi Fakultas Kedokteran UNAIR Surabaya, dari tahun 2002-2005 ditemukan sekitar 146 kasus baru kanker kolorektal. Insiden kanker kolon pada beberapa kota di Indonesia seperti yang dilaporkan Soetiarto F (1996) adalah di Jogjakarta (1995) sebesar 5,5 per 100.000; di Ujung Pandang (1995) sebesar 4,31 per 100.000. Sekitar 72% kasus baru kolorektal ditemukan di kolon sedangkan 28% ditemukan di rektum. Angka insiden dan mortalitas kolorektal meningkat seiring pertambahan usia, dimana dari 91% kasus baru dan 99% kematian karena kanker kolorektal terjadi pada individu diatas usia 50 tahun dengan angka insiden 50 kali lebih tinggi pada usia 60-79 tahun dibandingkan usia dibawah 40 tahun (American Cancer Society, 2005) ; sedangkan di Indonesia, seperti yang terdapat pada laporan registrasi kanker nasional yang dikeluarkan oleh Direktorat Pelayanan Medik Departemen Kesehatan berdasarkan

data dari Bagian Patologi Anatomi Universitas Indonesia didapati usia penderita kanker kolorektal dibawah 40 tahun sekitar 35,265% (Abdullah, 2006).

Tindakan bedah serta terapi tambahan kemoterapi dan radioterapi untuk penanggulangan kanker kolon belum memberikan hasil yang memuaskan karena masih memungkinkan timbulnya rekurensi selain itu adanya efek samping yang tidak menyenangkan akibat kemoterapi dan radioterapi. Pencegahan serta deteksi dini sangat penting dalam upaya menurunkan angka morbiditas dan mortalitas kanker kolorektal (Liong, 2008). Insiden kanker kolorektal yang tinggi dihubungkan dengan kebiasaan makan makanan rendah serat dan hal ini didukung oleh beberapa penelitian epidemiologi yang melaporkan bahwa pola diet tinggi lemak dan protein serta rendah serat merupakan salah satu faktor risiko terjadinya kanker kolon (Haskell, 2001; Hinnebusch *et al.*, 2002).

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk menemukan bahan kemoprotektif terhadap kanker kolorektal serta melakukan intervensi diet dengan harapan dapat menurunkan insiden kanker kolorektal serta angka kematian akibat kanker kolorektal. Probiotik memiliki efek protektif terhadap terjadinya kanker kolon seperti yang dilaporkan oleh Singh *et al* (1997) bahwa pemberian *Bifidobacterium longum* pada tikus yang diinduksi *azoxymethane* akan menekan pertumbuhan kanker kolon. Begitu juga dengan yang dilaporkan Femia *et al* (2002) bahwa pemberian sinbiotik yaitu kombinasi *Bifidobacterium longum* dengan oligofruktosa akan menekan pertumbuhan sel kanker kolon pada tikus yang diinduksi *azoxymethane*. Intervensi diet dengan pemberian makanan tinggi selulosa pada hewan coba yang diinduksi bahan karsinogen kimiawi juga dapat meningkatkan apoptosis sel epitel kolon mencit (Mastuti G, 2004). Diet tinggi



serat ternyata berkorelasi dengan konsentrasi butirir dalam memberikan efek protektif terhadap karsinogenesis kolon tikus yang diinduksi bahan karsinogen kimiawi seperti yang dilaporkan McIntyre *et al* (1993). Hal ini mendasari penelitian selanjutnya yang difokuskan pada *Short chain fatty acid* ( SCFA ) terutama butirir yang memiliki efek proteksi terhadap terjadinya kanker kolon melalui penghambatan proliferasi sel dan rangsangan apoptosis sel ( MacFarlane & MacFarlane, 2003; Kiefer *et al.*, 2006).

Butirir adalah suatu *Short chain fatty acid* ( SCFA); merupakan hasil akhir fermentasi karbohidrat oleh bakteri an-aerob di kolon manusia (Soergel, 1994). Karbohidrat yang merupakan substrat utama fermentasi oleh bakteri di kolon adalah karbohidrat yang tidak dicerna oleh usus halus dan mencapai kolon, yaitu terutama *resistant starch*, *non-starch polysaccharides* dan *non digestible oligosaccharide* (Vernazza *et al.*, 2006). *Resistant starch* terkandung pada pisang (75%), kentang (12% ); *non-starch polysaccharides* terkandung pada pektin ( 90-95%), kulit padi ( 70%), selulosa (20%); *non digestible oligosaccharide* terkandung pada raffinosa ( Soergel, 1994). Akan tetapi produk akhir fermentasi karbohidrat di kolon bergantung kepada mikroflora kolon yang terlibat pada proses fermentasi tersebut dan hasil akhir fermentasi ini nantinya akan dikeluarkan melalui feses atau diabsorpsi dari kolon (Gibson & Roberfroid,1995; Vernazza *et al.*, 2006).

Beberapa penelitian secara invitro melaporkan butirir memiliki efek proteksi terhadap terjadinya kanker kolon melalui penghambatan proliferasi sel dan rangsangan apoptosis sel. Efek proteksi butirir terhadap kanker kolon melalui kemampuannya menghambat aktivitas enzim *histon deacetylase* (HDAC) pada

lokus gen p21 ( P21) yang menghasilkan hiperasetilasi histon terutama H3 dan H4 menyebabkan aktivasi transkripsi P21 sehingga siklus sel berhenti (Kiefer *et al.*, 2006). Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengetahui efek proteksi butirrat terhadap karsinogenesis kolon secara *in vivo* dengan menilai kemampuan butirrat dalam meningkatkan apoptosis sel epitel kolon tikus yang diinduksi bahan karsinogen kimiawi, seperti yang dilaporkan Medina *et al* (1998). Emenaker *et al* (2001) melaporkan kemampuan SCFA (asetat, propionat dan butirrat) menghambat kolon kanker invasif secara *in vitro* melalui modulasi protein proteolitik uPA (urokinase Plasminogen Activator) dan antiproteolitik TIMP-1 dan TIMP-2 (Tissue Inhibitor Matrix Metalloproteinase) sedangkan Ruemmelle *et al* (2003) melaporkan butirrat menginduksi apoptosis sel secara *in vitro* melalui peningkatan aktivitas gen apoptosis sehingga mengaktifkan jalur kaskade kaspase.

Gen p53 (P53) dikenal sebagai “*master guardian of the genom*” yaitu salah satu gen supressor tumor yang merupakan regulator proliferasi sel melalui aktivasi P21 serta pengendalian apoptosis sel melalui aktivasi BAX (Kumar, 2005; Sudiana, 2008). Pada proses perkembangan kanker kolon maka gen supresor tumor p53 merupakan gen yang mengalami mutasi pada saat transisi adenoma menjadi karsinoma (Hardy,2000; Haskell,2001). Dalam keadaan normal, protein p53 akan menghentikan siklus sel yang mengalami kerusakan DNA sehingga tidak terjadi proliferasi sel tetapi jika terjadi mutasi pada P53 maka siklus sel terus berlangsung dan sel dengan kerusakan DNA tetap bereplikasi menghasilkan sel-sel dengan kerusakan DNA (Kumar,2004; Sudiana, 2008).

Namun efek proteksi butirir terhadap kanker kolon melalui penurunan ekspresi protein p53 (p53) mutan belum jelas diketahui. Jika kita tidak mengetahui mekanisme butirir terhadap penurunan ekspresi protein p53 mutan maka mutasi P53 yang menetap akan menyebabkan sel-sel mengalami pembelahan yang cepat serta terus menerus dan berkembang menjadi sel kanker sehingga masalah kanker tidak akan terpecahkan.

Berdasarkan uraian yang telah dikemukakan maka dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh butirir terhadap penurunan ekspresi protein p53 mutan sehingga memberikan harapan pengembangan bahan ini untuk penanggulangan kanker kolon pada manusia. Akan tetapi karena tidak memungkinkan melakukan penelitian ini pada manusia maka kami menggunakan mencit sebagai hewan coba berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Mastutik G (2004).

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang diajukan adalah:

1. Apakah jumlah sel epitel yang mengekspresikan protein p53 mutan pada kolon mencit yang diberi butirir dan diinduksi 9,10-dimethyl-1,2-benz(a)anthracene (DMBA) lebih sedikit daripada jumlah sel epitel yang mengekspresikan protein p53 mutan pada kolon mencit tanpa diberi butirir namun diinduksi DMBA ?
2. Apakah jumlah sel epitel yang mengalami apoptosis pada kolon mencit yang diberi butirir dan diinduksi DMBA lebih banyak daripada jumlah sel epitel yang mengalami apoptosis pada kolon mencit tanpa diberi butirir namun diinduksi DMBA?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1 Tujuan umum:**

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk membuktikan efek proteksi butirrat terhadap ekspresi protein p53 mutan sel epitel kolon mencit dan apoptosis sel epitel kolon mencit setelah diinduksi DMBA

#### **1.3.2 Tujuan khusus:**

Tujuan khusus penelitian ini adalah :

1. Menentukan bahwa lebih sedikit jumlah sel epitel yang mengekspresikan protein p53 mutan pada kolon mencit yang diberi butirrat dan diinduksi DMBA.
2. Menentukan bahwa lebih banyak jumlah sel epitel yang mengalami apoptosis pada kolon mencit yang diberi butirrat dan diinduksi DMBA

### **1.4. Manfaat Penelitian**

#### **1.4.1 Manfaat keilmuan :**

Memberikan informasi ilmiah tentang pengaruh butirrat terhadap ekspresi protein p53 mutan dan apoptosis pada sel epitel kolon mencit setelah pemberian butirrat dan diinduksi DMBA.

#### **1.4.2 Manfaat praktis**

Memberikan dasar pengembangan penanggulangan kanker sehingga dapat menurunkan insiden kanker kolon serta peningkatan kualitas hidup individu manusia.

#### **1.4.3 Manfaat pelayanan**

Memberikan informasi tentang manfaat butirrat sebagai bahan kemopreventif yang dapat digunakan untuk mencegah karsinogenesis kolon.

## BAB 2

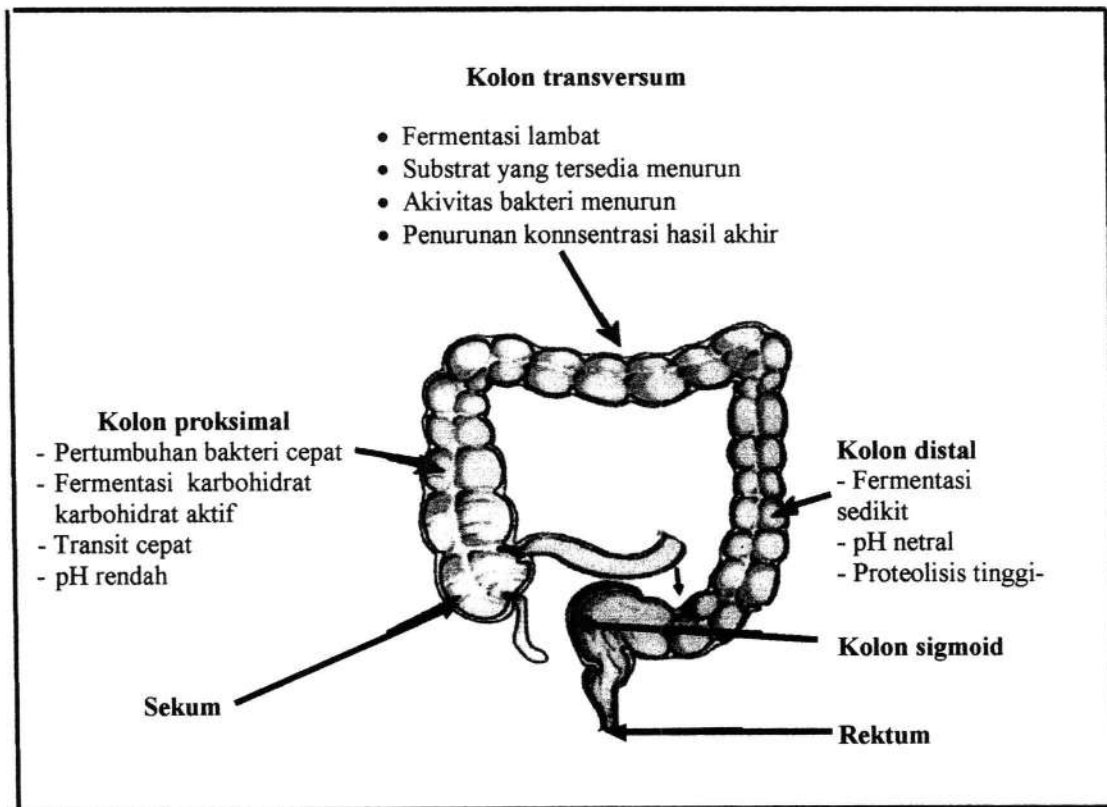
### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tinjauan tentang Mikroflora Kolon

##### 2.1.1 Komposisi mikroflora kolon

Kolon merupakan suatu ekosistem yang kompleks, paling sedikit terdapat 50 genus dan lebih dari 400 spesies bakteri (Gibson & Roberfroid, 1995; Hijova & Chmelarova, 2007). Aktivitas bakteri di kolon dipengaruhi oleh fisiologi dan struktur kolon (gambar 2.1). Pada kolon proksimal kanan, pertumbuhan mikroflora sangat cepat karena terdapat sumber nutrisi yang banyak dan terjadi penurunan pH sebagai akibat dari banyaknya SCFA yang dihasilkan; sedangkan di kolon distal kanan, mikroflora tumbuh lambat karena sumber nutrisi yang sedikit dan pH mendekati normal (Gibson & Roberfroid, 1995; Vernazza *et al*, 2006).

Populasi mikroflora di kolon manusia mencapai  $10^{10}$  -  $10^{11}$  bakteri/ gram isi (Topping & Clifton, 2001). Pada kolon orang dewasa normal, 96-99% mikroflora bakteri merupakan bakteri anaerob obligat yaitu *bacteroides sp*, *fusobacterium*, *bifidobacterium*, *clostridia* dan *streptococcus* (Brooks *et al*, 2007). *Bacteriodes* merupakan bakteri anaerob yang dominan, sekitar 30% dari keseluruhan jumlah mikroflora kolon (Topping & Clifton, 2001). Bakteri aerob fakultatif hanya sekitar 1-4% yaitu bakteri *coliform* gram negatif, *enterococcus*, *pseudomonas sp*, *lactobacillus*, dan *candida sp* (Brooks *et al*, 2007)

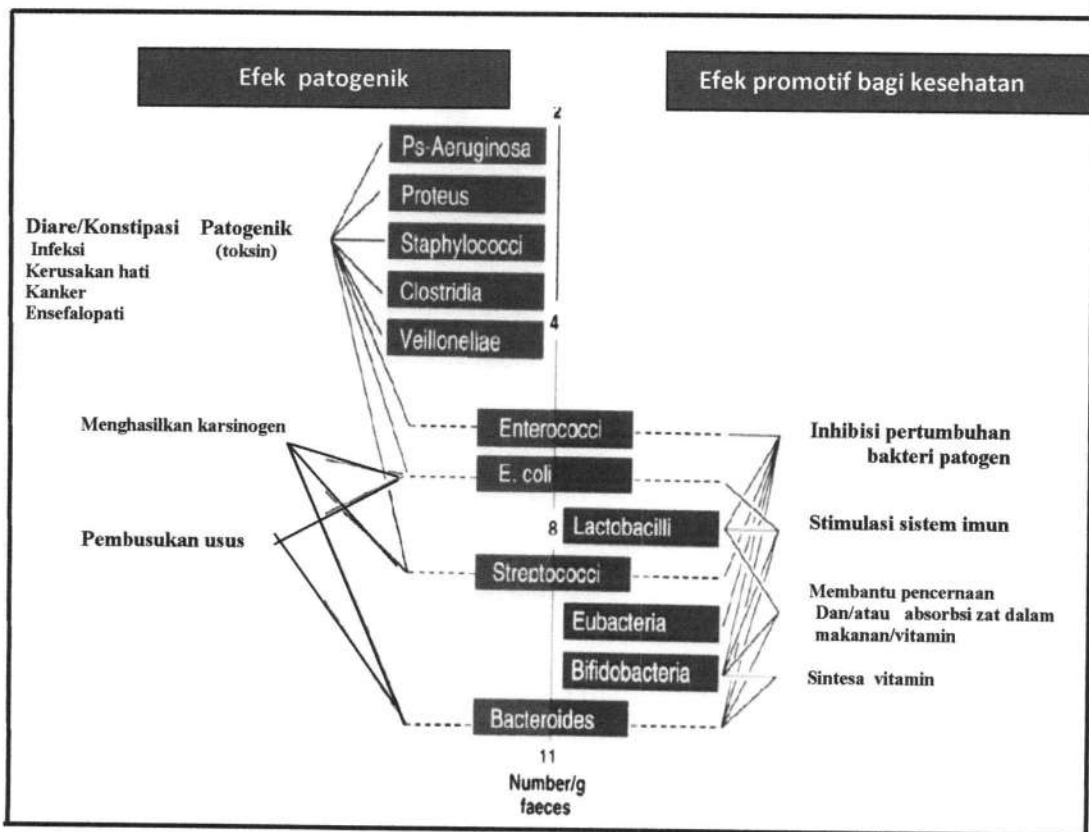


Gambar 2.1 Regio kolon manusia ( dikutip dari Vernazza *et al.*, 2006)

Kolonisasi mikroflora bergantung kepada waktu, *enterobacteria* dan *streptococcus* dominan pada hari 1-3 kelahiran sedangkan *bifidobacteria* terdapat setelah 2 hari kelahiran dan menjadi dominan pada hari ke 4-5. Kolonisasi *bifidobacteria* dominan pada bayi yang menyusui (sekitar 90 % dari total bakteri usus) (Gibson & Roberfroid, 1995; Topping & Clifton, 2001), sedangkan bayi yang mendapat susu formula memiliki mikrobiota yang kompleks yaitu *bifidobacteria*, *bacteriodes*, *clostridia* dan *streptococci*. Setelah berusia > 2 tahun akan terdapat kolonisasi mikroflora seperti flora normal dewasa (Gibson & Roberfroid, 1995).

Umumnya berbagai komponen mikroflora kolon dibagi menjadi dua jenis yaitu komponen penyebab efek patogenik berupa diare, infeksi, kerusakan hati,

karsinogenesis; dan komponen dengan potensi efek promotif bagi kesehatan yaitu hambatan pertumbuhan bakteri yang berbahaya, merangsang sistem imun, absorpsi nutrisi esensial dan sintesis beberapa vitamin (gambar 2.2) ( Gibson & Roberfroid, 1995; Vernazza *et al*, 2006 ).



Gambar 2.2 Skema umum komposisi dan efek dari mikroflora dominan di usus besar terhadap kesehatan (dikutip dari Gibson & Roberfroid, 1995)



### 2.1.2 Karakteristik fermentasi karbohidrat di kolon

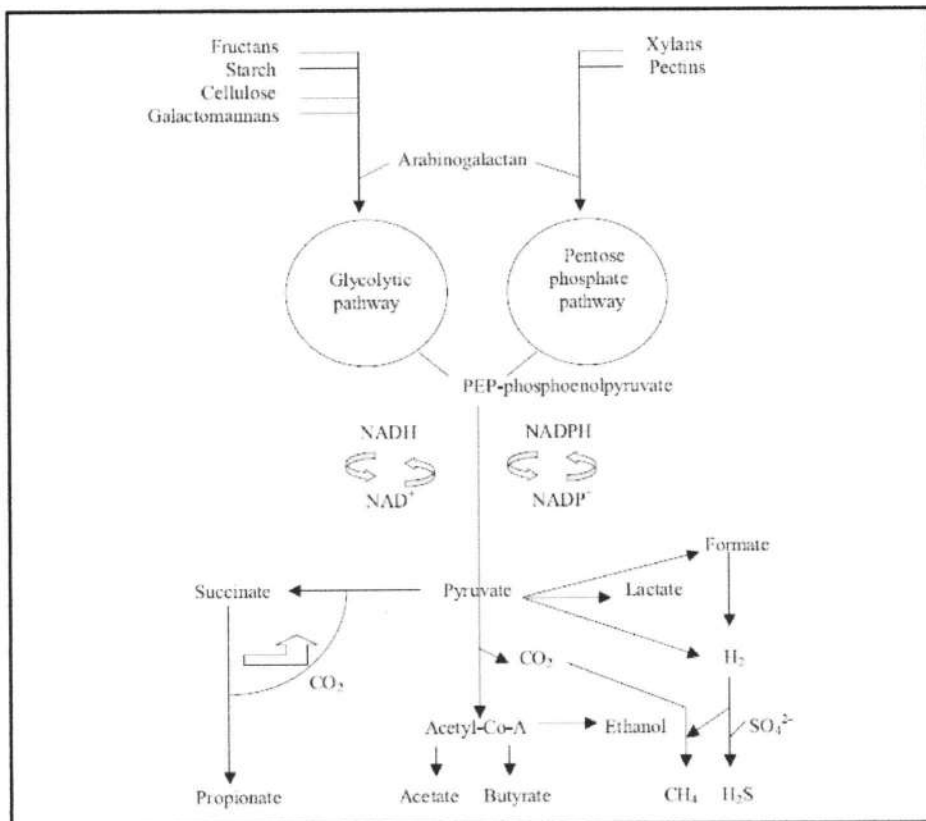
Substrat utama fermentasi oleh bakteri di kolon adalah karbohidrat yang tidak dicerna oleh usus halus dan mencapai kolon, yaitu terutama *resistant starch*, *non-starch polysaccharides* dan *non digestible oligosaccharide* (Vernazza *et al.*, 2006). Selain itu protein seperti enzim pankreas juga merupakan substrat fermentasi. Pada umumnya, gula sederhana dan *oligosaccharide* dicerna dan diabsorpsi di usus halus, akan tetapi beberapa diantaranya seperti *lactosa*, *rafinosa* dan *fructooligosaccharide* (*oligofructose* atau inulin) dapat mencapai kolon. Sumber substrat lainnya juga berasal dari host sendiri (*endogenous*) seperti glikoprotein (mucin) serta *polysaccharide* derivatif lain (*chondroitin sulfate*) (Gibson & Roberfroid, 1995; Vernazza *et al.*, 2006).

Proses fermentasi di kolon merupakan proses yang kompleks disebabkan banyaknya spesies mikroflora di kolon serta kemampuan metabolik yang berbeda. Produk akhir metabolisme yang dieksresikan satu spesies dapat dijadikan substrat fermentasi oleh spesies bakteri lainnya. *Bacteriodes*, mikroflora yang dominan di kolon adalah pengguna *polysaccharidae* sedangkan yang lainnya merupakan mikroflora *saccharolytic* di kolon yaitu *bifidobacterium*, *ruminococcus*, *eubacterium*, *lactobacillus* dan *clostridium* (Gibson & Roberfroid, 1995; Henningson *et al.*, 2001). Ekosistem kolon yang kompleks menyebabkan beberapa kelompok bakteri tidak dapat mendegradasi karbohidrat secara langsung sehingga bakteri tersebut tumbuh melalui *cross-feeding* fragmen yang dihasilkan dari degradasi primer *polysaccharide*. Mikroflora *saccharolytic* memiliki kemampuan adaptasi yang tinggi untuk tumbuh dari karbohidrat yang kompleks disebabkan mikroflora ini menghasilkan enzim *polyhidrolase* dan *glicosidase*. Walaupun

beberapa bakteri dapat mensintesis berbagai jenis enzim *saccharolytic* yang berbeda, metabolisme karbohidrat tergantung atas kerjasama berbagai enzim dengan berbagai spesies bakteri yang terlibat pada proses tersebut ( Gibson & Roberfroid., 1995).

Fermentasi karbohidrat di kolon lebih aktif pada bagian proksimal kolon karena banyaknya karbohidrat pada lokasi tersebut dan karbohidrat berkurang ketika mencapai distal kolon sehingga protein dan asam amino menjadi sumber energi metabolik bakteri di bagian distal kolon. Umumnya bakteri *saccharolytic* menggunakan jalur glikolisis Embden-Meyerhoff untuk mendapatkan energi dari karbohidrat yang diawali dengan memecah glukosa menjadi *pyruvat* dan *acetyl CoA*; kedua substrat tersebut merupakan “*key control point*” dalam fermentasi untuk menghasilkan produk yang lainnya (Gambar 2.3). Beberapa mikroflora usus menggunakan jalur pentosa fosfat sebagai jalur metabolisme alternatif atau untuk menghasilkan NADPH dan pentosa (MacFarlane & MacFarlane., 2003). Produk akhir fermentasi karbohidrat yang utama adalah SCFA (asetat, propionat, butirrat), beberapa gas (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> dan H<sub>2</sub>) dan beberapa hasil fermentasi *intermediate* yaitu etanol, laktat, suksinat, hidrogen dan pyruvat ( Gibson, 1999). Adapun reaksi kimia fermentasi anaerobik karbohidrat adalah:  $59 \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 38\text{H}_2\text{O} \rightarrow 60 \text{ CH}_3\text{COOH} + 22\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH} + 18\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 96\text{CO}_2 + 268 \text{ H}^+$  ( Topping & Clifton, 2001). Produk akhir metabolisme karbohidrat di kolon bergantung kepada mikroflora kolon yang terlibat pada proses metabolisme. Mikroflora yang terlibat untuk menghasilkan asetat adalah *bacteroides*, *bifidobacteria*, *eubacteria*, *clostridia*, *ruminococci*, *peptostreptococci*, *propionibacteria*, dan *fusobacteria*. Propionat dihasilkan oleh *bacteroides*,

*propionibacteria*, *clostridia* sedangkan butirir oleh *clostridia*, *fusobacteria*, *eubacteria*, *peptococci* (Vernazza *et al.*, 2006). Dan berdasarkan analisis phylogenetik ditemukan mikroflora utama yang menghasilkan butirir adalah *Faecalibacterium prausnitzii* yang termasuk kelompok *Clostridium leptum* dan *Eubacterium rectale/Roseburia sp* yang termasuk kelompok *Clostridium coccoides*. *Faecalibacterium prausnitzii* dan *Eubacterium rectale/Roseburia sp* didapati sekitar 5-10% dari total bakteri yang terdapat pada feses manusia (Louis & Flint, 2009). Hasil akhir fermentasi ini nantinya akan dikeluarkan melalui feses atau diabsorpsi dari kolon (Gibson & Roberfroid, 1995).



Gambar 2.3. Diagram jalur utama fermentasi karbohidrat di kolon (Dikutip dari McFarlane & McFarlane, 2003)

## 2.2 Tinjauan tentang Asam Butirat

### 2.2.1 Efek metabolik asam butirat di kolon

Asam butirat adalah suatu kelompok SCFA yaitu asam lemak organik dengan 2-6 atom karbon; merupakan produk akhir fermentasi karbohidrat oleh bakteri anaerob di kolon ( Soergel, 1994). SCFA merupakan anion penting di dalam lumen kolon yang mempengaruhi morfologi serta fungsi saluran cerna. SCFA di dalam kolon berperan sebagai sumber energi, absorpsi air dan sodium juga memberikan efek terhadap aliran darah mukosa kolon, motilitas kolon serta meningkatkan pertumbuhan serta diferensiasi kolonosit (MacFarlane & MacFarlane, 2001).

Produksi SCFA dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu jumlah dan jenis mikroflora yang terdapat di kolon, substrat yang tersedia serta waktu transit di usus (Wong *et al.*, 2007). Konsentrasi SCFA didapati paling tinggi pada bagian proksimal usus besar disebabkan karbohidrat lebih banyak terdapat dibagian tersebut akan tetapi beberapa penelitian melaporkan bahwa produksi SCFA, dalam hal ini asetat : propionat : butirat adalah sama pada bagian proksimal maupun distal kolon dengan molar ratio sekitar 57:22:21 (MacFarlane & MacFarlane, 2003). Sekitar 90 % SCFA segera diabsorpsi oleh kolon dan selanjutnya merangsang absorpsi natrium serta air ( Henningsson *et al.*, 2001). SCFA yang telah diabsorpsi akan dimetabolisme pada lokasi yang berbeda ditubuh. Butirat akan digunakan oleh kolonosit sebagai sumber energi utama sekitar 70% dari total energi yang dibutuhkan (Wong *et al.*, 2007 ; Hijova & Chmelarova, 2007). Butirat berperan penting dalam pencegahan serta pengobatan penyakit di mukosa kolon seperti kolitis ulseratif dan kanker. Butirat

memiliki efek protektif terhadap kanker kolon melalui diferensiasi, penghentian siklus sel serta apoptosis kolonosit yang mengalami transformasi serta menghambat enzim *histone deacetylase*. Irigasi butirat ( enema ) juga digunakan sebagai pengobatan terhadap kolitis. Butirat juga yang paling berperan terhadap pertumbuhan serta diferensiasi sel kolonosit (Wong *et al.*, 2006).

### **2.2.2 Efek asam butirat terhadap kanker kolon.**

Butirat selain sebagai sumber energi kolonosit juga berperan penting pada regulasi proliferasi dan diferensiasi sel. Butirat memiliki efek protektif terhadap terjadinya karsinogenesis kolon melalui kemampuannya sebagai antiproliferatif sel dan rangsangan apoptosis sel yang dihubungkan dengan kemampuan menginduksi hiperasetilasi histon. Penelitian secara *in vivo* dan *in vitro* untuk menilai efek butirat merangsang proliferasi sel memberikan hasil yang berbeda. Butirat merangsang proliferasi sel kolonosit normal secara *in vivo* dan akan menghambat proliferasi sel kanker kolorektal secara *in vitro*. Ketidaksesuaian ini berhubungan dengan saat/waktu pemberian butirat, sumber butirat dan interaksi dengan lemak ( Wong *et al.*, 2007). Komponen SCFA lainnya seperti propionat dan valerat dapat menyebabkan siklus sel berhenti serta diferensiasi sel karsinoma kolon manusia tetapi kemampuannya untuk menginduksi hiperasetilasi histon lebih rendah jika dibandingkan dengan butirat. Asetat tidak menyebabkan hiperasetilasi histon dan juga tidak memiliki efek terhadap pertumbuhan ataupun diferensiasi sel kolonosit ( Hinnebusch *et al.*, 2002).

Sampai saat ini, mekanisme butirat mencegah kanker kolon belum jelas. Butirat merupakan *histone deacetylase inhibitors* ( HDACIs), suatu golongan obat kanker yang baru ( Carew JS, 2008 ; Eot-Houllier *et al.*, 2009). Butirat dapat

melintasi membran sel kolonosit, bertindak sebagai molekul pembawa sinyal yang akan terikat ke reseptor *histon deasetylase* dan akan menghambat aktivitas enzim *histon deacytelase* (Hassig *et al.*, 1997). *Histon deacetylase* merupakan suatu enzim yang bertanggung jawab untuk mempertahankan integritas histon serta berhubungan dengan represi transkripsi gen. Selama terjadi hambatan pada *histon deacetylase* oleh butirir maka enzim *histon acetyltransferase* (HAT) terus bekerja menyebabkan terjadinya hiperasetilasi histon; hal ini menyebabkan kekompakan kromatin terganggu sehingga faktor transkripsi mudah mengakses daerah promotor kemudian terjadi peningkatan transkripsi gen (Davie, 2003). Beberapa penelitian melaporkan bahwa butirir dapat menghambat *histone deacetylase* sehingga menyebabkan hiperasetilasi histon (H3 dan H4) gen p21. Gen p21 aktif akan menghambat seluruh *cyclin dependent kinase* (CDK) kemudian siklus sel berhenti pada fase G1 sehingga memberikan waktu untuk memperbaiki instabilitas genom ataupun mutasi genom (Young *et al.*, 1999; Hinnebusch *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2007). Aktivasi gen p21 oleh butirir ini independent p53 (Archer *et al.*, 1998). Butirir juga dapat merangsang timbulnya apoptosis sel Caco-2 secara *in vitro* melalui jalur mitokondria dengan cara mengaktifasi gen proapoptosis BAX serta hambatan gen antiapoptosis BCL-2 sehingga terjadi translokasi sitokrom C dari mitokondria ke sitosol kemudian berikatan dengan *Apoptotic protease activating factor 1* (Apaf1) mengaktifkan aktivasi kaskade kaspase melalui kaspase 9 sehingga kaspase 3 berikatan dengan DNAase memecah DNA menjadi fragmen dan terjadi apoptosis (Ruemmele *et al.*, 2003). Efek proteksi SCFA terhadap karsinogenesis kolon dapat juga disebabkan akumulasi SCFA di kolon menyebabkan pH menurun sehingga menghambat

enzym 7- $\alpha$ -dehydroxylase yang terlibat dalam perubahan asam empedu primer menjadi asam empedu sekunder. Asam empedu sekunder ini bersifat promotor kanker (Wong *et al.*, 2007).

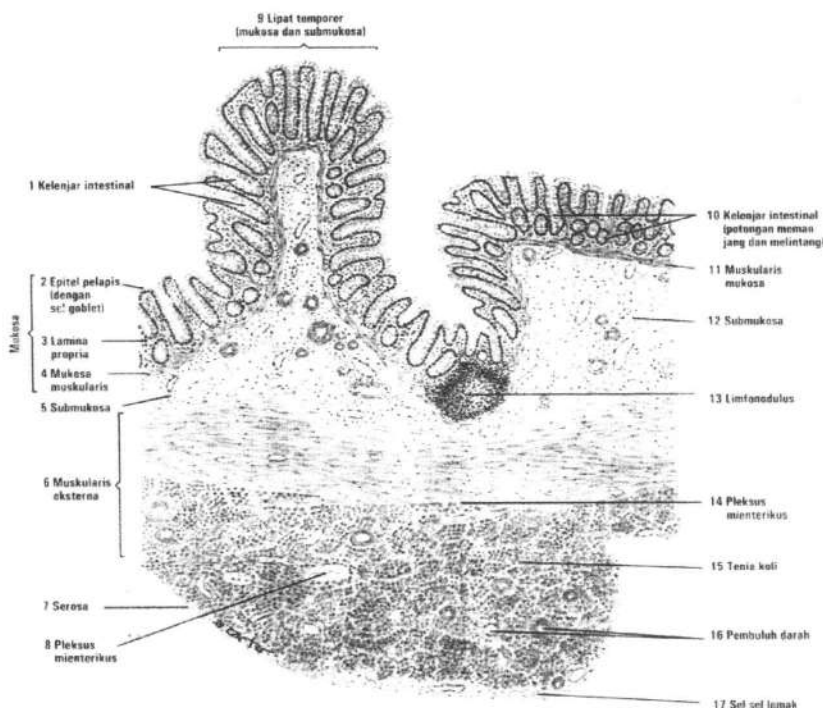
### 2.3 Anatomi dan Fisiologi Kolon

Usus besar pada manusia terdiri dari sekum, kolon dan rektum; merupakan tabung muskular berongga dengan diameter sekitar 7,5 cm dan panjang sekitar 1,5 m yang memanjang dari sekum sampai ke anus. Kolon terbagi atas empat bagian yaitu kolon asenden, transversum, desenden dan sigmoid (Martini, 2001). Kolon membentuk lekukan pada abdomen sebelah kanan yang disebut fleksura hepatica dan di abdomen sebelah kiri disebut fleksura lienalis (Wilson & Lester, 1995). Rektum merupakan bagian distal usus besar yang terbentang dari kolon sigmoid sampai ke anus (Gray, 2003).

Lapisan kolon terdiri dari lapisan mukosa, lapisan submukosa, lapisan muskularis dan lapisan serosa (Leeson *et al.*, 1996) (Gambar 2.4). Lapisan mukosa kolon tidak memiliki vili, terdapat banyak kelenjar tubuler lurus (*crypts of Lieberkuhn*) dan memiliki sel goblet yang lebih banyak dibanding usus halus. Sel kolumnar absorptif merupakan sel epitel permukaan mukosa kolon yang utama. Sel-sel yang belum berdiferensiasi terdapat didasar kripta, kemudian membelah dan turunannya berkembang menjadi sel kolumnar, sel goblet dan sel enteroendokrin yang selanjutnya secara perlahan bermigrasi ke atas mencapai permukaan. Pergantian sel epitel permukaan kolon ini terjadi sekitar setiap 6 hari untuk sel goblet dan sel epitel kolumnar absorptif sedangkan sel enteroendokrin memerlukan waktu sekitar 4 minggu. (Fawcett, 2002 ; Ross *et al.*, 2003). Lapisan submukosa tidak memiliki kelenjar dan dibawahnya terdapat lapisan

muskular kolon yang terdiri dari lapisan longitudinal eksternal dan lapisan sirkular internal (Gray,2003; Martini, 2001). Lapisan muskular longitudinal terkumpul dalam tiga pita yang disebut *taenia coli*. Lapisan serosa kolon terdiri beberapa kantong-kantong kecil peritoneum yang berisi lemak disebut *epiploic appendages* (Martini, 2001).

Fungsi utama kolon adalah untuk mengabsorpsi air dan elektrolit, membentuk massa feses serta sebagai reservoir massa feses sampai defekasi berlangsung (Wilson & Lester, 1995; Martini, 2001). Sedikitnya pencernaan yang terjadi dikolon disebabkan karena pencernaan dilakukan oleh bakteri bukan kerja enzim. Kolon mensekresikan mukus alkali yang berfungsi melumasi dan melindungi mukosa kolon. Bakteri di kolon mensintesis vitamin K, vitamin B dan juga memfermentasi beberapa *indegestible molecules* dan menghasilkan SCFA yang akan digunakan sebagai sumber energi oleh sel epitel kolon ( Fox, 2004).



Gambar 2.4 Dinding kolon ( potongan melintang)  
(Dikutip dari Eroschenko,2003)



## 2.4 Tinjauan tentang Karsinogenesis

### 2.4.1 Dasar molekular karsinogenesis

Karsinogenesis merupakan suatu proses perkembangan keganasan yang ditandai dengan adanya transformasi sel normal mulai dari tahap inisiasi dan promosi sampai pada tahap progresi yang terjadi setelah proses keganasan terbentuk (Agus, 2004). Inti dari proses karsinogenesis adalah kerusakan atau mutasi genetik nonletal yang didapat akibat pengaruh lingkungan, seperti zat kimia, radiasi atau virus maupun yang diwariskan dalam sel germinativum (Kumar, 2005). Sasaran utama kerusakan genetik adalah tiga kelas gen regulatorik yaitu protoonkogen yang mendorong pertumbuhan; gen penekan tumor (*tumor suppressor gene*) yang menghambat pertumbuhan serta gen yang mengatur kematian sel terencana (*programmed cell death*) atau apoptosis. Selain itu, suatu gen pengatur perbaikan DNA yang rusak akan mempengaruhi proliferasi dengan cara memperbaiki kerusakan ketiga gen nonletal lain. Jika terjadi kerusakan pada gen yang memperbaiki DNA dapat mempermudah terjadinya mutasi luas digenom serta transformasi neoplastik.

Karsinogenesis merupakan suatu proses banyak tahap baik pada tingkat genotip maupun fenotipnya. Suatu kanker memiliki sifat fenotip yang diperoleh secara bertahap (*tumor progression*) berupa pertumbuhan berlebihan, invasi lokal serta mampu bermetastasis jauh. Sedangkan pada tingkat molekular, hal ini terjadi akibat akumulasi kelainan genetik yang dipermudah oleh adanya gangguan pada perbaikan DNA dan juga melibatkan gen yang mengendalikan angiogenesis, invasi dan metastasis (Kumar, 2005).

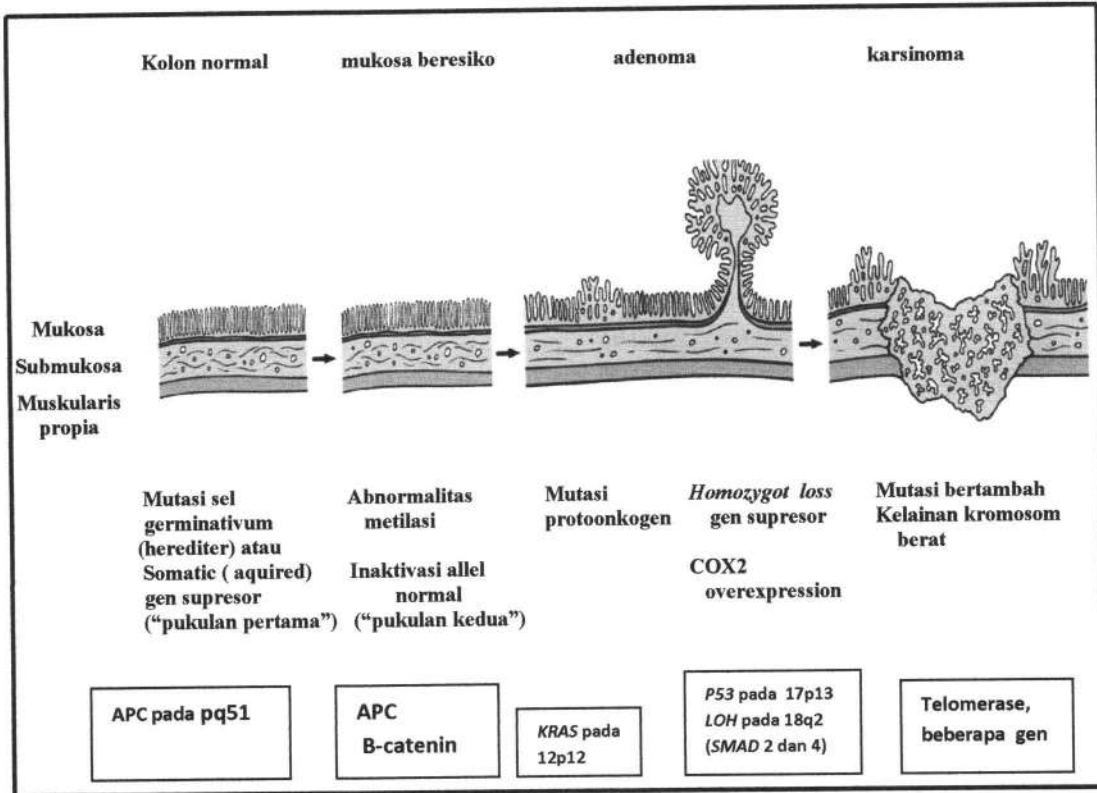
Jika suatu sel normal terpapar bahan karsinogen dari lingkungan maka gen secara normal akan mendeteksi serta memperbaiki DNA yang cedera dan jika perbaikan DNA berhasil maka sel akan normal kembali. Akan tetapi jika dengan perbaikan DNA tidak dapat diperbaiki lagi maka sel akan mengalami apoptosis atau program kematian sel. Selanjutnya jika sel dengan cedera DNA tersebut tetap tinggal didalam siklus sel maka terjadi mutasi pada genom sel somatik sehingga terjadi pengaktifan onkogen pendorong pertumbuhan, perubahan gen pengendali pertumbuhan dan tidak aktifnya gen supresor tumor. Hal ini menyebabkan terekspresinya produk gen yang mengalami perubahan dan hilangnya gen regulatorik sehingga terjadi suatu neoplasma ganas ( Kumar, 2005).

#### 2.4.2 Karsinogenesis kolon

Kanker kolorektal ditujukan pada tumor ganas yang ditemukan dikolon dan rektum dan sekitar 70% kanker kolorektal berkembang dari polip adenomatous sporadik yang bersifat asimtomatik dan multiple ( Hardy, 2000). Kanker kolorektal timbul melalui interaksi yang kompleks antara faktor genetik dan faktor lingkungan. Kelainan genetik yang dikaitkan dengan kejadian kanker kolorektal adalah *familial adenomatous polyposis* ( FAP), yang melibatkan mutasi pada gen *Adenomatous Polyposis Coli* (APC) dengan kejadian terhitung < 1 % dari kanker kolorektal dan *hereditary non-polyposis colorectal cancer* ( HNPCC) yang berhubungan dengan mutasi pada *gen Mismatch repair* (gen MMR ) terhitung 2-3% dari kanker kolorektal (Hardy, 2000). Beberapa penelitian epidemiologi membuktikan bahwa terjadi peningkatan resiko terjadi kanker kolorektal pada masyarakat yang bermigrasi dari wilayah dengan insiden kanker kolorektal yang

rendah ke wilayah yang insiden kanker kolorektalnya tinggi. Hal ini dihubungkan dengan pola diet yang tinggi lemak dan rendah serat (Abdullah, 2006).

Kanker kolorektal terjadi sebagai akibat kerusakan genetik pada lokus yang mengontrol pertumbuhan sel. Perubahan dari kolonosit normal menjadi jaringan adenomatosa melibatkan sejumlah mutasi yang mempercepat pertumbuhan sel (Abdullah, 2006). Perkembangan kanker kolon melibatkan dua jalur patogenesis yang berbeda yaitu jalur instabilitas kromosom dan instabilitas mikrosatelit. Umumnya awal terjadinya kanker kolon melalui jalur instabilitas kromosom yang merupakan hasil dari akumulasi mutasi onkogen dan gen supresor tumor (Kumar, 2005). Awal proses terjadinya kanker kolorektal adalah mutasi somatik pada gen APC dan ditemukan sekitar lebih dari 80% kanker kolorektal sporadik. Akibat terjadinya mutasi gen APC menyebabkan peningkatan proliferasi sel yang selanjutnya berkembang menjadi adenoma. Transisi adenoma menjadi karsinoma merupakan akibat dari mutasi gen supresor tumor p53. Pada keadaan normal, protein p53 akan menghentikan siklus sel sebagai respon terhadap cedera DNA sehingga tidak terjadi proliferasi sel yang mengalami cedera DNA. Mutasi P53 menyebabkan sel dengan cedera DNA tetap bereplikasi menghasilkan sel-sel dengan cedera DNA. Pada instabilitas mikrosatelit terjadi mutasi pada gen MMR yang berfungsi memperbaiki gangguan replikasi DNA sehingga menyebabkan terjadinya kanker (Hardy, 2000; Kumar, 2005).



Gambar 2.5 Diagram perjalanan adenoma menjadi karsinoma kolorektal (Dikutip dari Kumar, 2005)

### 2.4.3 Tinjauan tentang gen p53

Gen p53 (P53) adalah salah satu gen supresor tumor yang sering mengalami mutasi pada kanker manusia. P53 terdapat di nukleus pada kromosom 17 lengan pendek (17p) dan memiliki 11 ekson serta 3 domain struktural yang diekspresikan pada semua jaringan tubuh (Semenza & Weasel, 1997). P53 dalam keadaan normal berinteraksi dengan protein MDM2 (*Murine Double Minute 2*). Ikatan antara P53 dengan protein MDM2 akan menghambat kemampuan p53 untuk mengaktifkan fungsi transkripsi dan mengontrol pertumbuhan sel (Kumar, 2005).

P53 dikenal sebagai “*master guardian of the genom*” dan merupakan unsur utama yang memelihara stabilitas genetik berfungsi sebagai antiproliferatif serta mengendalikan apoptosis. P53 berfungsi sebagai pendeteksi adanya DNA sel yang cedera serta memperbaiki DNA yang cedera melalui mekanisme penghentian siklus sel pada fase G1 ( gap 1). P53 akan memicu transkripsi p21 menyebabkan hambatan pada seluruh CDK dan kompleks *cyclin-cdk* tidak terbentuk. Hal ini mengakibatkan siklus sel fase G1 berhenti dan sel memiliki waktu untuk memperbaiki DNA sel yang cedera sebelum melanjutkan ke fase S (sintesis) untuk berlangsungnya sintesis DNA. Perbaikan DNA sel yang cedera terjadi melalui aktivasi gen *repair Growth Arrest and Damage 45* (GADD 45) yang diinduksi oleh P53. Apabila DNA sel yang cedera dapat diperbaiki oleh sel maka P53 meningkatkan transkripsi MDM2 yang kemudian akan menekan P53 sehingga hambatan terhadap siklus sel dapat dihilangkan. Dan jika sel dengan cedera DNA tersebut tidak dapat diperbaiki maka sel mengalami apoptosis melalui aktivasi P53 dengan cara memicu gen pencetus apoptosis seperti *BAX* ( Attardi & Jacks, 1999; Kumar, 2005; Sudiana, 2008). Jika terjadi mutasi pada P53 menyebabkan perubahan protein yang dihasilkannya sehingga terjadi disfungsi protein p53 menyebabkan siklus sel pada fase G1 tidak berhenti dan berlanjut ke fase S dan G2 (gap 2) / M ( mitosis) sehingga DNA yang cedera akan tetap diperbanyak dan mengalami mitosis menghasilkan populasi sel yang mengandung DNA abnormal ( Agus, 2004; Kumar, 2005).

#### 2.4.4 Tinjauan tentang apoptosis

Apoptosis merupakan kematian sel melalui mekanisme genetik (kerusakan/fragmentasi kromosom atau DNA). Apoptosis dapat terjadi secara fisiologis ataupun secara patologis. Apoptosis fisiologis merupakan kematian sel terprogram (*programmed cell death*) dan proses ini sangat erat kaitannya dengan telomerase. Apoptosis patologis merupakan kematian sel karena adanya suatu rangsangan atau jejas yang dapat terjadi melalui beberapa jalur yaitu aktivitas p53, jalur sitotoksik, disfungsi mitokondria dan kompleks fas-ligan. Apoptosis yang dipicu oleh aktivitas p53 disebabkan adanya sel yang memiliki gen yang cacat (*gene defect*). Terjadinya *gene defect* dapat dipicu oleh berbagai faktor seperti bahan kimia, radikal bebas maupun virus onkogen. *Gene defect* dapat memicu aktivitas p53 melalui enzim PKC dan CPK-K2. Aktivasi p53 menyebabkan terbentuknya p21 oleh karena p53 merupakan faktor transkripsi p21. Peningkatan sintesis protein p21 akan menekan semua CDK, yaitu CDK-1 pada fase M, CDK-4 dan CDK-6 pada fase G1 maupun CDK-2 pada fase S; hal ini menyebabkan siklus sel akan berhenti. Saat siklus sel berhenti, p53 akan memicu aktivitas protein BAX yang mana protein BAX ini akan menekan aktivitas BCL-2 pada membran mitokondria sehingga terjadi perubahan permeabilitas membran mitokondria mengakibatkan dilepaskannya sitokrom-C ke sitosol. Sitokrom-C didalam sitosol akan mengaktifasi Apaf-1 yang selanjutnya mengaktifasi kaskade kaspase dan kaspase yang aktif akan mengaktifkan DNA-se yang akan merusak DNA sel (fragmentasi) selanjutnya sel mengalami kematian (apoptosis) (Sudiana, 2008).

## 2.5 Tinjauan tentang Dimethyl-benz(a)anthracene

Karsinogen merupakan bahan yang dapat memicu terjadinya kanker atau keganasan. Karsinogen dapat mempengaruhi DNA ataupun protein yang berperan dalam pengaturan siklus pembelahan sel seperti protoonkogen atau tumor supressor gen. Pada umumnya karsinogen dibagi menjadi tiga golongan yaitu bahan kimia, energi radiasi dan mikroba (Kumar, 2005; Sudjana, 2008).

Bahan karsinogen kimia dapat memicu terjadinya keganasan oleh karena dapat menimbulkan mutasi pada DNA. Bahan karsinogen kimia ini dapat bekerja langsung dan tidak memerlukan transformasi kimiawi untuk menimbulkan karsinogenesis (*ultimate carcinogen*) dan ada juga yang bekerja secara tidak langsung melalui perubahan metabolik sebelum menjadi aktif (*prokarsinogen*) (Kumar, 2005).

Dimethyl-benz(a)anthracene (DMBA) termasuk prokarsinogen golongan *polycyclic aromatic hidrocarbon* (PAH). Bahan karsinogen ini dihasilkan dari pembakaran bahan organik misalnya dari pembakaran tembakau dalam rokok dan juga dapat dihasilkan dari lemak hewan saat pemanggangan daging serta pada ikan dan daging yang diasap (Yuspa, 2001; Kumar, 2005). DMBA diketahui bersifat sitotoksik, karsinogenik, mutagenik serta immunosupresif (Al Atar, 2004). DMBA dimetabolisme oleh enzim sitokrom P-450 akan menghasilkan pembentukan 8,9-diol-10,11-*epoxide* yang bersifat sangat reaktif dan akan membentuk ikatan kovalen dengan DNA terutama pada basa adenin dan guanin (Yang, 1988). Ikatan DNA ini akan menyebabkan DNA menjadi cacat (*defect*) dan tubuh akan berusaha memperbaiki DNA tersebut yang dikenal dengan DNA *repair*. Bila perbaikan DNA ini tidak berhasil maka sel yang mengandung DNA

abnormal tersebut akan dimusnahkan (apoptosis) dan jika proses ini gagal maka sel akan memiliki DNA *defect* yang permanen. Keadaan ini disebut dengan fase inisiasi. Selanjutnya sel dengan DNA *defect* akan mengalami proliferasi dan diferensiasi kemudian berkembang ke arah keganasan (malignansi). Keadaan ini disebut fase promosi (Sudiana, 2008).

## 2.6 Immunohistokimia

Immunohistokimia adalah suatu pemeriksaan berdasarkan prinsip reaksi imunologis dan kimiawi yaitu ditandai adanya reaksi antigen dengan antibodi (reaksi imunologi) dan adanya reaksi antara enzim dengan substrat (reaksi kimiawi). Teknik immunohistokimia telah digunakan sejak tahun 1940, dimulai sejak AH Coons (1941) mendeteksi adanya antigen jaringan menggunakan protokol fluoresen dan teknik pemeriksaan ini terus berkembang. Bayer *et al* (1997) mengembangkan teknik immunohistokimia dengan menggunakan metode avidin biotin kompleks dan streptavidin biotin kompleks.

Reaksi immunohistokimia bersifat spesifik karena bahan yang dideteksi akan direaksikan dengan antibodi spesifik yang dilabel dengan suatu enzim. Enzim yang digunakan dapat berupa peroksidase, alkali fosfatase dan  $\beta$  galaktosidase. Dan untuk menandai adanya suatu reaksi enzimatik didalam jaringan maka digunakan indikator warna (*chromogen*) yaitu  $\alpha$ -naftol yang akan memberikan warna biru dan DAB (3,3 diaminobenzidine) yang akan memberikan warna coklat. Antibodi yang digunakan harus antibodi monoklonal untuk menjaga spesifisitas reaksi. Pewarnaan immunohistokimia dapat dilakukan dengan dua macam metode yaitu *direct* dan *indirect*. Pada metode *direct*, untuk mendeteksi suatu marker pada sel maka antibodi monoklonal yang digunakan langsung

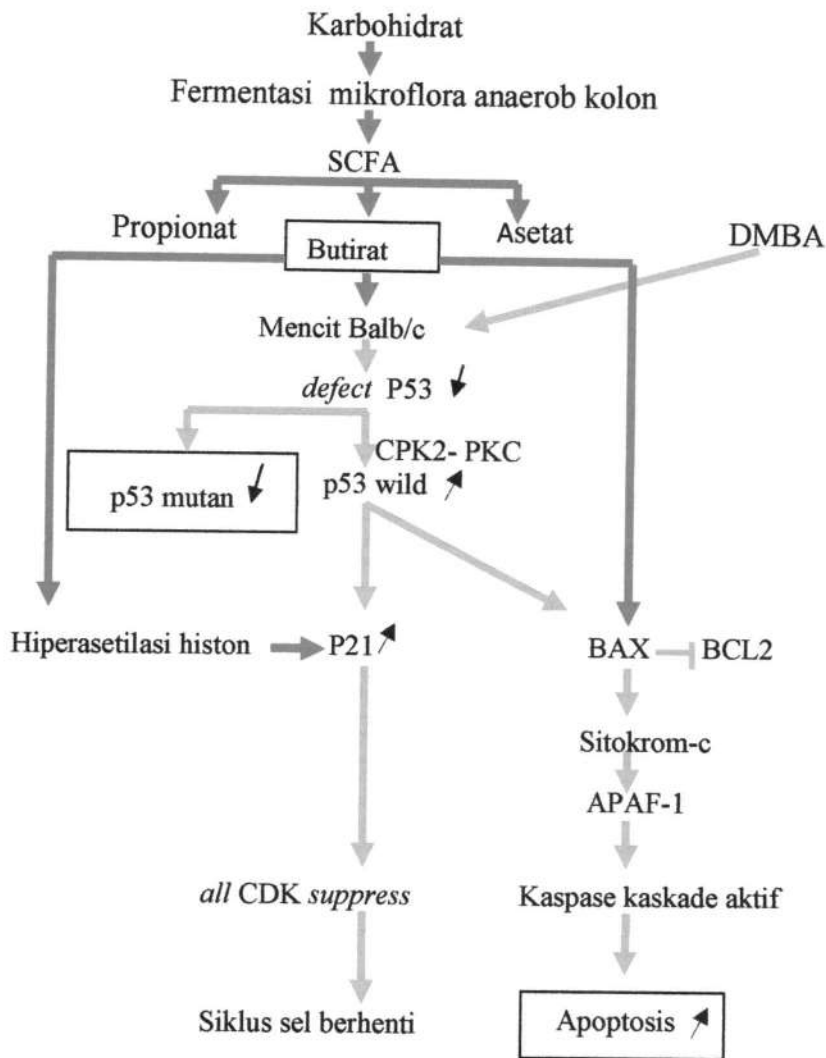


dilabel dengan enzim sedangkan pada metode *indirect* antibodi monoklonal tidak dilabel dengan enzim tetapi yang dilabel adalah anti imunoglobulin (antibodi sekunder). Antibodi sekunder ini dapat dilabel langsung dengan enzim atau secara tidak langsung dengan menggunakan bahan perantara seperti biotin-streptavidin atau biotin avidin ( Suidiana, 2005) .

**BAB 3**

**KERANGKA KONSEPTUAL**

**3.1. Kerangka Konseptual**



ket:

APAF-1 :Apoptosis Protease Actifating Factor-1 : CDK= Cyclin Dependent protein Kinase

PKC/CPK-K2 = Protein Kinase-C / Cystein-Protein Kinase-K2

Senyawa 9,10-dimethyl-1,2-benz(a)anthracene (DMBA) merupakan bahan karsinogen kimiawi golongan *polycyclic aromatic hydrocarbon* (PAH). Metabolisme DMBA oleh enzim sitokrom P-450 akan menghasilkan pembentukan 8,9-diol-10,11-epoxide yang bersifat sangat reaktif dan membentuk ikatan kovalen dengan DNA terutama pada basa adenin dan guanin. Ini akan menyebabkan cedera pada DNA. Selanjutnya melalui CPK2-PKC (*Cystein-Protein Kinase-K2- Protein Kinase-C*) akan diaktifasi gen P53 *wild* sehingga mengaktifkan transkripsi gen P21. Protein p21 akan menghambat seluruh *Cyclin Dependent Kinase* (CDK) dan membentuk kompleks antara CDK dengan cyclin sehingga siklus pembelahan sel berhenti dan selama siklus sel berhenti maka akan memberikan waktu untuk perbaikan sel yang mengalami cedera DNA. Jika cedera DNA tidak dapat diperbaiki maka sel akan diarahkan untuk diapoptosis melalui protein P53 *wild* yang akan mengaktifkan gen BAX sehingga *Pt pore* mitokondria terbuka mengakibatkan sitokrom-C keluar ke sitosol dan mengaktifkan kaskade kaspase sehingga terjadi apoptosis sel yang mengalami cedera DNA.

SCFA terutama butirrat mampu menghambat aktivitas enzim *histon deacetylase* (HDAC) pada lokus gen P21 sehingga terjadi hiperasetilasi histon terutama H3 dan H4 dan aktivasi transkripsi gen P21. Aktivasi gen P21 oleh butirrat adalah *independent* p53. Peningkatan protein p21 akan menghambat seluruh CDK menyebabkan siklus pembelahan sel berhenti. Butirat juga dapat meningkatkan ekspresi protein Bax dan menekan gen BCL-2 menyebabkan *Pt-pore* membran mitokondria terbuka mengakibatkan sitokrom-C keluar ke sitosol kemudian berikatan dengan APAF-1 menyebabkan kaskade kaspase aktif dan terjadi peningkatan apoptosis sel. Peningkatan sel yang mengalami apoptosis menyebabkan

penurunan ekspresi protein p53 mutan dan peningkatan ekspresi protein p53 *wild*. Pengaruh SCFA terhadap penurunan ekspresi protein p53 mutan mungkin melalui peningkatan apoptosis sel epitel kolon mencit setelah pemberian butirrat dan diinduksi DMBA .

### 3.2 Hipotesis

1. Jumlah sel epitel yang mengekspresikan protein p53 mutan pada kolon mencit yang diberi butirrat dan diinduksi 9,10-dimethyl-1,2-benz(a)anthracene (DMBA) lebih sedikit daripada jumlah sel epitel yang mengekspresikan protein p53 mutan pada kolon mencit tanpa diberi butirrat namun diinduksi DMBA
2. Jumlah sel epitel yang mengalami apoptosis pada kolon mencit yang diberi butirrat dan diinduksi DMBA lebih banyak daripada jumlah sel epitel yang mengalami apoptosis pada kolon mencit tanpa diberi butirrat namun diinduksi DMBA

## Bab 4

### METODE PENELITIAN

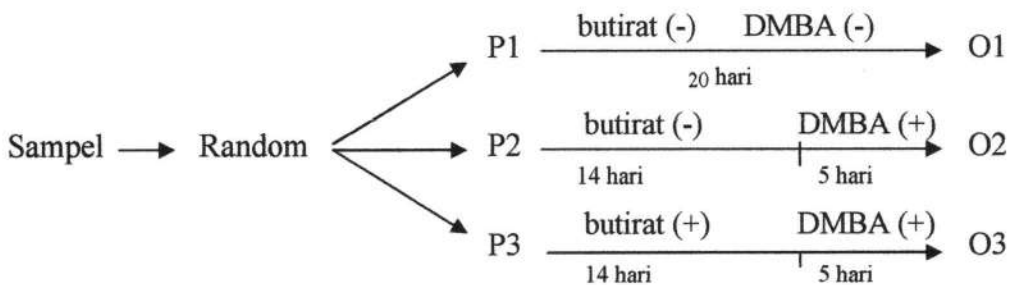
#### 4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

##### 4.1.1 Jenis penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental sesungguhnya (*true experimental*) menggunakan hewan coba mencit (*Mus musculus*) strain Swiss Webster (Balb/c) jantan

##### 4.1.2 Rancangan penelitian

Pada penelitian ini digunakan rancangan penelitian *the post test only control group design*. Pemilihan rancangan tersebut dengan anggapan suatu populasi tertentu dan tiap unit populasi adalah homogen yaitu semua karakteristik antara unit populasi adalah sama. Pengukuran awal (*pre test*) tidak dilakukan karena dianggap sama untuk semua kelompok yang berasal dari satu populasi sehingga hanya dilakukan pengukuran akhir (*post test*) (Zainuddin, 1999).



Keterangan :

P1 = Perlakuan 1

Mencit tidak diberi butirat, tidak diinduksi DMBA dan diberi pelarut DMBA ( oleum olivarum)

P2 = Perlakuan 2

Mencit tidak diberi butirat, diinduksi DMBA (10 mg/100g BB)

P3 = Perlakuan 3

Mencit diberi butirat 2,5 g / kg BB dan diinduksi DMBA (10 mg/100gBB)

#### 4.2 Populasi, Sampel, Besar Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel

Populasi penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) strain Swiss Webster (Balb/c) jantan. Sampel penelitiannya yaitu mencit (*Mus musculus*) strain Swiss Webster ( Balb/c) jantan, berumur 12 minggu, berat badan 25-35 gram. Penggunaan mencit (*Mus musculus*) strain Swiss Webster (Balb/c) jantan berdasarkan bahwa mencit (*Mus musculus*) strain Swiss Webster ( Balb/c) betina diperlukan untuk reproduksi sehingga kelangsungan spesies dapat terjaga.

Jumlah replikasi dalam penelitian ditentukan dengan menggunakan rumus :

$$(t-1)(r-1) \geq 15 \quad (\text{Hanafiah, 2005})$$

$$r \geq \{15 : (t-1)\} + 1$$

$$r \geq 8,5$$

keterangan: r = jumlah replikasi ; t = jumlah perlakuan = 3

Sehingga penelitian ini menggunakan jumlah replikasi sebanyak 9 replikasi

### 4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

#### 4.3.1 Klasifikasi variabel

1. Variabel bebas : asam butirat
2. Variabel tergantung : ekspresi p53 mutan, jumlah sel epitel kolon yang mengalami apoptosis
3. Variabel kendali : mencit ( *Mus musculus*) Strain Swiss Webster ( Balb/c) jantan, umur 12 minggu, berat badan 25-35 gram, pakan pelet, air minum aqua, cara pemeliharaan mencit, dosis asam butirat, cara pemberian butirat per oral, DMBA dosis 10mg/100g BB sebagai penyebab kanker dan metode pemeriksaan.

#### 4.3.2 Definisi operasional variabel

1. Ekspresi p53 mutan adalah jumlah sel epitel yang mengekspresikan protein p53 mutan pada kolon mencit Balb/c jantan, dengan pemeriksaan immunohistokimia dihitung jumlah sel yang memberikan reaksi positif terhadap antibodi monoklonal P53 dan dilihat menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x
2. Jumlah apoptosis adalah jumlah sel epitel yang mengalami apoptosis pada kolon mencit Balb/c jantan yang diperiksa dengan pewarnaan TUNEL *assay* tampak bentukan berwarna coklat, dilihat dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x
3. Dosis butirat adalah jumlah asam butirat yang diberikan secara oral ke mencit Strain Balb/c jantan yaitu 2,5 g/kgBB.

4. Dosis DMBA adalah jumlah DMBA dalam pelarut Oleum Olivarium diberikan secara oral ke mencit Strain Balb/c jantan yaitu 10 mg/ 100g BB .

#### 4.4 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) Strain Swiss Webster (Balb/c) jantan berumur 12 minggu dengan berat badan 25-35 gram, sodium butirat (WAKO), pakan mencit pelet, air minum aqua, 9,10-dimethyl-1,2-benz(a)anthracene (WAKO), aquadest, Oleum Olivarium, garam fisiologis, buffer formalin 10%, etanol 70%, etanol 95%, etanol absolut, xylol, parafin, polilisin, entilen. Bahan kimia untuk pembuatan sediaan histopatologis, bahan kimia untuk pewarnaan TUNEL *assay*, bahan kimia untuk immunohistokimia, *Antibody monoclonal* (Sigma) untuk P53 mutan.

#### 4.5 Instrumen Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang mencit yang terbuat dari plastik ukuran 40 cm x 32 cm x 13 cm yang ditutup kawat kasa dan dilengkapi tempat makan dan botol minum, sonde mencit, alat sonikasi, seperangkat alat bedah, mikrotom putar dan perlengkapannya, water bath, mikroskop, gelas objek, gelas penutup, botol kecil tempat jaringan, timbangan teknik, kertas label, pensil, peralatan untuk pembuatan dan pengamatan sediaan histopatologis, pewarnaan TUNEL *assay* dan immunohistokimia



## **4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian**

### **4.6.1 Lokasi penelitian**

1. Unit hewan coba di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Unair untuk pemberian perlakuan terhadap hewan coba
2. Laboratorium Patobiologi-Gramik Fakultas Kedokteran Unair untuk pemeriksaan immunohistokimia

### **4.6.2 Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan bulan Maret - Juni 2009

## **4.7 Prosedur Pengumpulan Data**

Sebelum penelitian dilakukan maka dipersiapkan kandang, pakan, larutan sodium butirat dan DMBA. Kandang dicuci kemudian didesinfeksi satu minggu sebelum digunakan agar kandang suci hama. Perlakuan terhadap hewan coba dilaksanakan di Laboratorium Biokimia (Unit Hewan Coba) Fakultas Kedokteran UNAIR, dibawah pengawasan seorang dokter hewan ( Setiawati Sigit, drh,MS). Asam butirat yang digunakan adalah sodium butirat dari WAKO yang dilarutkan dengan aquades. DMBA yang digunakan yaitu 9,10-dimethyl-1,2-benz(a)anthracene dari WAKO kemudian dilarutkan dengan Oleum Olivarum untuk mempermudah pemberian per oral.

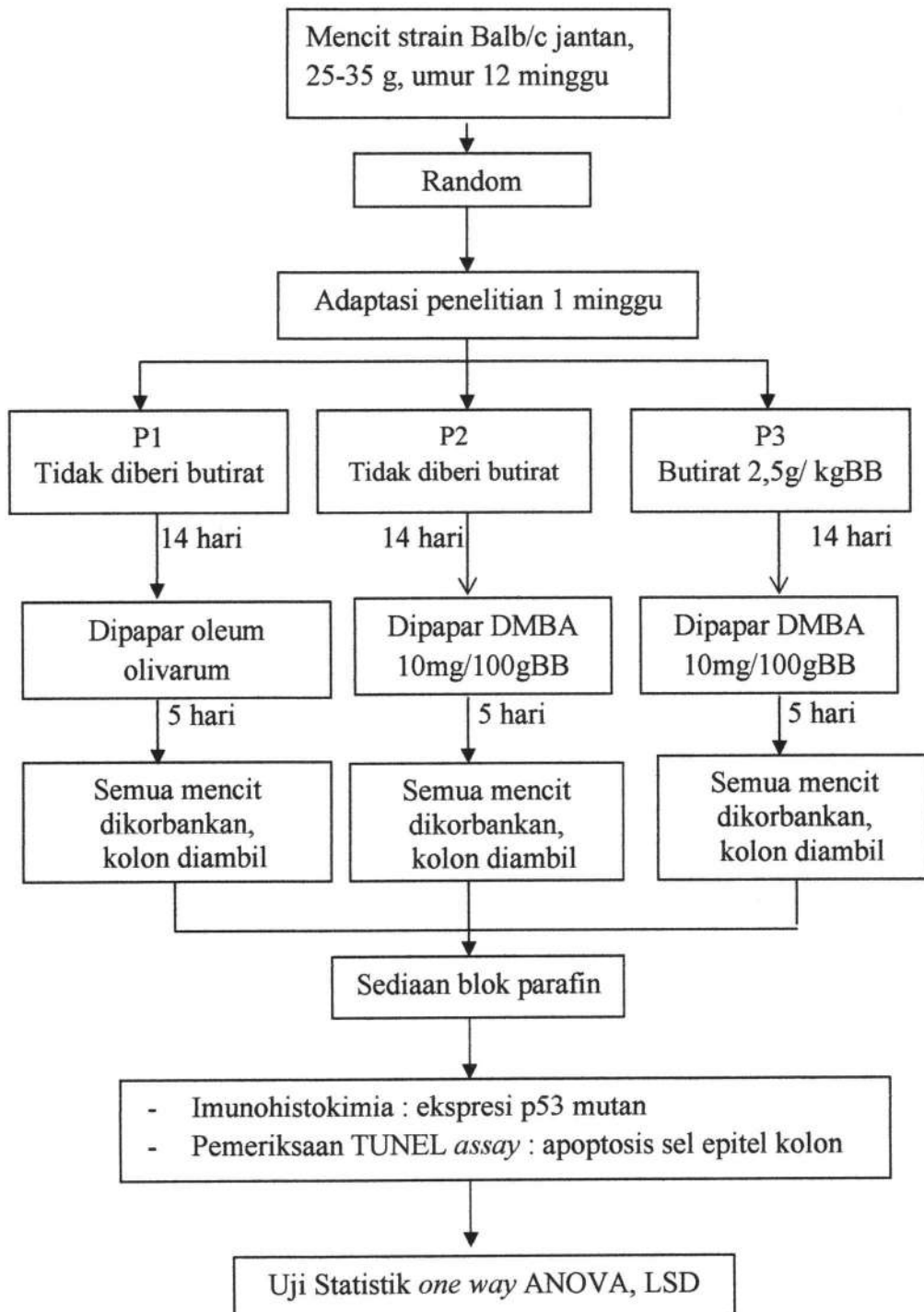
Hewan coba yang digunakan yaitu mencit strain Balb/c jantan , umur 12 minggu dengan berat badan 25-35 gram. Mencit diambil dari populasi kemudian dibagi menjadi tiga perlakuan secara random, masing-masing kelompok perlakuan sebanyak sembilan ekor. Setiap mencit ditimbang berat badannya untuk menentukan jumlah pemberian sodium butirat. Sodium butirat diberikan sebesar 2,5 g/kgBB peroral (menggunakan sonde lambung) satu kali setiap hari selama

14 hari. Pada hari ke 15, mencit ditimbang untuk menentukan jumlah DMBA yang akan diberikan kemudian mencit diinduksi DMBA dengan menggunakan sonde lambung. DMBA diberikan pada hari ke 15 setelah pemberian butirrat agar memberikan manfaat pada sel epitel kolon secara optimal. Mencit dikorbankan 5 hari setelah pemaparan DMBA dengan menggunakan metode dekapitasi selanjutnya mencit dibedah untuk mengambil kolonnya, setelah kolon diambil maka mencit tersebut dikubur dengan layak. Kolon dibersihkan dengan cairan *saline* steril kemudian difiksasi dengan cara dimasukkan kedalam larutan buffer formalin 10%. Kemudian spesimen didehidrasi dan di *embeded* menjadi blok parafin menggunakan metode baku. Tahap berikutnya disiapkan kaca objek yang telah dilapisi poli L lisin, pemotongan blok parafin menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5  $\mu$ m, potongan jaringan ditebarkan pada permukaan pemanas berisi air hangat kemudian diambil menggunakan slide. Jaringan yang telah menempel pada gelas objek dilakukan deparafinisasi dan sediaan siap untuk dilakukan pewarnaan TUNEL *assay* dan pewarnaan imunohistokimia.

Prosedur pewarnaan jaringan untuk mendapatkan ekspresi p53 mutan menggunakan teknik imunohistokimia *Biotin Streptavidin Amplified*. Pemeriksaan dilanjutkan dibawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali dengan menghitung jumlah sel epitel kolon yang mengalami apoptosis dan yang mengekspresikan p53 mutan. Sel epitel kolon yang positif p53 mutan memberikan warna coklat kehitaman diantara sel epitel kolon yang tidak mengekspresikan p53 mutan berwarna kebiruan/kehijauan. Setiap sediaan diamati pada seluruh sayatan.

#### 4.8 Analisis Data

Seluruh data penelitian dilakukan uji normalitas data untuk menentukan uji hipotesis yang akan digunakan. Jika data berdistribusi normal maka digunakan *one way* ANOVA dan bila terdapat perbedaan yang bermakna dilanjutkan dengan uji LSD dengan  $\alpha = 0,05$  dan hasil uji bermakna bila diperoleh nilai  $p < 0,05$ . Untuk data yang tidak berdistribusi normal maka digunakan uji *Kruskal-Wallis*, bila terdapat perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitne* dengan  $\alpha = 0,05$  dan hasil uji bermakna bila diperoleh nilai  $p < 0,05$  (Sudjana, 2000).

**KERANGKA OPERASIONAL PENELITIAN**

**BAB 5****HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN****5.1 Berat Badan mencit Balb/c jantan**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental sesungguhnya (*true experimental*) menggunakan hewan coba mencit (*Mus musculus*) strain Swiss Webster (Balb/c) jantan. Adapun rerata berat badan mencit Balb/c jantan yang digunakan pada masing-masing kelompok dapat dilihat pada tabel 5.1.

Tabel 5.1 Rerata dan SD berat badan mencit Balb/c jantan ( g )

Perlakuan ( P )	BB (Rerata $\pm$ SD)	Min	Maks	p
P1 Butirat(-) DMBA (-)	25,667 $\pm$ 0,707	25,000	27,000	0,623
P2 Butirat(-) DMBA (+)	25,889 $\pm$ 0,600	25,000	27,000	
P3 Butirat(+) DMBA (+)	26,000 $\pm$ 0,866	25,000	27,000	

Berdasarkan tabel 5.1 dapat dilihat bahwa rerata berat badan mencit Balb/c jantan ( gr ) pada kelompok perlakuan tidak diberi butirat dan tidak diberi DMBA ( P1 ) adalah 25,667  $\pm$  0,707 gram; kelompok perlakuan tidak diberi butirat namun diberi DMBA 2 ( P2 ) adalah 25,889  $\pm$  0,600 gram dan kelompok perlakuan diberi butirat dan diberi DMBA ( P3 ) adalah 26,000  $\pm$  0,866 gram ; dilakukan replikasi sebanyak 9 kali untuk masing-masing kelompok. Kemudian dilakukan uji homogenitas berat badan mencit Balb/c jantan dengan menggunakan

uji *one way* ANOVA untuk mengetahui asal sampel dari populasi yang homogen atau tidak. Hasil analisis didapati bahwa tidak ada perbedaan berat badan pada semua kelompok perlakuan ( $p = 0,623$ ;  $p > 0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa sampel berasal dari populasi yang homogen. Hasil pengujian selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 1.

## 5.2 Hasil pemeriksaan imunohistokimia sel epitel yang mengekspresi p53 mutan pada kolon mencit Balb/c jantan

Pemeriksaan jumlah sel epitel yang mengekspresikan p53 mutan pada kolon mencit Balb/c jantan dilakukan dengan teknik imunohistokimia *Biotin Streptavidin Amplified*. Setiap satu sampel diamati dan dihitung jumlah sel yang mengekspresikan protein p53 mutan dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x; diamati pada seluruh sayatan dan dihitung jumlah sel yang memberikan reaksi positif terhadap antibodimonoklonal p53 mutan. Hasil penghitungan jumlah sel epitel yang mengekspresikan p53 mutan pada kolon mencit Balb/c jantan dapat dilihat pada tabel 5.2 dan gambar 5.1

Tabel 5.2 Nilai median jumlah sel epitel yang mengekspresikan p53 mutan pada kolon mencit Balb/c jantan

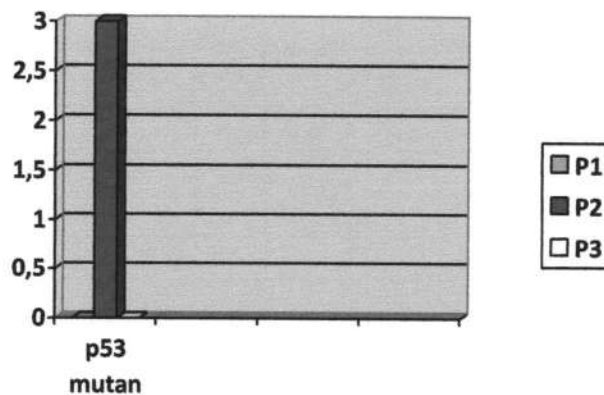
Perlakuan (P)	Median (n=9)	Min	Maks	p
P1 Butirat (-)DMBA (-)	0 <sup>a</sup>	0	1	< 0,0001
P2 Butirat (-); DMBA (+)	3 <sup>b</sup>	2	5	
P3 Butirat (+); DMBA (+)	0 <sup>a</sup>	0	2	

\* a, b superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,0001$ )

Berdasarkan tabel 5.2 dapat dilihat bahwa nilai median jumlah sel epitel yang mengekspresi p53 mutan pada kolon mencit Balb/c jantan pada kelompok perlakuan tidak diberi butirrat dan tidak diberi DMBA adalah 0 dengan jumlah minimal 0 dan jumlah maksimal 1; kelompok perlakuan tidak diberi butirrat namun diberi DMBA adalah 3 dengan jumlah minimal 2 dan jumlah maksimal 5; kelompok perlakuan diberi butirrat dan DMBA adalah 0 dengan jumlah minimal 0 dan jumlah maksimal 2.

Dilakukan uji normalitas distribusi data hasil penelitian p53 mutan dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk menentukan jenis uji hipotesis yang akan digunakan. Hasil uji normalitas data dapat dilihat pada lampiran 2. Jika hasil pengujian mempunyai nilai probabilitas lebih besar dari 0,05 ( $p > 0,05$ ) artinya data berdistribusi normal. Hasil analisis didapati bahwa seluruh data hasil penelitian p53 mutan tidak berdistribusi normal ( $p=0,012$ ;  $p < 0,05$ ). Selanjutnya untuk menguji perbedaan jumlah sel epitel yang mengekspresikan p53 mutan pada kolon mencit Balb/c jantan, digunakan uji *Kruskal-Wallis* dan bila terdapat perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*. Hasil analisis uji *Kruskal-Wallis* jumlah sel epitel yang mengekspresikan p53 mutan pada kolon mencit Balb/c jantan didapati perbedaan yang signifikan ( $p < 0,0001$ ;  $p < 0,05$ ) (lampiran 2). Data selanjutnya dianalisis dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui beda antar kelompok perlakuan. Hasil pengujian selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 2. Berdasarkan tabel 5.2 menunjukkan bahwa nilai median jumlah sel epitel kolon yang mengekspresikan p53 mutan pada kelompok perlakuan tidak diberi butirrat dan tidak diberi DMBA terdapat perbedaan yang signifikan dengan kelompok perlakuan yang tidak diberi butirrat namun diberi

DMBA ( $p < 0,0001$ ;  $p < 0,05$ ); begitu juga pada kelompok perlakuan tanpa diberi butirat namun diberi DMBA berbeda secara signifikan dengan kelompok perlakuan yang diberi butirat dan diberi DMBA ( $p < 0,0001$ ;  $p < 0,05$ ). Dan tidak terdapat perbedaan antara kelompok perlakuan tidak diberi butirat dan tidak diberi DMBA dengan kelompok perlakuan yang diberi butirat dan diberi DMBA ( $p = 0,387$ ;  $p > 0,05$ )



Gambar 5.1 Nilai median jumlah sel epitel kolon yang mengekspresikan p53 mutan pada kolon mencit Balb/c jantan

### 5.3 Hasil pemeriksaan sel epitel yang mengalami apoptosis pada kolon mencit Balb/c jantan

Pemeriksaan terhadap jumlah sel epitel yang mengalami apoptosis pada kolon mencit Balb/c jantan dilakukan dengan pewarnaan TUNEL *assay*. Setiap satu sampel diamati dan dihitung jumlah sel epitel yang mengalami apoptosis pada kolon dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x; diamati pada seluruh sayatan dan dihitung dengan menggunakan *grateculae* (kamar hitung). Dihitung jumlah sel yang memberikan reaksi positif pada pewarnaan TUNEL



*assay* . Hasil penghitungan rerata jumlah sel epitel yang mengalami apoptosis pada kolon mencit Balb/c jantan dapat dilihat pada tabel 5.3. dan gambar 5.2

Tabel 5.3 Nilai rerata dan SD jumlah sel epitel yang mengalami apoptosis pada kolon mencit Balb/c jantan

Perlakuan (P)	Rerata $\pm$ SD (n = 9)	min	maks	p
P1 Butirat(-) DMBA (-)	25,111 $\pm$ 31,362	0	95	0,129
P2 Butirat(-) DMBA (+)	29,778 $\pm$ 33,082	3	97	
P3 Butirat (+) DMBA (+)	77,444 $\pm$ 89,727	1	218	

Berdasarkan tabel 5.3 dapat dilihat rerata jumlah sel epitel yang mengalami apoptosis pada kolon mencit Balb/c jantan pada kelompok perlakuan tidak diberi butirat dan tidak diberi DMBA adalah 25,111  $\pm$  31,362; kelompok perlakuan tidak diberi butirat namun diberi DMBA adalah 29,778  $\pm$  33,082 ; kelompok perlakuan diberi butirat dan diberi DMBA adalah 77,444  $\pm$  89,727.

Dilakukan uji normalitas distribusi data hasil penelitian apoptosis dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk menentukan jenis uji hipotesis yang akan digunakan. Hasil analisis menunjukkan bahwa data hasil penelitian apoptosis berdistribusi normal (  $p= 0,104$  ;  $p > 0,05$ ). Selanjutnya data hasil penelitian apoptosis dianalisis dengan menggunakan uji *one way ANOVA* untuk menguji perbedaan rerata jumlah sel epitel yang mengalami apoptosis pada kolon mencit Balb/c jantan antar kelompok dan bila terdapat perbedaan yang signifikan dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*). Hasil pengujian selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 3. Berdasarkan tabel 5.3 menunjukkan

bahwa tidak terdapat perbedaan jumlah sel epitel kolon yang mengalami apoptosis pada semua kelompok perlakuan ( $p=0,129$  ;  $p > 0,05$ )

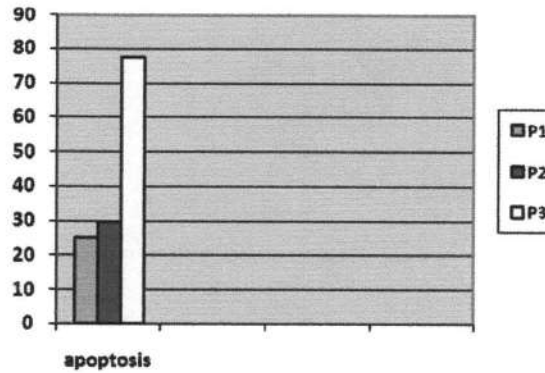
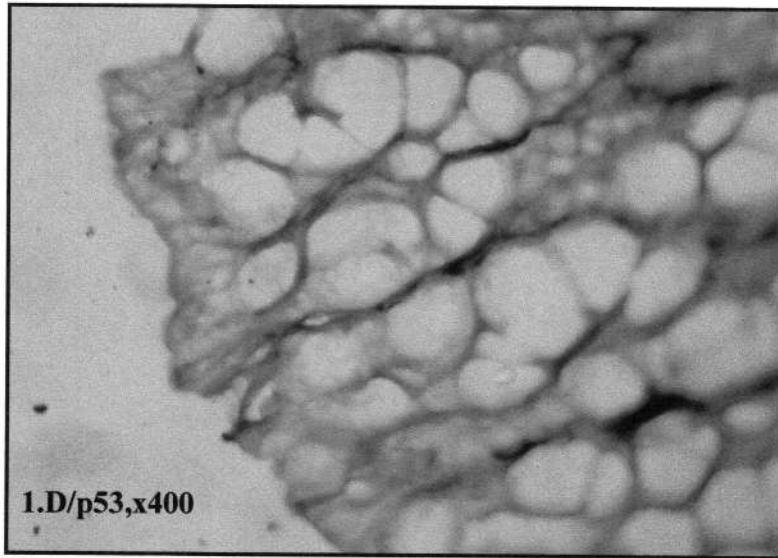


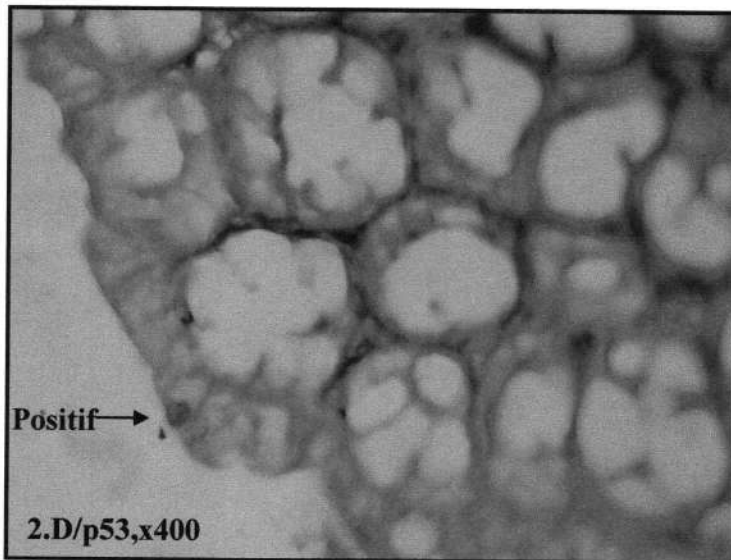
Diagram 5.2. Nilai rerata jumlah sel epitel yang mengalami apoptosis pada kolon mencit Balb/c jantan

#### 5.4 Hasil pewarnaan imunohistokimia serta TUNEL assay

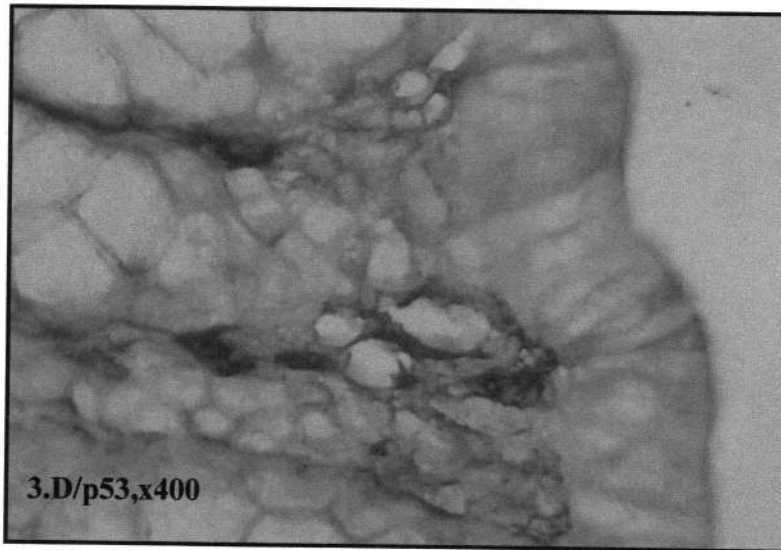
Pada gambar 5.3 – 5.5 dapat dilihat hasil pemeriksaan imunohistokimia untuk mendeteksi ekspresi p53 mutan sel epitel kolon mencit Balb/c jantan, menggunakan antibodi monoklonal p53 mutan dengan pembesaran 400x. Pada gambar 5.6 – 5. 8 dapat dilihat hasil pewarnaan TUNEL assay untuk mendeteksi sel epitel yang mengalami apoptosis pada kolon mencit Balb/c jantan, dengan pembesaran 400x. Tanda panah menunjukkan hasil positif dengan terdapat bercak coklat.



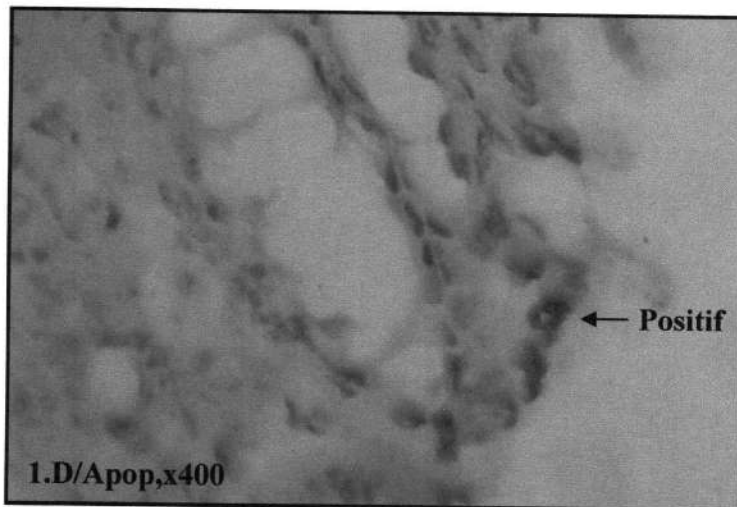
Gambar 5.3 Sayatan kolon mencit Balb/c jantan dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodiminoklonal P53 mutan pada kelompok perlakuan yang tidak diberi butirrat dan tidak diberi DMBA (P1), pembesaran 400 x.



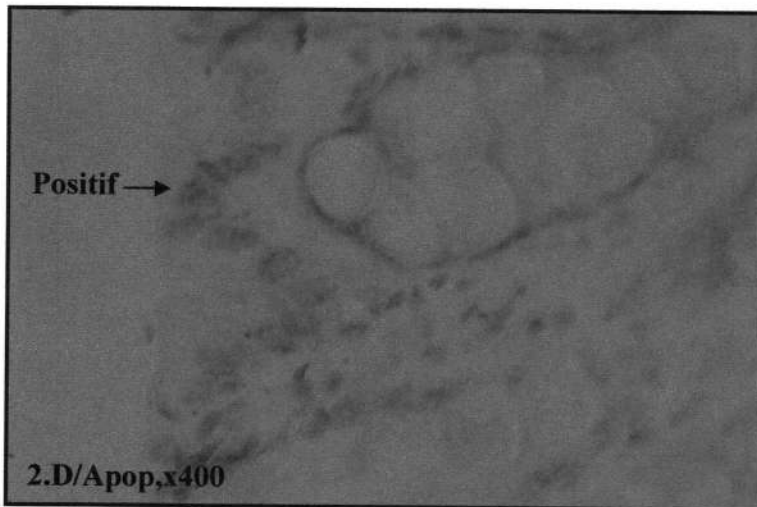
Gambar 5.4 Sayatan kolon mencit Balb/c jantan dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodimonoklonal P53 mutan pada kelompok perlakuan yang tidak diberi butirrat dan diberi DMBA (P2), pembesaran 400 x.  
Tanda panah hitam : reaksi positif ( coklat)



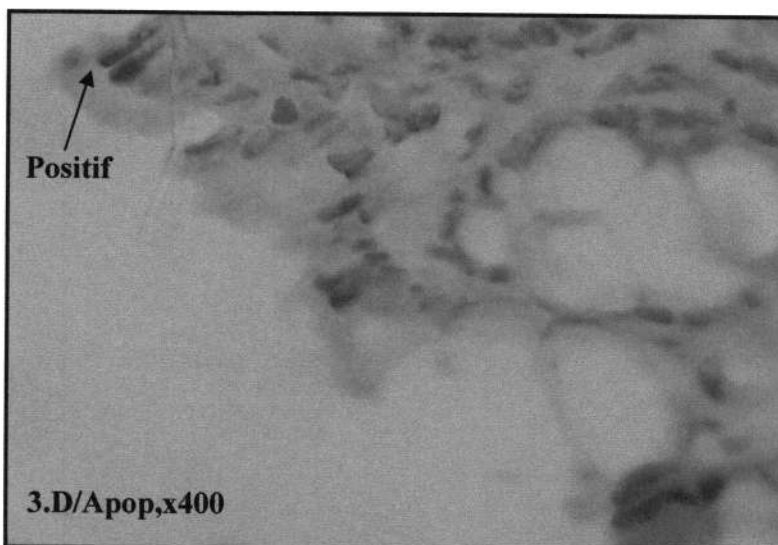
Gambar 5.5 Sayatan kolon mencit Balb/c jantan dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodimonoklonal P53 mutan pada kelompok perlakuan yang diberi butirrat dan diberi DMBA (P3), pembesaran 400 x.



Gambar 5.6 Hasil pewarnaan dengan TUNEL *assay* pada sayatan kolon mencit Balb/c jantan kelompok perlakuan yang tidak diberi butirrat dan tidak diberi DMBA (P1), pembesaran 400 x. Tanda panah hitam : reaksi positif ( coklat)



Gambar 5.7 Hasil pewarnaan dengan TUNEL *assay* pada sayatan kolon mencit Balb/c jantan kelompok perlakuan yang tidak diberi butirrat dan diberi DMBA (P2), pembesaran 400 x.  
Tanda panah hitam : reaksi positif ( coklat)



Gambar 5.8 Hasil pewarnaan dengan TUNEL *assay* pada sayatan kolon mencit Balb/c jantan kelompok perlakuan yang diberi butirrat dan diberi DMBA (P3), pembesaran 400 x.  
Tanda panah hitam : reaksi positif ( coklat)

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Karsinogenesis merupakan suatu proses perkembangan keganasan yang ditandai dengan adanya transformasi sel normal mulai dari tahap inisiasi dan promosi sampai pada tahap progresi yang terjadi setelah proses keganasan terbentuk ( Agus, 2004). Sasaran utama kerusakan genetik adalah tiga kelas gen regulatorik yaitu protoonkogen yang mendorong pertumbuhan; gen penekan tumor ( *tumor suppressor gene*) yang menghambat pertumbuhan serta gen yang mengatur kematian sel terencana ( *programmed cell death*) atau apoptosis (Kumar, 2005).

P53 merupakan suatu *tumor suppressor gene* yang berperan dalam regulasi siklus sel dan apoptosis sel dengan cara mengontrol sejumlah gen jika terjadi cedera DNA ( Attardi & Jacks, 1999). Peranan P53 sebagai regulator siklus sel adalah melalui penghentian siklus sel pada fase G1 yang disebabkan oleh karena peningkatan transkripsi p21 yang akan menghambat pembentukan kompleks cyclin-CDK. Siklus sel yang berhenti akan memberikan waktu bagi sel untuk memperbaiki DNA yang cedera sehingga sel dengan cedera DNA tidak mengalami replikasi dan mitosis. Perbaikan sel dengan cedera DNA terjadi melalui aktivasi gen *repair Growth Arrest and Damage45* ( GADD45) yang diinduksi oleh P53. Apabila cedera DNA nya dapat diperbaiki oleh sel maka P53 meningkatkan transkripsi MDM2 yang kemudian akan menekan P53 sehingga hambatan terhadap siklus sel dapat dihilangkan. Jika cedera DNA tidak dapat diperbaiki maka P53 akan mengarahkan sel untuk diapoptosiskan ( Kumar, 2005).

P53 merupakan target yang paling sering mengalami perubahan gen pada manusia. Lebih dari 50% tumor pada manusia mengandung mutasi pada P53 (Kumar, 2005).

*Dimethyl-benz(a)anthracene* (DMBA) termasuk prokarsinogen golongan *polycyclic aromatic hidrocarbon* ( PAH). Bahan karsinogen ini dihasilkan dari pembakaran bahan organik misalnya dari pembakaran tembakau dalam rokok dan juga dapat dihasilkan dari lemak hewan saat pemanggangan daging serta pada ikan dan daging yang diasap (Yuspa, 2001; Kumar, 2005). DMBA diketahui bersifat mutagenik (Al Atar, 2004). Hasil metabolisme DMBA yaitu terbentuknya 8,9-diol-10,11- *epoxide* yang bersifat sangat reaktif dapat menyebabkan cedera DNA. Jika cedera DNA terjadi pada gen suppresor tumor P53 maka akan terbentuk p53 mutan.

Penelitian ini menggunakan metode imunohistokimia *indirect* untuk deteksi adanya ekspresi p53 mutan pada sel epitel kolon mencit. Pada metode *indirect* ini antibodi sekunder yang dilabel enzim akan berikatan dengan antibodi primer yang telah berikatan dengan antigen. Untuk menandai adanya suatu reaksi enzimatik didalam jaringan maka digunakan indikator warna ( *chromogen* ) DAB (3,3 *diaminobenzidine*) yang akan memberikan warna coklat diantara sel normal yang terwarnai sesuai *counter stain Hematoxylin* atau *methyl green* ( Suidiana, 2008).

Hasil pewarnaan imunohistokimia pada penelitian ini menunjukkan jumlah sel epitel kolon yang mengekspresikan p53 mutan pada kelompok perlakuan yang tanpa diberi butirrat namun diberi DMBA, lebih banyak secara signifikan dibandingkan pada kelompok mencit tanpa diberi butirrat dan tanpa diberi DMBA ( $p < 0,0001$  ;  $p < 0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa DMBA merupakan suatu

senyawa mutagenik yang menyebabkan terjadinya mutasi P53 pada sel epitel kolon.

Pada penelitian ini ternyata kelompok perlakuan yang diberi DMBA tanpa diberi butirat, tidak mampu mengatasi cedera DNA pada P53 sehingga terjadi mutasi pada P53, hal ini disebabkan oleh karena sel yang mengalami cedera DNA pada P53 tidak dapat diperbaiki melalui mekanisme DNA *repair* maupun melalui apoptosis sel. Apabila sel yang mengalami cedera DNA tetap tinggal didalam siklus sel maka akan terjadi mutasi dan ekspresi gen yang berlebihan yang terus menerus sehingga menyebabkan proliferasi sel menjadi tidak terkendali. Akan tetapi dengan pemberian butirat maka jumlah sel epitel kolon yang mengekspresikan p53 mutan pada kelompok yang diberi butirat dan DMBA lebih sedikit secara signifikan dibandingkan pada kelompok yang tanpa diberi butirat namun diberi DMBA ( $p < 0,0001$  ;  $p < 0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa dengan pemberian butirat maka sel mampu mengatasi cedera DNA pada P53 sehingga menghambat ekspresi p53 mutan. Kemampuan sel mengatasi cedera DNA pada P53 oleh butirat memberikan hasil akhir yang sama dengan epitel normal, hal ini dapat dilihat dari jumlah sel yang mengekspresikan p53 mutan pada kelompok yang diberi butirat dan DMBA tidak berbeda dengan kelompok perlakuan yang tanpa diberi butirat dan tanpa diberi DMBA ( $p=0,387$  ;  $p > 0,05$ ).

Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa butirat mampu menghambat ekspresi p53 mutan pada sel epitel kolon akibat induksi DMBA. Butirat merupakan produk akhir fermentasi karbohidrat oleh bakteri anaerob di kolon (Soergel, 1994). Konsentrasi butirat yang dihasilkan dari fermentasi karbohidrat tersebut bergantung kepada jenis substrat yang tersedia dan komposisi



mikroflora kolon. Mikroflora kolon yang memfermentasi karbohidrat menghasilkan butirir adalah *clostridia*, *fusobacteria*, *eubacteria*, *peptococci* (Vernazza *et al.*, 2006). Dan berdasarkan analisis phylogenetik ditemukan mikroflora utama yang menghasilkan butirir adalah *Faecalibacterium prausnitzii* yang termasuk kelompok *Clostridium leptum* dan *Eubacterium rectale/Roseburia sp* yang termasuk kelompok *Clostridium coccoides*. *Faecalibacterium prausnitzii* dan *Eubacterium rectale/Roseburia sp* didapati sekitar 5-10% dari total bakteri yang terdapat pada feses manusia (Louis & Flint, 2009).

Butirir memiliki efek protektif terhadap kanker kolon melalui diferensiasi, penghentian siklus sel serta apoptosis kolonosit yang mengalami transformasi serta menghambat enzim *histone deacetylase* (Wong *et al.*, 2006). Butirir merupakan *histone deacetylase inhibitors* (HDACIs), suatu golongan obat kanker yang baru (Carew JS, 2008 ; Eot-Houllier *et al.*, 2009). Butirir dapat melintasi membran sel kolonosit, bertindak sebagai molekul pembawa sinyal yang akan terikat ke reseptor *histon deacetylase* dan akan menghambat aktivitas enzim *histon deacetylase* (Hassig *et al.*, 1997). *Histon deacetylase* merupakan suatu enzim yang bertanggung jawab untuk mempertahankan integritas histon serta berhubungan dengan represi transkripsi gen. Selama terjadi hambatan pada *histon deacetylase* oleh butirir maka enzim *histon acetyltransferase* (HAT) terus bekerja menyebabkan terjadinya hiperasetilasi histon; hal ini menyebabkan kekompakan kromatin terganggu sehingga faktor transkripsi mudah mengakses daerah promotor kemudian terjadi peningkatan transkripsi gen (Davie, 2003). Kemampuan butirir menghambat aktivitas *histone deacetylase* menyebabkan hiperasetilasi histon (H3 dan H4) p21. P21 yang aktif akan menghambat seluruh

*cyclin dependent kinase* (CDK) kemudian siklus sel berhenti pada fase G1 sehingga memberikan waktu untuk memperbaiki instabilitas genom ataupun mutasi genom ( Young *et al.*, 1999; Hinnebusch *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2007). Aktivasi gen p21 oleh butirrat ini independent p53 ( Archer *et al.*, 1998). Berhentinya siklus sel akan memberikan waktu kepada sel untuk memperbaiki cedera DNA melalui aktivasi gen GADD45 yang berperan dalam mekanisme DNA repair atau melalui apoptosis sel. Hasil penelitian ini mendukung penelitian terdahulu bahwa butirrat dapat menghambat ekspresi p53 mutan pada sel kultur yang berasal dari spesimen bedah penderita kanker kolon ( Emenaker *et al.*, 2001)

Apoptosis merupakan kematian sel melalui mekanisme genetik ( kerusakan/ fragmentasi kromosom atau DNA). Apoptosis dapat terjadi secara fisiologis ataupun secara patologis ( Sudiana, 2008). Apoptosis merupakan suatu proses regulasi penting untuk mencegah perkembangan kanker. Peningkatan jumlah sel yang mengalami apoptosis selama tahap inisiasi karsinogenesis kolon merupakan hasil dari peningkatan eliminasi sel dengan cedera DNA (*DNA defect*) yang dapat berkembang menjadi keganasan.

Butirrat dapat merangsang timbulnya apoptosis secara *in vitro* pada sel Caco-2 melalui jalur mitokondria dengan cara mengaktifasi gen proapoptosis BAX serta hambatan gen antiapoptosis BCL-2 sehingga terjadi translokasi sitokrom C dari mitokondria ke sitosol kemudian berikatan dengan *Apopotic protease activating factor 1* ( Apaf1) mengaktifkan aktifasi kaskade kaspase melalui kaspase 9 sehingga kaspase 3 berikatan dengan DNAase memecah DNA menjadi fragmen dan terjadi apoptosis (Ruemmele *et al.*, 2003).

Pada penelitian ini digunakan *TUNEL assay* untuk mendeteksi terjadinya fragmentasi DNA yang merupakan ciri terjadinya apoptosis. Prinsip *TUNEL assay* adalah menyambung ujung 3-OH dari fragmen DNA dengan nukleotida yang telah dilabel secara acak dengan *digoxigenin* dengan bantuan enzim TDT (*Terminal Deoxynucleotide Transferase*). Pelabelan nukleotida dengan *digoxigenin* secara acak bertujuan untuk memicu ikatan antibodi anti *digoxigenin* dengan *digoxigenin*. Fragmen DNA yang telah disambung dengan nukleotida yang dilabel *digoxigenin* diikat dengan anti *digoxigenin peroxidase conjugate* yang mengikat DAB sehingga sel akan berwarna kecoklatan.

Pada penelitian ini didapati bahwa tidak terdapat perbedaan jumlah sel epitel kolon yang mengalami apoptosis pada semua kelompok perlakuan ( $p= 0,129$  ;  $p > 0,05$ ), sehingga dapat dikatakan bahwa butirrat mampu menghambat ekspresi p53 mutan pada sel epitel kolon akibat induksi DMBA tanpa melalui peningkatan apoptosis sel. Hal ini disebabkan sel mampu menghentikan siklus sel dan memberikan waktu kepada sel untuk memperbaiki cedera DNA pada P53 sehingga sel tidak perlu dikorbankan untuk diapoptosiskan. Dan apoptosis yang terjadi pada penelitian ini merupakan apoptosis yang fisiologis bukan apoptosis patologis sebagai respon atas terjadinya cedera DNA yang tidak dapat diperbaiki oleh sel. Suatu apoptosis fisiologis berkaitan erat dengan enzim telomerase. Telomer yang terletak di ujung kromosom pada sel normal akan mengalami pemendekan pada waktu sel membelah diri. Jika ukuran telomer mencapai ukuran tertentu akibat pembelahan yang berulang maka sel tidak mampu membelah lagi sehingga akan terjadi fragmentasi kromosom dan akhirnya sel mengalami apoptosis fisiologis.

Hasil penelitian ini tidak mendukung penelitian sebelumnya seperti yang dilaporkan oleh Le-Leu *et al* (2002) yang melakukan penelitian untuk menilai respon apoptosis akut atas induksi bahan karsinogen pada tikus. Tikus diberi diet tiga macam karbohidrat yang berbeda (pati resisten, *wheat bran*, selulosa) selama 4 minggu kemudian diinduksi dengan *Azoxymethane* untuk membuat DNA cedera. Hasil penelitian ini didapati bahwa *wheat bran* meningkatkan konsentrasi butirrat fekal dan kolon serta dapat meningkatkan apoptosis sebagai respon atas induksi bahan karsinogen pada tikus. Peningkatan konsentrasi butirrat tersebut berkorelasi positif dengan indeks apoptosis. Mastutik G (2000) juga melaporkan bahwa pemberian selulosa selama 14 hari pada mencit kemudian diinduksi dengan DMBA 10 mg/100g BB akan meningkatkan jumlah sel epitel kolon yang mengalami apoptosis.

Perbedaan hasil penelitian ini mungkin disebabkan dosis butirrat yang diberikan pada mencit sebesar dosis 2,5 g/kgBB, mampu meningkatkan aktivitas GADD45 yang berperan dalam mekanisme *DNA repair* sehingga cedera DNA dapat diatasi melalui mekanisme *DNA repair*, tidak melalui peningkatan apoptosis sel untuk mengeliminasi sel dengan cedera DNA. Dosis 2,5 g/kgBB yang diberikan pada mencit merupakan 50% dari dosis maksimal (5 g/kg BB) yang dapat diberikan per oral kepada mencit (Egorin *et al.*, 1999). Pemberian butirrat sebesar 5 g/kg BB per oral kepada mencit, akan mencapai konsentrasi plasma butirrat sebesar 9 mM (setelah 15 menit pemberian) (Egorin *et al.*, 1999). Konsentrasi normal butirrat kolon pada rodent sekitar 1 - 4mM (Fan *et al.*, 1999). Butirrat mampu meningkatkan ekspresi GADD45 berdasarkan penelitian oleh Ragione *et al* (2001) yang melaporkan bahwa secara invitro sel HT-29 yang

diinkubasikan dengan 2mM sodium butirat akan meningkatkan ekspresi GADD45 sebesar  $3 \pm 0,4$  kali dibandingkan tanpa diinkubasikan dengan butirat. Dan peningkatan ekspresi GADD45 ini sama dengan peningkatan ekspresi GADD45 jika diinkubasikan dengan *trichostatin A* (TSA), suatu inhibitor HDAC yang sangat poten (Hassig *et al*, 1997). Chen *et al* (2002) melaporkan bahwa butirat memiliki kemampuan yang sama dengan TSA untuk menghentikan siklus sel serta induksi GADD45 pada sel line kanker kolon manusia SW 620. Dronmraju *et al* (2008) juga melaporkan bahwa pada penderita kanker kolorektal yang diberi diet pati resisten, suatu substrat utama yang difermentasi oleh mikroflora kolon menghasilkan butirat; akan meningkatkan ekspresi GADD45 sebanyak dua kali lebih tinggi dibandingkan dengan tanpa pemberian pati resisten pada diet ( $p = 0,04$ ).

Pada penelitian ini dosis DMBA yang diberikan yaitu 10 mg/ 100 g BB sesuai dengan penelitian oleh Mastutik G (2000) yang melaporkan terjadinya peningkatan sel epitel kolon yang mengalami apoptosis akibat pemberian selulosa. Peningkatan sel epitel kolon yang mengalami apoptosis mungkin disebabkan karena konsentrasi butirat yang dihasilkan selulosa melalui fermentasi oleh mikroflora kolon belum mampu meningkatkan ekspresi GADD45 sehingga sel dengan cedera DNA tidak dapat diperbaiki melalui mekanisme DNA *repair* kemudian sel dengan cedera DNA tersebut diapoptosiskan. Konsentrasi butirat di sepanjang kolon dipengaruhi oleh jenis dan kecepatan fermentasi karbohidrat di kolon. Karbohidrat yang difermentasi cepat, seperti pati resisten dan NSP yang larut; akan menghasilkan konsentrasi butirat dalam jumlah yang besar dibandingkan dengan NSP yang tidak larut seperti selulosa, *wheat bran* yang

proses fermentasinya berlangsung lebih lambat (Le Leu *et al.*, 2002). Le Leu *et al* (2002) melaporkan bahwa konsentrasi butirir pada sekum tikus yang dihasilkan dari penambahan selulosa 5% ke makanan hanya  $4,0 \pm 1,0 \mu\text{mol/gr}$ .

Pada penelitian ini didapati bahwa pemberian butirir dengan dosis 2,5 gr/kg BB kemudian diinduksi DMBA 10 mg/100 gr BB, terjadi peningkatan sel epitel kolon yang mengalami apoptosis pada kelompok perlakuan yang diberi butirir dan diberi DMBA walaupun setelah dianalisa statistik tidak terdapat perbedaan antar semua kelompok perlakuan. Peningkatan jumlah sel yang mengalami apoptosis pada kelompok perlakuan yang diberi butirir dan diberi DMBA, mungkin disebabkan karena hanya sebahagian kecil sel yang mengalami cedera DNA yang gagal diperbaiki melalui DNA *repair* sehingga sel yang mengalami cedera DNA tersebut dieliminasi melalui apoptosis (apoptosis patologis). Hal ini memperlihatkan bahwa apoptosis yang terjadi pada kelompok perlakuan yang diberi butirir dan diberi DMBA merupakan apoptosis fisiologis dan juga apoptosis patologis sebagai respon untuk mengeliminasi sel yang mengalami cedera DNA. Keadaan ini dapat menjelaskan mengapa jarak antara nilai minimal dengan nilai maksimal sangat lebar. Sehingga pada penelitian ini didapati bahwa butirir mampu menghambat ekspresi p53 mutan terutama melalui mekanisme DNA *repair* daripada melalui mekanisme apoptosis sel, yang dibuktikan dari didapati lebih sedikit jumlah sel yang mengekspresi p53 mutan pada kelompok perlakuan yang diberi butirir dan diberi DMBA dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang tidak diberi butirir dan diberi DMBA ( $p < 0,0001$ ) serta tidak terdapat perbedaan jumlah sel yang mengalami apoptosis pada semua kelompok perlakuan ( $p = 0,129$ ).

## BAB 7

### PENUTUP

#### 7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Jumlah sel epitel yang mengekspresikan protein p53 mutan pada kolon mencit yang diberi butirat dan diinduksi 9,10-dimethyl-1,2-benz(a)anthracene (DMBA) lebih sedikit daripada jumlah sel epitel yang mengekspresikan protein p53 mutan pada kolon mencit tanpa diberi butirat namun diinduksi DMBA dan ini berbeda sangat signifikan ( $p < 0,0001$ )
2. Jumlah sel epitel yang mengalami apoptosis pada kolon mencit yang diberi butirat dan diinduksi DMBA tidak berbeda ( $p > 0,05$ ) dengan jumlah sel epitel yang mengalami apoptosis pada kolon mencit tanpa diberi butirat namun diinduksi DMBA.
3. Butirat tidak merangsang apoptosis sel epitel kolon akibat pemberian DMBA, hal ini dimungkinkan oleh karena pemberian butirat menyebabkan sel mampu memperbaiki DNA sel yang rusak melalui mekanisme *DNA repair*.
4. Butirat memiliki efek protektif terhadap karsinogenesis kolon melalui hambatan terhadap ekspresi p53 mutan pada sel epitel kolon yang diinduksi DMBA.

## 7.2 Saran

1. Diperlukan penelitian lanjut bidang molekuler untuk mengetahui gen yang diregulasi oleh butirrat pada mekanisme DNA *repair*.
2. Diperlukan penelitian lanjut untuk pengembangan butirrat sebagai bahan anti kanker



## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah M. 2006. Tumor kolorektal. In (Sudoyo AW, Setiyohadi B, Alwi I, Simadibrata M, Setiati S, eds). Buku ajar ilmu penyakit dalam, edisi IV. Jakarta: Pusat Penerbitan Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, pp 375-80.
- Agus P. 2004. Analisis molekuler patogenesis karsinoma sel squamosa rongga mulut berdasarkan pola mutasi gen p53 dan p16. Disertasi, Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya.
- Al-Attar AM. 2004. The influence of dietary grapeseed oil on dmbs-induced liver enzymes disturbance in the frog, *Rana ridibunda*. Pakistan Journal of Nutrition 3 (5): 304-309.
- American Cancer Society. 2005. Colorectal cancer facts and figures special edition. Atlanta: American Cancer Society.
- Archer SY, Meng S, Shei A, Hodin RA. 1998. p21<sup>WAF1</sup> is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. PNAS 95(12): 6791-96.
- Attardi LD and Jacks T. 1999. The role of p53 in tumour suppression: lessons from mouse models. Cellular and Molecular Life Sciences 55: 48-63.
- Augenlicht LH, Mariadason JM, Wilson A *et al.* 2002. Short chain fatty acids and colon cancer. J of Nutr 132: 3804S-08S.
- Bayer EA, Skutelsky E, Wilchek M. 1979. The avidin-biotin complex in affinity cytochemistry. Methods Enzymol 62, 308-315.
- Biro Registrasi Kanker Departemen Patologi Fakultas Kedokteran UNAIR Surabaya. 2009. Data Kanker Kolon 2002-2005.
- Brooks GF, Butel JS, Morse SA. 2007. Normal microbial flora of the human body. In Medical Microbiology, 24<sup>th</sup> ed. USA: McGraw Hill, pp 198-9.
- Carew JS, Giles FJ, Nawrocki ST. 2008. Histone deacetylase inhibitors: Mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. Cancer Letters 269: 7-17
- Chen Z, Clark S, Birkeland M, et al. 2002. Induction and superinduction of growth arrest and DNA damage gene 45 (GADD45)  $\alpha$  and  $\beta$  messenger RNAs by histone deacetylase inhibitors trichostatin A (TSA) and butyrate in SW620 human colon carcinoma cells. Cancer Letters 188 : 127-140

- Coons AH, Creech HJ, Jones RN. 1941. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med* 47:200–202
- Compher CW, Frankel WL, Tazelaar J, et al. 1999. Wheat bran decreases aberrant crypt foci, preserves normal proliferation, and increases intraluminal butyrate levels in experimental colon cancer. *J Parenter Enteral Nutr* 23:269-78
- Davie JR. 2003. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr* 133:2485S-93
- Dronamraju SS, Coxhead JM, Kelly SB, Burn J, Mathers JC. 2009. Cell kinetics and gene expression changes in colorectal cancer patients given resistant starch: a randomised controlled trial. *Gut* 58: 413-20
- Egorin MJ, Yuan ZM, Sentz DL, Plaisance K, Eiseman JL. 1999. Plasma pharmacokinetics of butyrate after intravenous administration of sodium butyrate or oral administration of tributyrin or sodium butyrate to mice and rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 43:445-53
- Emenaker NJ, Calaf GM, Cox D, Basson MD, Qureshi N. 2001. Short chain fatty acids inhibit invasive human colon cancer by modulating uPA, TIM-1, TIMP-2, mutant p53, Bcl-2, Bax, p21 and PCNA protein expression in an in vitro cell culture model. *J of Nutr* 131: 3041S-46S.
- Eout- Houllier G, Fulcrand G, Jaulin LM, Jaulin C. 2009. Histone deacetylase inhibitors and genomic instability. *Cancer Letters* 274 : 169–176
- Eroschenko VP. 2003. Sistem pencernaan : usus halus dan besar. In *Atlas histologi diFiore dengan korelasi fungsi*, edisi 6. Jakarta: EGC, pp 205
- Fan YY, Zhang J, Barhoumi R, et al. 1999. Antagonism of CD95 signaling blocks butyrate induction of apoptosis in young adult mouse colonic cells. *Am J Physiol* 277: C310-9
- Fawcett DW. 2002. Usus. In *Buku ajar histologi*, edisi 12. Jakarta: EGC, pp 569-73.
- Femia AP, Luceri C, Dolara P, et al. 2002. Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the prebiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* 23: 1953-60.
- Fox SI. 2004. Digestive System. In *Human physiology*, 8<sup>th</sup> ed. New York: Mc Graw Hill, pp 572-4
- Gibson GR and Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J of Nutrition* 125: 1401-12.

- Gibson GR. 1999. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *J Nutr* 129: 1438S–1441S.
- Gray H. 2003. Organ of digestion. In *Gray's anatomy*. London: Chrysalis Books, pp 609-13.
- Hanafiah KA. 2005. Prinsip percobaan dan perancangannya. In *Rancangan percobaan aplikatif*. Jakarta : Raja Grafindo Persada, pp 1-18.
- Hardy RG, Meltzer SJ, Jankowski JA. 2000. Molecular basis for risk factors. *BMJ* 321: 886-889.
- Haskell CM. 2001. Colorectal Cancer. In *Cancer treatment*. Philadelphia: W.B.Saunders Company, pp 703-7
- Hassig CA, Tong JK, Schreiber SL. 1997. Fiber-derived butyrate and the prevention of colon cancer. *Chemistry & Biology* 4:783-9
- Henningson I, Björck I, Nyman M. 2001. Short-chain fatty acid formation at fermentation of indigestible carbohydrates. *Scandinavian Journal of Nutrition* 145: 165-8.
- Hijova E and Chmelarova A. 2007. Short chain fatty acids and colonic health. *Bratisl Lek Listy* 108(8): 354-8.
- Hinnebusch BF, Meng S, Wu JT, Archer SY, Hodin RA. 2002. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J of Nutr* 132(5): 1012-7.
- Kiefer J, Beyer-Sehlmeyer G, Pool-Zobel BL. 2006. Mixtures of SCFA, composed according to physiologically available concentrations in the gut lumen, modulate histone acetylation in human HT29 colon cancer cells. *British Journal of Nutrition* 96: 803–810.
- Kumar V, Abbas AK., Fausto N. 2005. Neoplasia. In *Robins and Cotran Pathologic basis of disease*, 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier, pp 269-33.
- Kumar V, Abbas AK., Fausto N. 2005. Small and large intestines. In *Robins and Cotran Pathologic basis of disease*, 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier, pp 828-64.
- Leeson CR, Leeson TS, Paparo AA. 1996. Saluran cerna yang berbentuk tabung. In *Buku ajar histologi*, edisi 5. Jakarta: Penerbit buku kedokteran EGC, pp 347-9
- Leu Leu, Hu Y, Young GP. 2002. Effect of resistant starch and non starch polysaccharides on colonic luminal environment and genotoxin-induced apoptosis in the rat. *Carcinogenesis* 23(5): 713-9

- Liong MT. 2008. Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: postulated mechanisms and in-vivo evidence. *Int J Mol Sci* 9: 854-863.
- Louis P and Flint HJ. 2009. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett* 294 :1-8.
- MacFarlane S and Macfarlane GT. 2003. Regulation of short chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrient Society* 62: 67-72.
- Martini FH. 2001. The digestive system. In *Fundamentals of anatomy & physiology*, 5<sup>th</sup> ed. New Jersey : Prentice Hall, Inc, 882-5.
- Mastutik G. 2004. Mekanisme proteksi selulosa terhadap karsinogenesis sel epitel kolon mencit jantan. Tesis, Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya.
- McIntyre A, Gibson PR, Young GP. 1993. Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model. *Gut* 34: 386-91.
- Medina V, Afonso JJ, Alvarez-Arguelles H, Hernandez C, Gonzalez F. 1998. Sodium butyrate inhibits carcinoma development in a 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon cancer. *J Parenter. Enteral Nutr* 22: 14-7.
- Ragionea DF, Crinitia V, Pietraa VD, *et al.* 2001. Genes modulated by histone acetylation as new effectors of butyrate activity. *FEBS Letters* 499: 199-204
- Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. 2003. Digestive system II: Esophagus & Gastrointestinal Tract. In *Histology a text & atlas*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp 501-7.
- Ruemmele FM, Schwartz S, Seidman EG *et al.* 2003. Butyrate induced Caco-2 cell apoptosis is mediated via the mitochondrial pathway. *Gut* 52: 94-100.
- Semenza JC and Weasel LH. 1997. Molecular epidemiology in environmental health: the potential of tumor suppressor gene p53 as a biomarker. *Environmental Health Perspectives Supplements* 105(S1): 155-63
- Singh J, Revison A, Tomita A, *et al.* 1997. Bifidobacterium longum, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 18: 833-41.
- Soergel KH. 1994. Colonic fermentation: metabolic and clinical implications. *Clin Investig* 72: 742-8.
- Soetiarso F. 1996. Registrasi Kanker Populasi di Kodya Ujung Pandang, Yogyakarta dan Semarang 1996. Center for Research and Development of Disease Control, NIHRD.

- Sudiana IK. 2005. Teknologi ilmu jaringan dan imunohistokimia. Jakarta: Sagung Seto, pp 36-46.
- Sudiana IK. 2008. Patobiologi molekular kanker. Jakarta: Salemba Medika, pp 45-60.
- Sudjana.2000. Analisis varians. In Metoda statistika,edisi 6. Bandung: Tarsito, pp 299-307
- Topping DL and Clifton PM. 2001. Short chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews* 81(3): 1031-35.
- Vernazza CL, Rabiou BA, Gibson GR. 2006. Human colonic microbiology and the role of dietary intervention: introduction to prebiotics. In ( Gibson GR and Rastall RA, eds). *Prebiotics: development and application*. Oxford: Wiley Press, pp 1-6.
- Wilson LM & Lester LB. 1995. Usus besar. In *Patofisiologi konsep klinis proses-proses penyakit*, edisi 4. Jakarta: EGC, pp 409-10
- Wong JM and Jenkin DJ. 2007. Carbohydrate digestibility and metabolic effects. *J Nutr* 137: 2539S-46S.
- Wong JM, Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. 2006. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 40(3): 235-43.
- Yang SK & Silverman BD. 1988. Polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogenesis: structure-activity relationships. Florida: CRC, pp156-58
- Young GP, Chai F, Zalewski P. 1999. Polysaccharide fermentation, butyrate and apoptosis in the colonic epithelium. *Asia Pasific J Clin Nutr* 8: S27-31.
- Yuspa SH & Shields PG. 2001. Etiology of cancer chemical factors. In ( Freeman JS, ed) *Cancer principles & practice of oncology*, 6<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp 179-88
- Zainuddin M. 1999. Metodologi penelitian. Surabaya: Airlangga Univ Press, pp 54

**Lampiran 1**

**Lampiran Hasil Analisis statistik**

**NPar Tests**

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		BB
N		27
Normal Parameters a,b	Mean	25.8519
	Std. Deviation	.71810
Most Extreme Differences	Absolute	.248
	Positive	.233
	Negative	-.248
Kolmogorov-Smirnov Z		1.291
Asymp. Sig. (2-tailed)		.071

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

**Oneway**

**Descriptives**

BB

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	9	25.6667	.70711	.23570	25.1231	26.2102	25.00	27.00
2.00	9	25.8889	.60093	.20031	25.4270	26.3508	25.00	27.00
3.00	9	26.0000	.86603	.28868	25.3343	26.6657	25.00	27.00
Total	27	25.8519	.71810	.13820	25.5678	26.1359	25.00	27.00

**ANOVA**

BB

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.519	2	.259	.483	.623
Within Groups	12.889	24	.537		
Total	13.407	26			

**Post Hoc Tests**

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: BB

LSD

(I) grup	(J) grup	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-.22222	.34546	.526	-.9352	.4908
	3.00	-.33333	.34546	.344	-1.0463	.3797
2.00	1.00	.22222	.34546	.526	-.4908	.9352
	3.00	-.11111	.34546	.751	-.8241	.6019
3.00	1.00	.33333	.34546	.344	-.3797	1.0463
	2.00	.11111	.34546	.751	-.6019	.8241

**Lampiran 2**

**NPar Tests**

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		p53	apoptosis
N		27	27
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	1.2963	44.1111
	Std. Deviation	1.61280	60.80570
Most Extreme Differences	Absolute	.308	.234
	Positive	.308	.222
	Negative	-.211	-.234
Kolmogorov-Smirnov Z		1.599	1.216
Asymp. Sig. (2-tailed)		.012	.104

- a. Test distribution is Normal.
- b. Calculated from data.

**NPar Tests**

**Kruskal-Wallis Test**

**Ranks**

grup	N	Mean Rank
p53 1.00	9	8.39
2.00	9	22.67
3.00	9	10.94
Total	27	

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	p53
Chi-Square	19.412
df	2
Asymp. Sig.	.000

- a. Kruskal Wallis Test
- b. Grouping Variable: grup

**NPar Tests**

**Mann-Whitney Test**

**Ranks**

grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks
p53 1.00	9	5.00	45.00
2.00	9	14.00	126.00
Total	18		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	p53
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	45.000
Z	-3.761
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: grup

### NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks

	grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks
p53	1.00	9	8.39	75.50
	3.00	9	10.61	95.50
	Total	18		

Test Statistics<sup>b</sup>

	p53
Mann-Whitney U	30.500
Wilcoxon W	75.500
Z	-1.215
Asymp. Sig. (2-tailed)	.224
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.387 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: grup

### NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks

	grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks
p53	2.00	9	13.67	123.00
	3.00	9	5.33	48.00
	Total	18		

Test Statistics<sup>b</sup>

	p53
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	48.000
Z	-3.419
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: grup



**Lampiran 3**

**Oneway**

**Descriptives**

apoptosis								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	9	25.1111	31.36258	10.45419	1.0037	49.2185	.00	95.00
2.00	9	29.7778	33.08239	11.02746	4.3484	55.2072	3.00	97.00
3.00	9	77.4444	89.72752	29.90917	8.4738	146.4151	1.00	218.00
Total	27	44.1111	60.80570	11.70206	20.0572	68.1650	.00	218.00

**ANOVA**

apoptosis					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15098.000	2	7549.000	2.236	.129
Within Groups	81032.667	24	3376.361		
Total	96130.667	26			

**Post Hoc Tests**

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: apoptosis

LSD

(I) grup	(J) grup	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-4.66667	27.39165	.866	-61.2003	51.8669
	3.00	-52.33333	27.39165	.068	-108.8669	4.2003
2.00	1.00	4.66667	27.39165	.866	-51.8669	61.2003
	3.00	-47.66667	27.39165	.095	-104.2003	8.8669
3.00	1.00	52.33333	27.39165	.068	-4.2003	108.8669
	2.00	47.66667	27.39165	.095	-8.8669	104.2003

**Lampiran 4**

**Data penghitungan jumlah sel yang mengekspresikan p53 mutan dan apoptosis**

<b>Kelompok</b>	<b>p53 mutan</b>	<b>Apoptosis</b>
I.1	0	95
I.2	0	0
I.3	0	2
I.4	0	0
I.5	0	32
I.6	0	47
I.7	0	0
I.8	0	29
I.9	1	21
II.1	3	6
II.2	4	41
II.3	3	3
II.4	4	4
II.5	2	8
II.6	2	97
II.7	5	42
II.8	4	61
II.9	2	6
III.1	0	62
III.2	0	42
III.3	0	161
III.4	0	2
III.5	2	198
III.6	0	1
III.7	1	2
III.8	0	218
III.9	2	11

## Lampiran 5

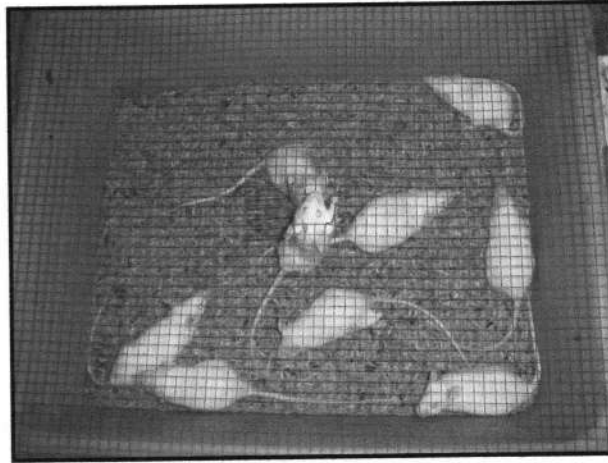
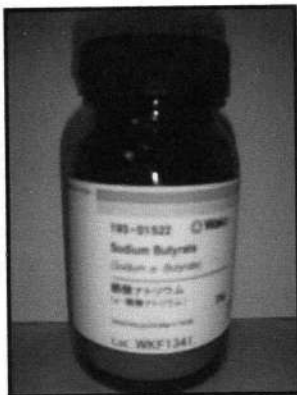
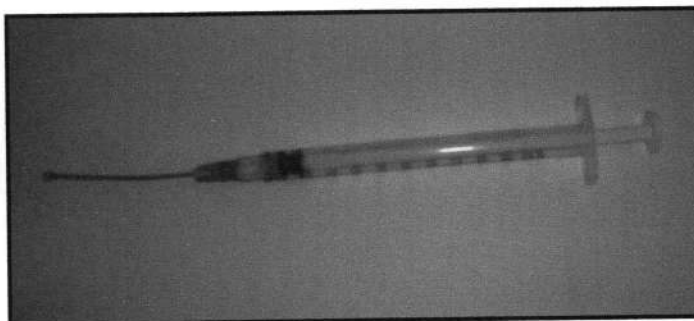
### Prosedur Pemeriksaan Imunohistokimia

1. Lakukan deparaffinisasi dengan cara memasukkan sayatan jaringan kedalam xylol sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit
2. Dilakukan hidrasi :
  - etanol absolut selama 5 menit
  - etanol 95 % selama 5 menit
  - etanol 80 % selama 5 menit
3. Dicuci dengan aquadest selama 10 menit
4. Masukkan sediaan ke dalam cairan retrieveal (DAKO) 1:10, kemudian masukkan kedalam microwave :
  - a. Dengan temperatur tinggi sampai mendidih ( 3-4 menit)
  - b. Dengan temperatur rendah selama 27 menitKeluarkan sediaan dari microwave, biarkan sampai larutan retrieveal jernih dan dingin ( antara 45-60 menit)
5. Inkubasi dengan Proteinase-K selama 15 menit dalam suhu kamar
6. Cuci dengan PBS 2 kali ( masing-masing 5 menit)
7. Inkubasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% selama 10 menit , temperatur ruangan
8. Cuci dengan PBS 2 kali ( masing-masing 5 menit)
9. Dicuci dengan aquadest selama 10 menit
10. Cuci dengan PBS 2 kali ( masing-masing 5 menit)
11. Masukkan kedalam monoklonal antibodi primer rat anti mouse: 30 menit
12. Cuci dengan PBS 2 kali ( masing-masing 5 menit)
13. Masukkan kedalam monoklonal sekunder antibodi rabbit anti rat : 30 menit
14. Cuci dengan PBS 2 kali ( masing-masing 5 menit)
15. Masukkan ke dalam sterptavidin/avidin HRP label : 30 menit
16. Cuci dengan PBS 2 kali ( masing-masing 5 menit)
17. Masukkan ke dalam substrat kromogen : 10 menit
18. Cuci dengan PBS 2 kali ( masing-masing 5 menit); kemudian dibilas dengan aquadestilata
19. Counter stain dengan methyl green selama : 6 menit
20. Cuci dengan air mengalir selama 10 menit
21. Dehidrasi-clearing-mounting

## Lampiran 6

### Prosedur Pewarnaan TUNEL *assay*

1. Lakukan deparafinisasi jaringan
  - a. Cuci spesimen 3 x dengan xylene masing-masing 5 menit
  - b. Cuci spesimen 2 x dengan etanol absolut, masing-masing 5 menit
  - c. Cuci spesimen 1 x dengan etanol 95%, dan 1x dengan etanol 70% masing-masing selama 3 menit
  - d. Cuci spesimen 1x dengan PBS 5 menit
2. Teteskan proteinase K ( 20 $\mu$ g/ml) langsung pada spesimen ( 60  $\mu$ L/5 cm<sup>2</sup>) selama 15 menit
3. Cuci spesimen 2x dengan dH<sub>2</sub>O coplin jar masing-masing 2 menit
4. Teteskan 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalam PBS selama 5 menit pada suhu kamar
5. Cuci spesimen 2x dengan PBS masing-masing selama 2 menit dalam coplin jar
6. Segera teteskan (75 $\mu$ L/5 cm<sup>2</sup>) equilibration buffer langsung pada spesimen dan inkubasi paling sedikit 10 menit pada suhu kamar
7. Segera teteskan 55 $\mu$ L/5 cm<sup>2</sup> working strength TdT enzyme pada potongan jaringan, inkubasikan selama 1 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C dalam wadah lembab
8. Letakkan pesimen dalam coplin jar yang berisi working strength stop/wash buffer, goncangkan selama 15 detik kemudian diinkubasikan selama 10 menit pada suhu kamar
9. Keluarkan Anti-Digoxigenin Peroksidase Conjugate dari tempat penyimpanan dan hangatkan pada suhu kamar
10. Cuci spesimen 3x dengan PBS masing-masing 1 menit
11. Teteskan Anti-Digoxigenin Peroksidase Conjugate pada sediaan sebanyak 65 $\mu$ L/5 cm<sup>2</sup>, inkubasikan selama 30 menit dalam tempat yang lembab
12. Cuci spesimen 4 x dengan PBS dalam coplin jar , masing-masing selama 2 menit pada suhu kamar
13. Teteskan Peroxidase substrate , biarkan selama 10 menit pada suhu kamar
14. Cuci spesimen 3x dengan dH<sub>2</sub>O dalam coplin jar selama 5 menit pada suhu kamar
15. Teteskan 0,5% fast green : 10 menit, suhu kamar
16. Cuci spesimen 3x dengan dH<sub>2</sub>O masing-masing 5 menit
17. Dehidrasi-clearing-mounting

**Lampiran 7****BAHAN DAN ALAT PENELITIAN****Mencit Balb/c jantan , 12 minggu****Sodium butirrat ( WAKO)****Larutan sodium butirrat****Dimethyl-benz(a)anthracene (WAKO)****Jarum sonde**



**KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
("ETHICAL CLEARANCE")**

**No. 04/EC/KEPK/FKUA/2009**

KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA, TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN BERJUDUL :

**Efek Hasil Fermentasi Karbohidrat oleh Mikroflora Kolon:  
Butirat terhadap Ekspresi p53 dan Apoptosis pada Sel Epitel Kolon Mencit Balb/c Jantan  
Setelah diinduksi 9,10-dimethyl-1,2-benz(a)Anthracene (DMBA)**

PENELITI UTAMA :

**Cherry Siregar, dr**

UNIT / LEMBAGA / TEMPAT PENELITIAN :

- **Unit Hewan Coba Lab. Ilmu Biokimia FK Unair**
- **Lab. Patobiologi-GRAMIK FK Unair**

**DINYATAKAN LAIK ETIK.**



Surabaya, 20 April 2009

*[Signature]*  
**Prof. H.M. Sajid Darmadipura, dr., SpS, SpBS**  
NIP : 130604278