

TESIS

EFEK *Curcuma zedoaria* TERHADAP  
PENINGKATAN APOPTOSIS SEL MUKOSA  
KOLON MENCIT JANTAN YANG TERPAPAR  
*9,10-dimethyl-1,2-benz(a)anthracene*

TKD 02 67

Sun  
2



**JUDYA SUKMANA**

090114238 M

PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

2006



**EFEK *Curcuma zedoaria* TERHADAP  
PENINGKATAN APOPTOSIS SEL MUKOSA  
KOLON MENCIT JANTAN YANG TERPAPAR  
*9,10-dimethyl-1,2-benz(a)anthracene***

TESIS

**Untuk memperoleh Gelar Magister  
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar  
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh :

**JUDYA SUKMANA**

090114238 M

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

Tanggal 29 Maret 2006

Lembar pengesahan

**TESIS INI TELAH DISETUJUI  
TANGGAL 29 MARET 2006**

Oleh :

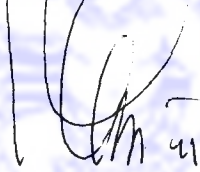
**Pembimbing Ketua**



**Prof. Dr. Roemwerdiniadi Soedoko, dr., SpPA**

**NIP 130 197 905**

**Pembimbing**



**Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., MS**

**NIP 130 934 628**

**Mengetahui,**

**Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar**

**Program Pascasarjana Universitas Airlangga**



**Prof. Retno Handajani, dr., MS., PhD**

**NIP 130 541 984**

Telah diuji pada

Tanggal 29 Maret 2006

PANITIA PENGUJI TESIS

**Ketua** : Dr. I. Ketut Suidiana, drs., MS

**Anggota** : 1. Prof. Dr. Roemwerdiniadi Soedoko, dr.,SpPA

2. Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr.,MS

3. Dr. Hari Basuki, dr., M.Kes

4. Drh. Hani Plumeriastuti, M.Kes



## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur alhamdulillah saya panjatkan kepada Allah SWT, karena telah melimpahkan rahmat dan hidayahNYA sehingga saya mendapat kesempatan untuk melanjutkan pendidikan program magister dan menyelesaikan tesis ini. Saya mengucapkan terima kasih pada kesempatan ini kepada semua pihak yang telah membantu saya dalam menempuh pendidikan program magister dan menyelesaikan tesis ini. Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya khususnya saya tujukan kepada :

1. Prof. Dr. Roemwerdiniadi Soedoko, dr.,SpPA, selaku pembimbing ketua yang telah memberikan pengarah dan tambahan wawasan keilmuan dan pemikiran, saya sangat berhutang budi kepada beliau atas waktu yang diberikan kepada saya untuk membimbing, mengoreksi serta memberi saran dalam pelaksanaan penelitian dan penulisan tesis ini dengan sabar dan bijak.
2. Prof.Dr. Suhartono Taat Putra,dr.,MS, selaku pembimbing yang telah banyak memberikan pengarah, tambahan wawasan keilmuan dan pemikiran, saya sangat berterima kasih dan berhutang budi kepada beliau atas waktu yang diberikan kepada saya untuk membimbing, mengoreksi dan memberikan saran dalam penelitian dan penulisan tesis ini serta selaku ketua minat Patobiologi yang telah banyak membantu kelancaran proses belajar selama mengikuti pendidikan program magister.
3. Prof. Soengeng Soekamto Martoprawiro dr., MS., PhD.,SpPA (Alm) selaku mantan Kepala Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah membantu dalam kelancaran proses belajar.

4. Pemerintah Republik Indonesia yang telah menyediakan fasilitas pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
5. Rektor Universitas Airlangga, Direktur Program Pascasarjana dan Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Pascasarjana di Universitas Airlangga.
6. Rektor Universitas Hang Tuah Surabaya, Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hang Tuah Surabaya yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Pascasarjana di Universitas Airlangga.
7. Dr. I.Ketut Sudiana, drs.,MS, selaku penguji dan guru yang telah membantu dalam pembacaan dan pemotretan hasil pewarnaan TUNEL Assay serta telah memberikan saran dan jawaban atas segala pertanyaan saya, yang meluaskan wawasan saya dalam penelitian dan penyusunan tesis ini.
8. Kepada rekan-rekan peserta didik Program Magister minat Patobiologi angkatan 2001
9. Bapak Supardi dan Sukadi dari UPT Hewan Coba Universitas Airlangga atas bantuannya dalam menangani mencit, Lenny Irawati, Amd dari Laboratorium Patobiologi Gramik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga – RSU Dr. Soetomo atas bantuannya dalam pewarnaan.

Ucapan terima kasih yang tak terhingga atas rasa cinta, kasih dan sayang, saya tunjukan kepada :

1. Kedua orang tua saya Bapak Prof.H. Soegeng Soekamto Martoprawiro dr., MS., PhD.,SpPA (Alm) dan Ibu Hj. Wahyu Puspitowati telah mendorong, membiayai, mendo'akan dan merestui saya untuk melanjutkan pendidikan program magister ini dan juga atas segala kasih sayang dalam membimbing, mendidik, mengajari dan

membesarkan saya untuk menjadi anak yang saleh, berbudi luhur. Semoga Allah SWT memberikan tempat yang mulia untuk bapak dan memberikan panjang umur serta kesehatan pada ibuku (Amin)

2. Isteri saya Ennie Nawang Wulandari, dr, yang telah mendorong, merestui dan mendo'akan saya untuk melanjutkan pendidikan program magister ini serta kesabarannya menemani dan mendengarkan segala kesulitan saya.
3. Kepada anakku Fildzah Arum Yudiani atas waktu yang telah saya ambil untuk kuliah dan penelitian ini.
4. Mertuaku Bapak H.Setiawan dan Ibu Hj. Annie Setiawan atas dorongan dukungan dan doa selama ini.
5. Kedua adikku Adi Widiyanto, dr dan Ari Permono Sukamto, ST atas dukungan dan doa selama ini.
6. Kepada semua pihak yang telah memberikan bantuan dalam penelitian dan penyusunan tesis ini namun tidak dapat disebutkan satu persatu.

Akhirnya dengan segala kelebihan dan kekurangan yang ada, tesis ini saya persembahkan kepada kedua orang tua saya yang telah memberikan asuhan kepada saya selama ini, semoga tesis ini berguna bagi yang membutuhkannya.

Surabaya, 29 Maret 2006

Penulis

## RINGKASAN

Kematian dan insiden akibat kanker kolon masih tinggi. Penggunaan tanaman obat seperti *Curcuma zedoaria* yang mempunyai khasiat sebagai obat anti kanker. Namun penggunaan efek *Curcuma zedoaria* terhadap peningkatan apoptosis sel mukosa kolon masih diperdebatkan.

Curcumin merupakan salah satu komponen utama *Curcuma zedoaria*. Curcumin mempunyai efek potensial di media lipopolysakarida yang akan merangsang aktivasi makrofag & mengaktifkan bax sehingga akhirnya dapat memicu apoptosis. Penelitian ini untuk mengetahui efek ekstrak *Curcuma zedoaria* terhadap apoptosis sel mukosa kolon mencit BALB/C jantan yang dipapar *9,10-Dimethyl-1,2-benz-(a)anthracene* (DMBA) dalam rangka membuktikan peningkatan apoptosis sel mukosa kolon.

Tujuan penelitian ini adalah membuktikan penurunan jumlah sel mukosa kolon yang mengalami apoptosis pada mencit yang dipapar DMBA dan peningkatan jumlah sel mukosa kolon yang mengalami apoptosis pada mencit yang tidak diberi ekstrak *Curcuma zedoaria*, diberi *Curcuma zedoaria* ekstrak 0,2 %, dan 0,6% setelah dipapar DMBA.

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang menggunakan mencit BALB/C jantan umur 12 minggu, dengan berat badan 25-35 gram. P1 = mencit tidak dipapar pelarut DMBA dan tidak diberi ekstrak *Curcuma zedoaria*, P2 = mencit dipapar pelarut DMBA dan tidak diberi ekstrak *Curcuma zedoaria*, P3 = mencit dipapar pelarut DMBA dan ekstrak *Curcuma zedoaria* 0,2 %, P4 = mencit dipapar pelarut DMBA dan ekstrak *Curcuma zedoaria* 0,6 %. DMBA diberikan selama 30 hari kemudian diberi ekstrak *Curcuma zedoaria*. Mencit dikorbankan setelah 60 hari setelah dipapar ekstrak *Curcuma zedoaria*. Kolon diambil untuk dilakukan pemrosesan dan pewarnaan dengan teknik *TUNEL Assay* dengan *apoptag detection kit*. Perbedaan jumlah apoptosis sel mukosa kolon mencit pada P1 dan P2 dapat diketahui dengan Uji



t 2 Sampel Bebas, sedangkan perbedaan jumlah apoptosis sel mukosa kolon mencit pada P2, P3, dan P4 diketahui dengan uji *Anova* yang dilanjutkan LSD.

Hasil uji t didapat  $t = 8,355$   $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ) menunjukkan perbedaan nyata jumlah sel mukosa kolon yang mengalami apoptosis pada mencit yang dipapar DMBA dan yang tidak dipapar DMBA. Pada mencit yang dipapar DMBA, jumlah sel mukosa kolon mengalami penurunan. Penurunan ini menunjukkan bahwa cedera DNA pada sel tersebut tidak dapat diperbaiki dan juga tidak dapat diapoptosiskan sehingga cedera DNA menjadi permanen. Hasil LSD  $f = 181.025$   $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ) juga menunjukkan perbedaan nyata dimana pemberian ekstrak *Curcuma zedoaria* 0,6 % lebih tinggi jumlah sel mukosa kolon yang mengalami apoptosis dibandingkan dengan pemberian ekstrak *Curcuma zedoaria* 0,2 %. Peningkatan ini menunjukkan bahwa sel yang DNANYa mengalami cedera dapat diapoptosiskan sehingga mencegah karsinogenesis.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah pemaparan DMBA dapat menurunkan jumlah sel mukosa kolon mencit jantan yang mengalami apoptosis, pemberian ekstrak *Curcuma zedoaria* pada mencit jantan dapat meningkatkan jumlah sel mukosa kolon mencit yang mengalami apoptosis setelah dipapar DMBA, pemberian ekstrak *Curcuma zedoaria* 0,6 % lebih efektif dibandingkan dengan pemberian ekstrak *Curcuma zedoaria* 0,2 % untuk meningkatkan jumlah sel mukosa kolon mencit yang mengalami apoptosis setelah dipapar DMBA

## SUMMARY

Death and incidence of colon cancer remains high. An effort to overcome the disease is by the use of medical herbs, such as *Curcuma zedoaria*, which has an anti-cancer effect. However, the effect of this plant on the apoptosis of colon mucosal cells is still controversial.

Curcumin is one of the primary components of *Curcuma zedoaria*. It has a potential effect in lipopolysaccharide media, which will stimulate macrophage activation and activate bax, leading to the triggering of apoptosis. This study was intended to identify the effect of *Curcuma zedoaria* extract on the apoptosis of colon mucosal cells of male BALB/C mice exposed to 9,10-Dimethyl-1,2-benz(a)anthracene (DMBA) to prove the increase and decrease of colon mucosal cell apoptosis.

The objective of this study was to prove the reduction of apoptotic colon mucosal cell number in mice exposed to DMBA and the increase of apoptotic colon mucosal cell number in mice receiving *Curcuma zedoaria* extract of 0%, 0.2 %, and 0.6% after being exposed to DMBA.

This was an experimental study using male BALB/C mice aged 12 weeks, with bodyweight of 25 - 35 grams. P1 = mice were not exposed to DMBA, and received 0% *Curcuma zedoaria*, P2 = mice were exposed to DMBA, P3 = mice were exposed to DMBA and 0.2% *Curcuma zedoaria* extract, and P4 = mice were exposed to DMBA and 0.6% *Curcuma zedoaria* extract. DMBA was given for 30 days, and then *Curcuma zedoaria* extract was given. The mice were sacrificed after 60 days exposure to *Curcuma zedoaria*. Colon was removed to be subjected to processing

and staining using *TUNEL Assay with apoptag detection kit*. The difference of apoptotic colon mucosal cell number in P1 and P2 could be found using Independent 2 Sample t test, while the difference of apoptotic colon mucosal cell number in P2, P3, and P4 was identified using anova test, followed with LSD test.

The result of t test showed  $t = 8.355$   $p = 0.000$  ( $p < 0.05$ ), indicating significant difference in apoptotic colon mucosal cell number between mice exposed to DMBA and those not exposed to DMBA. In DMBA-exposed mice, the number of colon mucosal cells reduced, indicating that DNA injury in those cells were irreparable and unapoptosized, so that it became permanent. The result of LSD test was as follows:  $f = 181.025$   $p=0.000$  ( $p < 0.05$ ), also indicating significant difference. In the administration of 0.6% *Curcuma zedoaria* extract the number of apoptotic colon mucosal cells was higher than that in groups receiving 0.2% extract. Such increase indicated that it was only cells with injured DNA that can be apoptosized to prevent carcinogenesis.

As a conclusion, DMBA exposure can reduce the number of apoptotic colon mucosal cells in male mice. The administration of *Curcuma zedoaria* extract to male mice can increase the number of apoptotic colon mucosal cells after being exposed to DMBA. The administration of 0.6% *Curcuma zedoaria* is more effective than the administration of 0.2% *Curcuma zedoaria* to increase the number of apoptotic colon mucosal cells after being exposed to DMBA.

## ABSTRACT

One of main components of *Curcuma zedoaria* is curcumin. It has a potential effect in lypopolysaccharide media, which will stimulate macrophage activation and activate bax, which finally leads to the triggering of apoptosis. The objective of this study was to prove the reduction of apoptotic colon mucosal cell number in mice exposed to *9,10-Dimethyl-1,2-benz-(a)anthracene* (DMBA) and the increase of apoptotic colon mucosal cell number in mice receiving *Curcuma zedoaria* extract of 0%, 0.2 %, and 0.6% after being exposed to DMBA.

This study used male BALB/C mice aged 12 weeks, with bodyweight of 25 - 35 grams. P1 = mice were not exposed to DMBA, and received 0% *Curcuma zedoaria*, P2 = mice were exposed to DMBA, P3 = mice were exposed to DMBA and 0.2% *Curcuma zedoaria* extract, and P4 = mice were exposed to DMBA and 0.6% *Curcuma zedoaria* extract. DMBA was given for 30 days, and followed with *Curcuma zedoaria* extract. The mice were sacrificed after 60 days exposure to *Curcuma zedoaria*. Colon was removed to be processed and stained using *TUNEL Assay with apoptag detection kit*. The difference of apoptotic colon mucosal cell number in P1 and P2 could be found using Independent 2 Sample t test, while the difference of apoptotic colon mucosal cell number in P2, P3, and P4 was identified using anava test, followed with LSD test.

The result of t test  $p = 0.000$  ( $p < 0.05$ ), indicating significant difference, in which there was a reduction in the number of apoptotic colon mucosal cells in DMBA-exposed mice. The result of LSD test was as showed  $p=0.000$  ( $p < 0.05$ ), also indicating significant difference, in which the administration of 0.6% *Curcuma zedoaria* extract the number of apoptotic colon mucosal cells was higher than that in groups receiving 0.2% extract.

DMBA exposure can reduce the number of apoptotic colon mucosal cells in male mice. The administration of *Curcuma zedoaria* extract to male mice can increase the number of apoptotic colon mucosal cells after being exposed to DMBA. The administration of 0.6% *Curcuma zedoaria* is more effective than the administration of 0.2% *Curcuma zedoaria* to increase the number of apoptotic colon mucosal cells after being exposed to DMBA.

**Key words :** *Curcuma zedoaria*, colon cancer, apoptosis

**DAFTAR ISI**

	<b>Halaman</b>
SAMPUL DALAM .....	i
PRASYARAT GELAR .....	ii
PERSETUJUAN .....	iii
PENETAPAN PANITIA .....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH .....	v
RINGKASAN.....	viii
SUMMARY .....	x
ABSTRAK .....	xii
DAFTAR ISI .....	xiii
DAFTAR GAMBAR .....	xv
DAFTAR TABEL .....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xviii
DAFTAR SINGKATAN .....	xix
<b>BAB I    PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang Masalah .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	4
<b>BAB II    TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 <i>Curcuma zedoaria</i> .....	5
2.2 Anatomi dan Morfologi Kolon .....	7
2.3 Apoptosis dalam Karsinogenesis.....	8

<b>BAB III</b>	<b>KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b>	
3.1	Kerangka Konseptual .....	15
3.2	Hipotesis Penelitian .....	17
<b>BAB IV</b>	<b>METODE PENELITIAN</b>	
4.1	Rancangan Penelitian .....	18
4.2	Populasi, Sampel dan Besar Sampel.....	19
4.3	Variabel Penelitian Definisi Operasional Variabel .....	19
4.4	Bahan Penelitian .....	20
4.5	Alat Penelitian .....	20
4.6	Tempat dan Waktu Penelitian .....	20
4.7	Prosedur Pelaksanaan Penelitian.....	21
4.8	Analisa Data .....	22
<b>BAB V</b>	<b>ANALISIS HASIL PENELITIAN</b>	
5.1	Data Penelitian.....	24
5.2	Analisis Data Hasil Penelitian.....	31
<b>BAB VI</b>	<b>PEMBAHASAN.....</b>	<b>33</b>
<b>BAB VII</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
7.1	Kesimpulan.....	39
7.2	Saran.....	39
	<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>40</b>
	<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>44</b>

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
<p>Gambar 5.1. Hasil pewarnaan HE pada sel mukosa kolon mencit BALB/C jantan yang diberi ekstrak <i>Curcuma zedoaria</i> dan setelah dipapar DMBA dengan pembesaran 400x .....</p>	25
<p>Gambar 5.2. Hasil pewarnaan dengan <i>apoptag detection kit</i> pada sel mukosa kolon mencit BALB/C jantan yang tidak diberi ekstrak <i>Curcuma zedoaria</i> dan tidak dipapar DMBA dengan pembesaran 400x.....</p>	26
<p>Gambar 5.3. Hasil pewarnaan dengan <i>apoptag detection kit</i> pada sel mukosa kolon mencit BALB/C jantan yang tidak diberi ekstrak <i>Curcuma zedoaria</i> dan dipapar DMBA dengan pembesaran 400x .....</p>	27
<p>Gambar 5.4. Hasil pewarnaan dengan <i>apoptag detection kit</i> pada sel mukosa kolon mencit BALB/C jantan yang diberi ekstrak <i>Curcuma zedoaria</i> 0,2 % dan dipapar DMBA dengan pembesaran 400x .....</p>	28
<p>Gambar 5.5. Hasil pewarnaan dengan <i>apoptag detection kit</i> pada sel mukosa kolon mencit BALB/C jantan yang diberi ekstrak <i>Curcuma zedoaria</i> 0,6% dan dipapar DMBA dengan pembesaran 400x .....</p>	29

**Gambar 5.6 Hasil pewarnaan dengan *apoptag detection kit* tanpa enzim Tdt dan nukleotida yang dilabel digoxigenin pada sel mukosa kolon mencit BALB/C jantan yang diberi ekstrak *Curcuma zedoaria* 0,6% dan dipapar DMBA dengan pembesaran 400x ..... 30**





## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Perbedaan apoptosis dan nekrosis menurut Kerr, 1993.....	13
Tabel 5.1 Hasil Uji t 2 Sampel Bebas.....	32
Tabel 5.2 Hasil Analisis Varian Anova.....	32
Tabel 5.3 Hasil Pengujian LSD.....	32



**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
Lampiran 1 Hasil penghitungan besar sampel.....	44
Lampiran 2 Susunan pakan standar ITB (per 10 kg) disusun oleh Lab Makanan Ternak FKH UNAIR.....	45
Lampiran 3 Teknik pemrosesan jaringan dengan teknik rutin dan teknik pengecatan <i>Hematosilin Eosin</i> (Martoprawiro, 1996).....	46
Lampiran 4 Dasar teknologi, prinsip, metode apoptag dan prosedur pemeriksaan apoptosis dengan apoptag.....	49
Lampiran 5 Hasil pengamatan dan penghitungan jumlah sel mukosa kolon mencit BALB/C jantan yang mengalami apoptosis per 100 sel pada pembesaran 400 x.....	53
Lampiran 6 Hasil analisis varians ( <i>oneway</i> ) jumlah sel mukosa kolon mencit BALB/C jantan yang mengalami apoptosis per 100 sel pada pembesaran 400x.....	54
Lampiran 7 Hasil Uji t 2 Sampel Bebas.....	56

## DAFTAR SINGKATAN

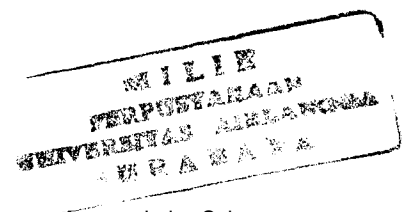
DNA	: Deoxy Nucleid Acid
DMBA	: 9,10-dimethyl-1,2-benz(a)anthracene
CDK	: Cyclin Dependent Kinase
GADD	: Growth Arrest and DNA Damage
HE	: Hematosilin Eosin
TUNEL	: Terminal Deoxyuridine Nucleotide End Labelling
Tdt	: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase
PAH	: Polycyclic Aromatic Hidrocarbon
LPS	: Lipopolysaccharide
IFN $\gamma$	: Interferon $\gamma$
FADD	: Fas Associated Protein with Death Domain

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **1.1 Latar Belakang**

Frekuensi kanker kolon pada tahun 1989-1993 di Pusat Patologi RSUD Dr. Soetomo kurang lebih 718 kasus dari tahun ke tahun angka kesakitan dan angka kematian cenderung makin meningkat, apalagi sebagian besar penderita ditemukan dalam stadium lanjut sehingga upaya penanggulangan sulit dilakukan dengan baik. (Martoprawiro, 2000). Sedangkan kematian dan insiden akibat kanker kolon di Amerika Serikat masih tinggi. Angka kejadian kanker kolon pada tahun 1998 sekitar 261.692 kasus dari 1.228.600 kasus kanker kolon dan hampir 45 % akan mengakibatkan kematian (Contran, 1999). Hanya beberapa jenis kanker yang dapat diobati secara memuaskan, terutama diobati pada stadium dini. Keberhasilan pengobatan sangat dipengaruhi oleh jenis kanker, stadium kanker, keadaan umum penderita serta kepekaan terhadap pengobatan. Beberapa hambatan seperti tingkat pendidikan dan faktor lingkungan masyarakat yang kurang mendukung serta keterbatasan pada pengobatan medis konvensional, maka orang mulai berpikir pada pengobatan alternatif yang merupakan teknik pengobatan timur meskipun terdapat perbedaan paradigma dengan kedokteran konvensional yang tercermin dalam penanganan kanker. Indonesia memiliki berbagai macam flora yang dapat dimanfaatkan sebagai obat termasuk untuk pengobatan kanker, tetapi dalam kenyataan perkembangan pemakaian tumbuhan untuk pengobatan, terutama pemakaian tumbuhan obat yang diintegrasikan dalam pelayanan kesehatan formal tidak seperti yang diperkirakan.



*Curcuma zedoaria* merupakan salah satu tanaman obat yang berasal dari Indonesia yang mempunyai khasiat sebagai obat anti kanker (Saputra K.,dkk, 2000). Pemberian *Curcuma zedoaria* dapat meningkatkan proses apoptosis terhadap sel mukosa kolon namun efek penggunaan tanaman obat *Curcuma zedoaria* di Indonesia untuk meningkatkan apoptosis masih diperdebatkan.

Khusus obat tradisional untuk pengobatan kanker, tak satupun buku pegangan buatan Indonesia yang dapat digunakan sebagai rujukan, seandainya ada buku tersebut hanya mengandalkan pada pengalaman empirik tradisional atau hasil alih bahasa dari buku luar terutama Cina tanpa didasari oleh data ilmiah yang dapat dipertanggungjawabkan. Seandainya ada, data penelitian dalam negeri belum banyak yang telah mengikuti alur pengujian atau metode pengujian suatu obat, misal untuk pengobatan kanker atau mungkin belum banyak dipublikasikan. (Saputra K.,dkk,2000).

Insiden kanker kolon yang diinduksi oleh bahan karsinogen kimiawi dapat dihambat dan diturunkan pertumbuhannya dengan cara pengobatan alternatif yang dikatakan berdasar pada paradigma pengobatan timur. Penurunan insiden kanker yang diinduksi oleh bahan karsinogen kimiawi berhubungan dengan kemampuan sel untuk menahan siklus sel, sehingga memberikan waktu untuk memperbaiki kerusakan DNA sel. Jika kerusakan DNA tidak diperbaiki maka sel akan diapoptosiskan sehingga sel tidak dapat berubah menjadi kanker.

Apoptosis merupakan suatu bentuk kematian sel lain di samping nekrosis, merupakan kematian sel terprogram yang didapatkan pada berbagai keadaan baik yang fisiologis maupun potologis, termasuk kanker. Karsinogenesis merupakan proses perubahan sel normal menjadi kanker (Putra,1997). Model karsinogenesis yang diinduksi dengan suatu bahan karsinogen kimiawi dibagi menjadi dua tahap

yaitu tahap inisiasi dan tahap promosi. Pada tahap inisiasi menjadi tahap yang sangat penting oleh karena pada tahap ini terjadi kerusakan DNA yang permanen. Bila sel yang telah mengalami kerusakan DNA permanen ini terpapar oleh bahan yang berperan sebagai promotor kanker maka akan timbul kanker. Kanker tidak akan tumbuh tanpa tahap inisiasi (Contran, 1999) sedangkan manusia dapat terpapar bahan karsinogen yang masuk bersama makanan secara tidak disadari.

Homeostasis sel mukosa kolon diatur oleh keseimbangan aktivitas proliferasi sel dan kehilangan sel melalui apoptosis (Mandal, 1998). Bila aktivitas proliferasi ini meningkat sedangkan apoptosis menurun maka dapat menyebabkan timbulnya kanker. Kanker merupakan masa jaringan yang abnormal tumbuh berlebihan dan tidak terkoordinasi. Pertumbuhan ini akan berlangsung terus walaupun rangsangan telah hilang (Putra, 1997). Jika kanker sudah tumbuh maka akan sulit untuk dilakukan pengobatan. Penderita baru menyadari bila dirinya terkena kanker setelah kanker yang terdeteksi telah membesar, sehingga sulit untuk diobati dan sering berakhir dengan kematian. Oleh karena itu perlu segera dilakukan penelitian untuk mencari bahan terutama tanaman obat sebagai pengobatan alternatif yang bertujuan untuk dapat mencegah atau menghambat pertumbuhan kanker dan peningkatan daya tahan tubuh.

Penelitian ini dilakukan untuk menyelesaikan masalah tersebut dengan menggunakan hewan coba yang dipapar bahan karsinogen kimiawi kemudian diberi obat yang mengandung ekstrak *Curcuma zedoaria*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat membuktikan efek *Curcuma zedoaria* terhadap peningkatan apoptosis sel mukosa kolon. Paradigma yang dipakai dalam mengungkapkan permasalahan tersebut adalah paradigma patobiologi.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang diajukan adalah :

1. Apakah ada penurunan jumlah sel mukosa kolon yang mengalami apoptosis pada mencit yang dipapar *9,10-dimethyl-1,2-benz(a)anthracene* (DMBA) dan tidak dipapar DMBA?
2. Apakah ada peningkatan jumlah sel mukosa kolon yang mengalami apoptosis pada mencit yang tidak diberi ekstrak *Curcuma zedoaria*, diberi ekstrak *Curcuma zedoaria* 0,2 %, dan 0,6 % setelah dipapar DMBA?

## 1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum penelitian ini adalah mengetahui efek *Curcuma zedoaria* terhadap peningkatan apoptosis sel mukosa kolon mencit jantan

1.3.2 Tujuan khusus adalah

1. Membuktikan penurunan jumlah sel mukosa kolon yang mengalami apoptosis pada mencit yang dipapar DMBA.
2. Membuktikan peningkatan jumlah sel mukosa kolon yang mengalami apoptosis pada mencit yang tidak diberi ekstrak *Curcuma zedoaria*, diberi ekstrak *Curcuma zedoaria* 0,2 %, dan 0,6 %, setelah dipapar DMBA.

## 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah sebagai sumber informasi ilmiah tentang efek *Curcuma zedoaria* di Indonesia terhadap peningkatan apoptosis sel mukosa kolon akibat paparan bahan karsinogen kimiawi.

Memberikan informasi tentang pemakaian temu putih atau *Curcuma zedoaria* sebagai bahan yang dapat digunakan untuk mencegah karsinogenesis pada usus besar sehingga diharapkan dapat menurunkan insiden kanker, menunjang pengobatan kanker, dan meningkatkan kualitas hidup masyarakat.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tinjauan tentang *Curcuma zedoaria*

Sinonim dari *Curcuma zedoaria* adalah *Curcuma pallida*, *Curcuma zerumbet*, *Amomum zedoaria*, *Curcuma aromatica*, *Curcuma kwangsiensis*.

*Curcuma zedoaria* dengan nama umum atau daerah disebut temu putih. Berdasarkan klasifikasi botani *Curcuma zedoaria* merupakan divisi *spermatophyta*, subdivisi *angiospermae*, termasuk dalam kelas *monocotyledoneae*, bangsa *zingiberales*, suku *zingiberaceae* dan marga *curcuma*.

Temu putih tumbuh dan ditanam di Asia Selatan seperti India dan Bangladesh, Cina Selatan, Taiwan, Indonesia dan Filipina. Tumbuh baik pada tempat-tempat terbuka atau sedikit kenaungan dengan drainase yang baik. Ditanam sebagai tanaman penyedap dan pewarna serta sebagai bahan obat tradisional. Temu putih dapat ditemukan pada dataran rendah sampai ketinggian 2000 meter di atas permukaan laut, tumbuh liar di hutan, umumnya dibudidayakan atau ditanam di pekarangan.

Temu putih mempunyai tinggi sekitar 70 cm dengan batang pendek, silindris, lunak, tertanam di dalam tanah dan merupakan batang semu yang dibentuk oleh pelepah-pelepah daun membentuk rimpang yang warnanya jingga dan bercabang-cabang.

Setiap tanaman berdaun 3-8 helai daun tunggal. Daun tunggal bertangkai panjang bentuknya lanset lebar, dengan ujung dan pangkal runcing dan tepi rata. Pertulangan menyirip, panjang 20-40 cm dan lebar 8-12,5 cm serta warnanya hijau pucat.

Perbungaan majemuk, terminal, gagang berambut dan bersisik dengan panjang gagang 16-40 cm warna putih atau kuning muda. Rimpang warna kuning jingga dan kuning jingga kemerahan hingga kuning jingga kecoklatan. Rimpang terdiri dari rimpang induk dan anak rimpang. Rimpang induk berbentuk bulat telur



disebut empu atau kunir lelaki. Anak rimpang letaknya lateral dan bentuknya seperti jari (tabung). Kadang-kadang terdapat pangkal upih daun dan pangkal akar. Besar rimpang dengan panjang 2-6 cm, lebar 0,5-3 cm dan tebal 0,3-1 cm.

Rimpang sebagai obat dikumpulkan pada saat batang tumbuhan mulai menjadi layu atau mengering. Rimpang temu putih yang sudah besar dan tua yang disebut sebagai rimpang induk atau empu merupakan bagian yang berkhasiat sebagai obat. Temu putih tua, warna kulit luarnya coklat tua dan bila diiris bagian dalamnya berwarna putih, jingga terang kekuning-kuningan atau kemerah-merahan.

Anak rimpang (*lateral rhizomes*) digunakan untuk penyedap atau mewarnai masakan. Pewarna kuning dari temu putih selain digunakan untuk mewarnai berbagai macam bahan makanan juga untuk mewarnai obaat-obatan dan alat kecantikan.

Buah dari temu putih berbentuk kotak, bulat dengan diameter 2-4 mm warna hijau sedangkan bijinya berbentuk bulat hitam dengan akar berbentuk serabut dan berwarna putih.

Rimpang mengandung minyak atsiri (*turmerone, zingiberene, phellandrene, sequiterpen* alkohol dan *borneol*), serta komponen lain seperti *cucumemone, curcumol, curdione, curcumin, curzerene, epicurminol, zedoarone, desmetoksikurkumin, bidesmetoksi kurkumin, pati, tanin*, dan damar.

Kandungan kimia tersebut di atas dapat digunakan sebagai berikut :

1. Komponen *curcumol* dan *curdione* dipakai sebagai anti kanker.
2. Sebagai anti inflamasi mempunyai efek yang kuat dibandingkan dengan hidrokortison. Hal ini telah dilakukan penelitian sejak tahun 1971 – 1991.
3. Komponen *curcumin* sebagai anti oksidan
4. Sebagai obat yang mempunyai kandungan kolesterol yang rendah.
5. Sebagai hepatoprotektor.

Bahan dari *Curcuma zedoaria* yang digunakan adalah rimpang.

## 2.2 Anatomi dan Morfologi Kolon

Kolon terdiri atas saekum, kolon asenden, transversum, kolon desenden, sigmoid dan rektum. Di sebelah kanan terdapat *fleksura hepatica* yaitu lekukan dari kolon asenden ke kolon transversum dan di sebelah kiri terdapat *fleksura lienalis* yaitu lekukan dari kolon transversum ke kolon desenden. Rektum adalah bagian distal dari usus besar yang terletak ekstrapertoneal di dalam pelvis dan berakhir pada anal canal.

Fungsi utama dari kolon adalah untuk mengabsorpsi air dan elektrolit serta membentuk masa feses di mana absorpsi air yang terjadi secara pasif diikuti pengeluaran sodium dari dalam sel dan pengeluaran protein dari lumen. Sekresi dari *mucous* berfungsi sebagai pelicin dan pelindung dinding mukosa terhadap isi lumen yang padat. Pengeluaran isi lumen dari usus halus diatur oleh spingter pada *ilio-caecal valve*.

Gambaran histologi dinding kolon terdiri dari empat lapisan yaitu lapisan mukosa, lapisan sub mukosa, lapisan muskularis eksterna (*propria*) dan lapisan serosa (pada rektum disebut sebagai *peri muskular tissue*).

Lapisan mukosa kolon tidak mempunyai jonjot-jonjot, tetapi mempunyai tiga komponen yaitu : epitelium, lamina propria dan muskularis mukosa. Permukaan mukosa dilapisi oleh satu lapis epitel kolumnar pendek atau kuboid, menghadap pada lumen kripte dari *Lieberkuhn* atau ke *innominate groove*.

Permukaan dalam dari kolon dilapisi oleh mukosa yang berlekuk-lekuk membentuk kripte tetapi tidak didapatkan filli. Epitel permukaan ini terdiri atas: (1) sel batang absorptif : dengan ciri, mempunyai inti di basal, sitoplasma kemerahan, pada puncak dari sel terdapat mikrofilili (*Brush border*) menghadap ke lumen. Sel ini mempunyai fungsi absorpsi air dan elektrolit. (2) sel goblet yang terdapat di antara sel batang absorptif serta sel epitel yang belum mengalami diferensiasi pada dasar kripte dimana sel ini akan berubah menjadi sel absorbtif dan sel goblet. Sel goblet

adalah sel yang membuat, menyimpan dan mengeluarkan granula musin. Jumlah sel goblet semakin ke distal kolon akan semakin banyak. (3) epitel kript yang terdiri atas *mature absorptive cell* dan sel goblet, di samping itu juga terdapat *immature* dan *undifferentiated precursor cell*, sel endokrin dan sel paneth. Sel precursor dan sel endokrin sebagian besar terdapat pada dasar dari kript. Sel precursor adalah progenitor dari semua jenis epitel mukosa. Pergantian sel epitel kolon tergolong cepat, membutuhkan waktu 3-8 hari.

Pada lapisan sub mukosa tidak memiliki kelenjar, terdiri dari jaringan ikat kendur seperti pada lamina propria yang terdapat plesus dari *Meisner*, dengan bagian bawah terdapat lapisan muskularis eksterna atau propria yang terdiri dari dua lapisan yaitu lapisan dalam berupa lapisan otot sirkuler atau lapisan yang melingkar dan lapisan luar berupa lapisan otot polos memanjang atau longitudinal. Lapisan ini terdiri dari tiga bentuk seperti pita yang memanjang disebut dengan *Teiniae coli*. Di antara lapisan dalam dan lapisan luar terdapat plesus *Messengerik* dari *Auerbach*.

Lapisan serosa merupakan bagian lapisan yang paling luar, dibatasi oleh mesothel dan jaringan ikat fibroblast disekitarnya.

### 2.3 Tinjauan Apoptosis dalam Karsinogenesis

Sampai sekarang kejadian kanker belum diketahui dengan pasti, menurut *Forbus* ada dua cara yang memungkinkan terjadinya penyakit atau timbulnya kanker yaitu faktor dari dalam, sebagai akibat beberapa kekeliruan duplikasi gen pada proses reproduksi seluler. Kesalahan ini dapat terjadi secara spontan dan tidak tergantung dari pengaruh eksternal tetapi disebabkan karena faktor intrinsik. Faktor dari luar seperti bahan kimia, radiasi dan agen biologis seperti virus diduga dapat menyebabkan kanker pada manusia. (Martoprawiro, 2000).

Tumor terjadi akibat kegagalan pengendalian sel sehingga sel dapat melepaskan diri dari mekanisme pengaturan pertumbuhan normal. Terdapat tiga golongan gen pengatur pertumbuhan normal yang menjadi sasaran perubahan genetik ialah gen pencetus pertumbuhan yaitu protoonkogen, gen penghambat pertumbuhan yaitu gen supresor kanker atau anti onkogen dan gen yang mengatur kematian sel secara terprogram disebut apoptosis. Gen keempat yang memperbaiki kerusakan DNA yang disebut gen perbaikan DNA yang memegang peran ada tidaknya karsinogenesis.

Karsinogenesis adalah proses bertingkat dan kompleks pembentukan neoplasma atau tumor. Neoplasma diartikan sebagai masa jaringan yang abnormal, tumbuh berlebihan dan tidak terkoordinasi serta pertumbuhan yang terus-menerus walaupun rangsangan telah hilang. Sel tumor yang oleh penyebab berubah menjadi sel neoplastik yang membentuk kumpulan sel, yang mempunyai sifat tumbuh abnormal disebut juga sel yang mengalami transformasi. Karsinogenesis merupakan proses multistep pada tingkat fenotip dan genotip dengan beberapa fase seperti fase inisiasi, fase laten, fase promosi, fase progresi ganas. Neoplasma ganas atau kanker mempunyai ciri fenotip tambahan seperti tumbuh berlebihan, invasif dan kemampuan untuk metastasis. Ini dicapai setelah terjadi pertumbuhan tumor. Pada tingkat molekuler progresi tumor merupakan akibat dari akumulasi lesi genetik yang beberapa contoh akibat dari defek pada perbaikan DNA.

Keadaan fisiologis proses pertumbuhan sel dibagi menjadi beberapa tahap sebagai berikut :

1. Pengikatan faktor pertumbuhan oleh reseptor faktor pertumbuhan yang berada pada membran sel.
2. Aktifitas reseptor faktor pertumbuhan yang kemudian mengaktifkan protein penghantar rangsangan yang berada pada bagian dalam membran sel.

3. Pengaliran rangsangan pertumbuhan melalui sitoplasma ke inti sel oleh *second messenger*.
4. Merangsang dan mengaktifkan faktor pengatur inti sehingga terjadi transkripsi DNA dimulai.
5. Sel masuk ke dalam siklus pembelahan. Fase G1, Fase S, Fase G2 kemudian Fase M.

Mekanisme onkogen merangsang pertumbuhan sel neoplastik :

1. Mengkode pembuatan protein yang berfungsi sebagai pertumbuhan yang berlebihan dan merangsang diri sendiri (*autokrin*) misalnya *c-sis*.
2. Memproduksi reseptor pertumbuhan yang tidak sempurna yang memberi isyarat pertumbuhan yang terus-menerus meskipun tidak ada rangsangan dari luar, misalnya *c-erb*.
3. Pada amplifikasi gen terbentuk faktor yang berlebihan sehingga sel tumor sangat peka terhadap faktor pertumbuhan berkadar rendah berada di bawah ambang rangsang normal, misalnya *c-neu*.
4. Memproduksi protein yang berfungsi sebagai penghantar sinyal di dalam sel yang tidak sempurna, terus-menerus menghantarkan isyarat meskipun tidak ada rangsangan dari luar sel, misalnya *c-k.ras*.
5. Memproduksi protein yang berbatas langsung dengan inti yang merangsang pembelahan sel, misalnya *c-myc*.

Tumor tidak hanya terbentuk oleh karena aktivasi onkogen yang bekerja dominan tetapi juga sebagai akibat hilangnya atau tidak aktifnya gen yang bekerja menghambat pertumbuhan sel disebut sebagai anti onkogen yang bekerja resesif. Pada pertumbuhan dan diferensiasi sel normal, anti onkogen bekerja menghambat pertumbuhan dan merangsang diferensiasi sel biasanya bekerja resesif pada alel tipe *wild*.

Kerusakan DNA yang disebabkan oleh radiasi, sinar ultra violet atau bahan karsinogen kimia akan menyebabkan peningkatan kadar protein p53. Akumulasi p53 tipe *wild* berikatan dengan DNA dan merangsang transkripsi beberapa gen yang memerantarai dua pengaruh utama p53 yaitu penahanan siklus sel (*cell cycle arrest*) dan apoptosis. Penahanan siklus sel disebabkan oleh transkripsi CDK inhibitor p21 yang tergantung pada protein p53. Penghentian siklus sel ini akan memberikan waktu untuk memperbaiki kerusakan DNA yang diakibatkan oleh agen mutagenik. Protein p53 juga membantu proses secara langsung dengan memicu transkripsi GADD45 (*Growth Arrest and DNA Damage*). Bila kerusakan DNA ini tidak dapat diperbaiki maka p53 akan memicu aktivasi gen proapoptosis untuk mengapoptosis sel tersebut tetapi bila kerusakan dapat diperbaiki maka sel akan menjadi normal (Contran 1999). Penghentian siklus sel penting oleh karena akan memberikan waktu pada sel untuk mengoreksi kesalahan DNA yang mungkin terjadi selama proses mitosis (Van der Valk, 1999).

Siklus sel diatur oleh cyclin, *cyclin dependent kinase* (CDK) dan inhibitor CDK. Protein p21 termasuk inhibitor CDK, dimana protein ini menghambat pembentukan kompleks cyclin-CDK sehingga siklus sel ditahan (Contran, 1999). Hal lain akibat mutasi protein p53 akan menimbulkan perubahan pada protein produk dan disebut protein p53 mutan, yang mempunyai waktu paruh yang lebih lama, tidak mengatur aktivitas transkripsi, tidak menghambat pertumbuhan sel tumor dan tidak menghambat transformasi sel serta tidak menghambat pertumbuhan pada fase G1 dari siklus sel sehingga gen tidak stabil dan pembelahan sel dengan kerusakan DNA yang parah.

Apoptosis adalah kematian sel yang terprogram yang terjadi pada beberapa proses fisiologik maupun pada neoplasma. Apoptosis merupakan bentuk kematian sel yang dirancang untuk mengeliminasi sel organisme yang tidak diinginkan. Hal ini terjadi selama perkembangan sebagai mekanisme homeostasis mempertahankan populasi sel jaringan, sebagai mekanisme pertahanan pada reaksi imunitas ketika sel dirusak oleh penyakit atau bahan berbahaya maupun pada proses penuaan (Contran 1999). Apoptosis merupakan hal yang kritis untuk kelangsungan hidup organisme dimana gangguan fungsi apoptosis menyebabkan kanker (Miller, 1998).

Sementara pertumbuhan sel diatur oleh gen perangsang dan penghambat pertumbuhan maka kehidupan sel ditentukan oleh gen perangsang dan penghambat apoptosis. Gen penghambat apoptosis ialah gen Bcl-2. Peningkatan ekspresi Bcl-2 mengakibatkan perpanjangan hidup sel dan jika sel mengalami kerusakan genetik maka terus terjadi mutasi tambahan pada onkogen dan anti onkogen. Yang meningkatkan apoptosis ialah gen Bax. Hubungan tingkat kapasitas kedua gen Bcl-2 dan Bax menentukan jumlah sel.

Berbeda dengan nekrosis, morfologi apoptosis dalam jaringan cukup khas dan lebih jelas untuk diamati. Morfologi apoptosis yang tampak dengan menggunakan mikroskop cahaya memakai pulasan *Hematoksilin Eosin (HE)* yaitu sel tampak bulat sampai oval dengan ukuran lebih kecil dari sel normal, keberadaannya tunggal dan terpisah. Sitoplasma mengalami kondensasi sehingga tampak padat kemerahan. Kromatin inti mengalami kondensasi teratur dengan berbagai bentuk dan ukuran, ini menunjukkan gambaran khas dari apoptosis. Inti pecah menjadi dua fragmen atau lebih (Kerr, 1993). Hasil pecahan inti dan sitoplasma biasanya berbentuk bulat dengan sitoplasma kondensasi, dapat disertai atau tanpa kromatin inti disebut dengan *Apoptotic Bodies*.

DNA kromatin inti yang mengalami kondensasi dapat dideteksi dengan pulasan *Fuelgen* untuk DNA. Dengan teknik ini DNA kromatin berwarna ungu,

tampak lebih gelap dibandingkan DNA sel-sel ganas sekitarnya. Bentuk kondensasi kromatinnya tampak lebih jelas dan sitoplasma sel apoptosis berwarna hijau muda dengan “*Counterstain*” *light green* (Brancroft, 1982)

Menurut Contran, morfologi apoptosis yang tampak dengan menggunakan mikroskop elektron adalah :

1. Sel mengkerut, dengan ukuran sel lebih kecil, sitoplasma padat dan organelnya relatif normal tapi lebih padat.
2. Kondensasi kromatin, yang merupakan bentuk khas dari apoptosis di mana kromatin mengumpul perifer inti menjadi masa yang padat sehingga inti sel menjadi pecah membentuk dua fragmen atau lebih.
3. Pembentukan gelembungan sitoplasma dan badan apoptotik di mana permukaan sel apoptosis mengalami pengelembungan yang diikuti oleh fragmen inti, organel yang memadat dengan atau tanpa fragmen inti.
4. Fagositosis sel apoptosis atau badan apoptosis oleh sel tetangganya atau makrofag dan kemudian segera didegradasi dalam lysosom.

Tabel 2.1 Perbedaan apoptosis dan nekrosis menurut Kerr, 1993

Etiologi	APOPTOSIS	NEKROSIS
	1. Jejas lebih halus, kematian terprogram.	1. Jejas akut dan berat.
Mikroskop cahaya	2. Sel tunggal, kondensasi kromatin teratur, berbatas jelas, sitoplasma kondensasi, membran sitoplasma utuh, sel-sel inflamasi negatif.	2. Sekelompok sel, kondensasi kromatin tidak teratur, sitoplasma <i>swelling</i> , membran sitoplasma tidak utuh, sel inflamasi positif.
Mikroskop elektron	3. Kondensasi kromatin berbatas jelas dibatasi 2 selaput, di tepi membran inti, sitoplasma organel utuh, padat.	3. Kondensasi kromatin tidak berbatas jelas, tidak di batasi dua selaput, organel disintegrasikan.
Biokimia	4. Fragmen DNA kromatin: enzim <i>nuclear endo nuclease</i> “ <i>ladder pattern</i> ”	4. Fragmen DNA kromatin : enzim lysosom, Random (“ <i>smear</i> ”)
Mekanisme	5. Aktivasi gen endonuklease.	5. Deplesi ATP, jejas membran, merusakkan radikal bebas.



Ciri biokimia yang terjadi pada sel apoptosis ialah pemecahan protein, *cross-linking protein*, fragmentasi DNA dan pengenalan oleh fagosit. Pada apoptosis akan terjadi hidrolisis protein yang melibatkan aktivasi *family protein cystein* yang disebut caspase. Dimana caspase akan memecah protein inti dan sitoskeleton. Fragmentasi DNA pada sel apoptosis menjadi 50-300 kilobase per fragmen, sehingga fragmentasi ini terjadi di *internukleosome* kemudian fragmen yang besar ini pecah lagi menjadi 180-200 *basepair* per fragmen.

Fragmentasi DNA dapat dikenali dengan elektrophosis gel agarosa atau dengan *tunel (terminal deoxyuridine nucleotide end labeling) assay*. Sel yang terjadi apoptosis memperlihatkan *phosphatidyl serine* pada lapisan luar membran plasma yang dapat dikenali oleh sel tetangga atau makrofag untuk dilakukan fagositosis. (Kerr,1993).

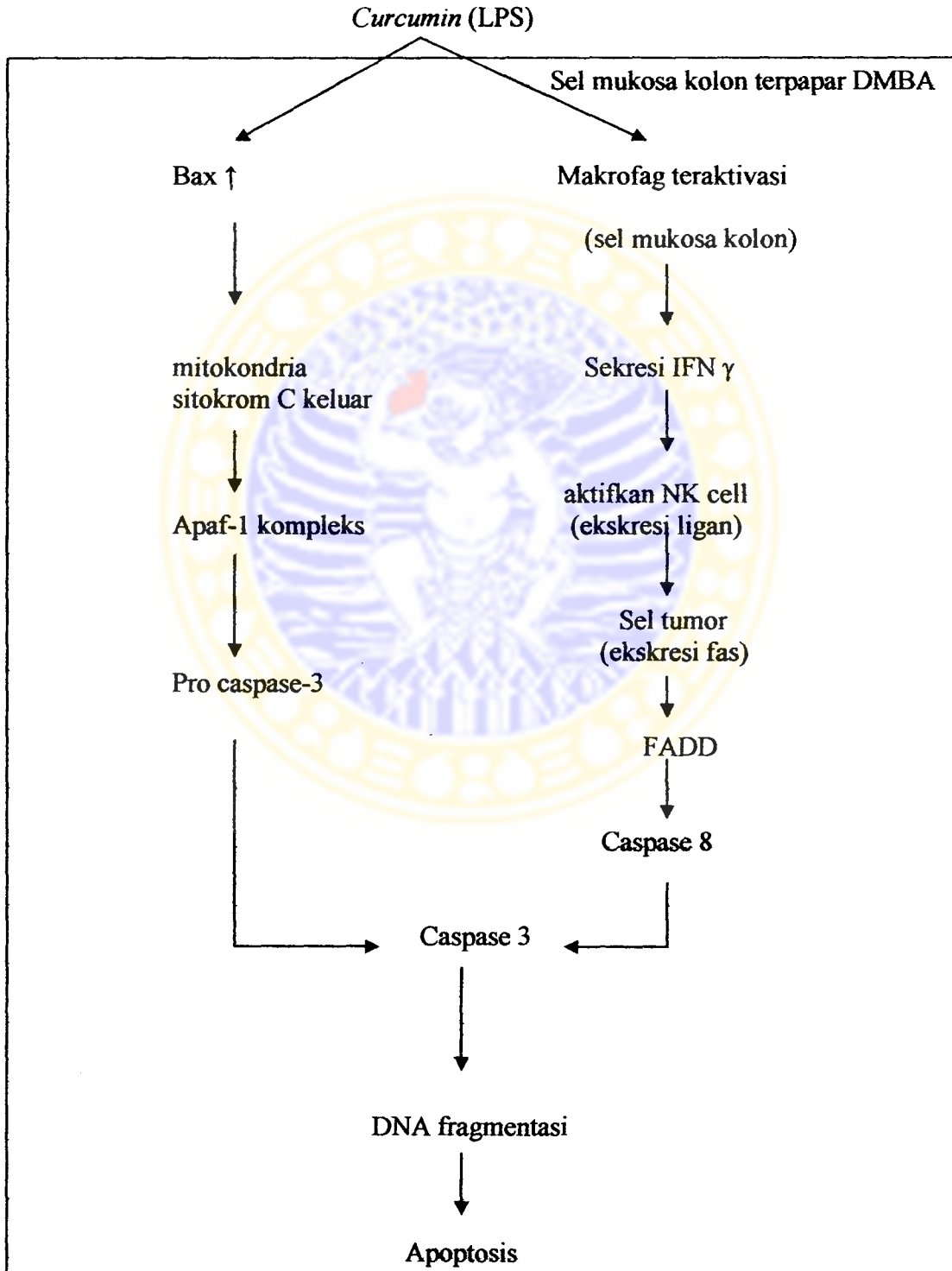
Mekanisme apoptosis akibat jejas radiasi, radikal bebas adalah (1) agen penjejas akan mencederai DNA sehingga menimbulkan akumulasi p53 untuk meningkatkan regulasi gen sasaran yang lain yaitu p21 dan GADD 45 agar menahan siklus sel sehingga terjadi perbaikan kerusakan DNA. Jika sel gagal untuk memperbaiki kerusakan maka sel akan diapoptosis. (2) p53 mengaktifkan gen proapoptosis sehingga akan mengaktifasi caspase. (3) caspase akan menimbulkan perubahan pada inti dan sitoskeleton dengan mengaktifasi endonuklease dan protease yang akan menyebabkan degradasi sitoskeleton dan protein inti sehingga terjadi fragmentasi kromatin inti, kerusakan sitoskeleton akan menimbulkan pembentukan dari gembungan sitoplasma. (4) gembungan sitoplasma diikuti fragmen menjadi sejumlah badan apoptotik yang disusun oleh sitoplasma, organel dengan atau tanpa fragmen inti. (5) badan apoptotik akan difagositosis oleh sel tetangga atau makrofag. (Contran 1999).

Gangguan fungsi apoptosis menyebabkan gangguan mekanisme homeostasis untuk mengontrol populasi sel di jaringan dan akan menimbulkan gangguan proses eliminasi sel yang mengalami mutasi. Mutasi pada protoonkogen, gen supresor kanker dan gen apoptosis dapat menimbulkan karsinogenesis.

### BAB III

## KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konseptual :



*Curcumin* merupakan komponen utama dari spesies *curcuma*, terutama *Curcuma longa L.* *Curcumin* yang terdiri dari komponen *curcumin I*, *curcumin II* dan *curcumin III* mempunyai aktivitas sebagai anti oksidan, sitotoksin dan sebagai anti inflamasi. Tetapi pada beberapa tahun terakhir ini, *curcumin* betul-betul dipertimbangkan sebagai agen potensial dalam menghambat pertumbuhan sel kanker melalui mekanisme apoptosis *invivo* dan *invitro*.

Efek protektif dari *curcumin* lebih potensial di media *lipopolysaccharide* (LPS), dalam bentuk LPS *curcumin* akan merangsang aktivitas makrofag sehingga akan mengeluarkan sitokin interferon  $\gamma$  yang mengaktifkan NK cell untuk mengekskresi ligan. Pada sel tumor akan meresponnya dengan membentuk Fas, ikatan antara ligan - fas akan berikatan dengan FADD di dalam sel mukosa kolon sehingga terjadi aktivasi caspase (terutama caspase 8) yang juga akan mengaktifkan caspase 3 hingga menimbulkan kerusakan DNA, dan berakhir dengan serangkaian proses apoptosis.

Apoptosis dapat juga terjadi melalui jalur yang lain, *curcumin* juga dapat menyebabkan peningkatan regulasi atau ekspresi dari proto-onkoprotein Bax dan terjadi penurunan dari Bcl - XL pada sel kolon. Protein Bax adalah pemicu apoptosis sedangkan Bcl - XL adalah penghambat apoptosis. Peningkatan ekspresi Bax, dalam mitokondria akan menimbulkan keluarnya sitokrom C untuk membentuk apaf-1 kompleks yang akan merangsang konversi procaspase-3 menjadi caspase 3 sehingga akan memicu kerusakan DNA kemudian diikuti oleh serangkaian proses apoptosis.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan uraian tersebut dapat diajukan hipotesis sebagai berikut :

1. Terdapat penurunan jumlah sel mukosa kolon yang mengalami apoptosis pada mencit jantan yang dipapar dengan DMBA
2. Terdapat peningkatan jumlah sel mukosa kolon yang mengalami apoptosis pada mencit jantan yang tidak diberi ekstrak *Curcuma zedoaria*, diberi ekstrak *Curcuma zedoaria* 0,2%, dan 0,6% setelah dipapar dengan DMBA.

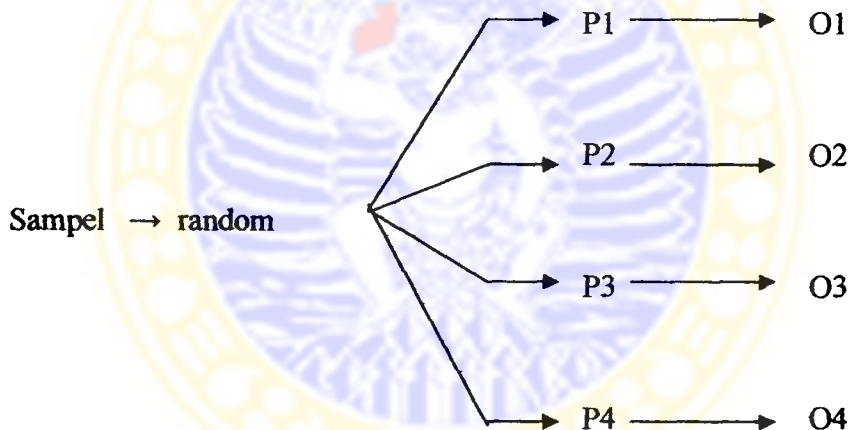


## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental. (Zainuddin, 2000). Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap. Rancangan ini dipilih dengan asumsi bahwa suatu populasi tertentu dan tiap unit populasi adalah homogen yakni semua karakteristik antara unit populasi adalah sama. Pengukuran awal tidak dilakukan karena dianggap sama untuk semua kelompok yang berasal dari satu populasi, sehingga hanya dilakukan pengukuran akhir.



**Keterangan :**

**P1 : Perlakuan I**

**Mencit tidak diberi ekstrak *Curcuma zedoaria* dan tidak dipapar DMBA**

**P2 : Perlakuan II**

**Mencit tidak diberi ekstrak *Curcuma zedoaria*, dipapar DMBA (10 mg/100 gBB) dan pelarutnya.**

P3 : Perlakuan III

Mencit dipapar DMBA (10mg/100 gBB) dan pelarutnya kemudian diberi ekstrak *Curcuma zedoaria* 0,2 %

P4 : Perlakuan IV

Mencit dipapar DMBA (10mg/100 gBB) dan pelarutnya kemudian diberi ekstrak *Curcuma zedoaria* 0,6 %

#### 4.2 Populasi, Sampel dan Besar Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah mencit jantan. Sampel penelitian yaitu mencit jantan yang secara fisik tampak sehat berumur 12 minggu, berat badan 25 - 35 gram.

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini dihitung dengan menggunakan rumus :  $n = \frac{1}{1-f} \times \frac{2 \cdot (Z\alpha + Z\beta)^2 Sc^2}{(\overline{Xc} - \overline{Xt})^2}$  (Higgins dan Kleinbaum, 1985)

Dimana  $Z_{\alpha/2} = Z_{0,025} = 1,96$  dan  $Z_{\beta} = 1,28$  dan  $f = 0$  (0%)

Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan didapatkan  $n = 4,62$  dibulatkan  $n = 5$ , sehingga dalam penelitian ini diambil besar sampel sebesar 5 per kelompok (Lampiran 1)

#### 4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

1. Variabel bebas : kadar ekstrak *Curcuma zedoaria*
2. Variabel kendali : dosis DMBA mencit jantan, kandang, pakan pelet, air minum aqua, pemeliharaan mencit dan metode pemeriksaan
3. Variabel tergantung : apoptosis pada sel mukosa kolon
4. Definisi Operasional Variabel :

Definisi operasional variabel adalah :

1. Kadar ekstrak *Curcuma zedoaria* adalah jumlah kadar ekstrak *Curcuma zedoaria* diberikan per oral yaitu 0,2 mg dan 0,6 mg per 100 ml pelarut.
2. Dosis DMBA adalah jumlah *9,10-dimethyl-1,2-benz(a)anthracene* yang dipaparkan pada mencit yaitu 10 mg per 100 g BB.
3. Sel apoptosis adalah sel yang mengalami fragmentasi DNA, yang terdapat ujung 3-OH yang disambung dengan nukleotida yang dilabel dengan digoxigenin sehingga dalam sel tampak bentukan berwarna coklat dengan latar belakang hijau. Sediaan yang telah diwarnai diamati dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x, dan dilakukan penghitungan jumlah sel mukosa kolon yang mengalami apoptosis per 100 sel

#### **4.4 Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah mencit jantan berumur 12 minggu dengan berat badan 25-35 g, ekstrak *Curcuma zedoaria*, pakan pelet, air minum aqua, *9,10-dimethyl-1,2-benz(a)anthracene* dari sigma, garam fisiologis, buffer formalin 10 %, etanol 69 %, etanol absolut, *xylol*, parafin, polisin, *apoptag detection kit*, *fast green*, etilen.

#### **4.5 Alat Penelitian**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang mencit yang terbuat dari plastik ditutupi kawat kasa dan dilengkapi tempat makan dan botol minum, spuit dengan jarum ditumpulkan (sonde), seperangkat alat bedah, botol jam, mikrotom putar dan perlengkapannya, *water bath*, gelas obyek, gelas penutup, kertas label, mikroskop dan pensil.

#### **4.6 Tempat dan Waktu Penelitian**

Kegiatan penelitian dilaksanakan di Laboratorium hewan coba Fakultas Farmasi Unair pada bulan Januari – April 2005. Pemrosesan jaringan menjadi parafin blok dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FK Unair pada bulan Mei – Juni

2005. Pewarnaan sediaan dilakukan di Laboratorium Patobiologi - Gramik FK Unair pada bulan Juni – Juli 2005.

#### 4.7 Prosedur Pelaksanaan Penelitian

Persiapan yang dilakukan sebelum penelitian adalah menyiapkan kandang pakan dan DMBA. Kandang dicuci kemudian didesinfeksi satu minggu sebelum digunakan agar kandang suci hama. Pakan yang digunakan disusun di Laboratorium Makanan Ternak FKH Unair. Daftar bahan penyusun pakan dapat dilihat di lampiran 2. DMBA yang digunakan yaitu *9,10-dimethyl-1,2-benz(a)anthracene* dari sigma. DMBA dilarutkan dengan *olium olivarum* untuk mempermudah pemberian per oral.

Hewan coba yang digunakan yaitu mencit jantan strain BALB/C, umur 12 minggu dan berat badan 25-35 gram. Mencit diambil dari populasi kemudian dibagi menjadi empat perlakuan secara random dengan cara lotre. Empat perlakuan tersebut adalah :

1. Perlakuan I

Mencit selama penelitian tidak diberi ekstrak *Curcuma zedoaria* dan tidak dipapar DMBA

2. Perlakuan II

Mencit selama penelitian tidak diberi ekstrak *Curcuma zedoaria*, dipapar DMBA (10 mg/100 gBB) dan pelarutnya.

3. Perlakuan III

Mencit selama penelitian dipapar DMBA (10mg/100 gBB) dan pelarutnya, kemudian diberi ekstrak *Curcuma zedoaria* 0,2 %

4. Perlakuan IV

Mencit selama penelitian dipapar DMBA (10mg/100 gBB) dan pelarutnya, kemudian diberi ekstrak *Curcuma zedoaria* 0,6 %

Mencit diadaptasikan terhadap kondisi penelitian selama seminggu sebelum penelitian dimulai. Selama adaptasi, mencit diberi pakan pelet dan minum aqua. Pakan dan minum diberikan secara *ad libitum* selama penelitian.



Perlakuan dimulai setelah adaptasi. Mencit P1 diberi pakan pelet sedangkan mencit P2, P3 dan P4 diberi pakan pelet dan dipapar DMBA. Mencit ditimbang untuk menentukan dosis DMBA kemudian dipapar DMBA dengan menggunakan sonde lambung. DMBA digunakan sebagai bahan pemapar sel mukosa kolon pada penelitian ini karena DMBA merupakan bahan karsinogen kimiawi yang poten di semua jaringan hewan dan manusia. Pada hari ke-30, mencit P3 diberi ekstrak *Curcuma zedoaria* 0,2%, mencit P4 diberi ekstrak *Curcuma zedoaria* 0,6% sedangkan mencit P2 tidak diberi ekstrak *Curcuma zedoaria*. Digunakan kadar ekstrak *Curcuma zedoaria* 0,2 % dan 0,6 % berdasarkan hasil penelitian literatur.

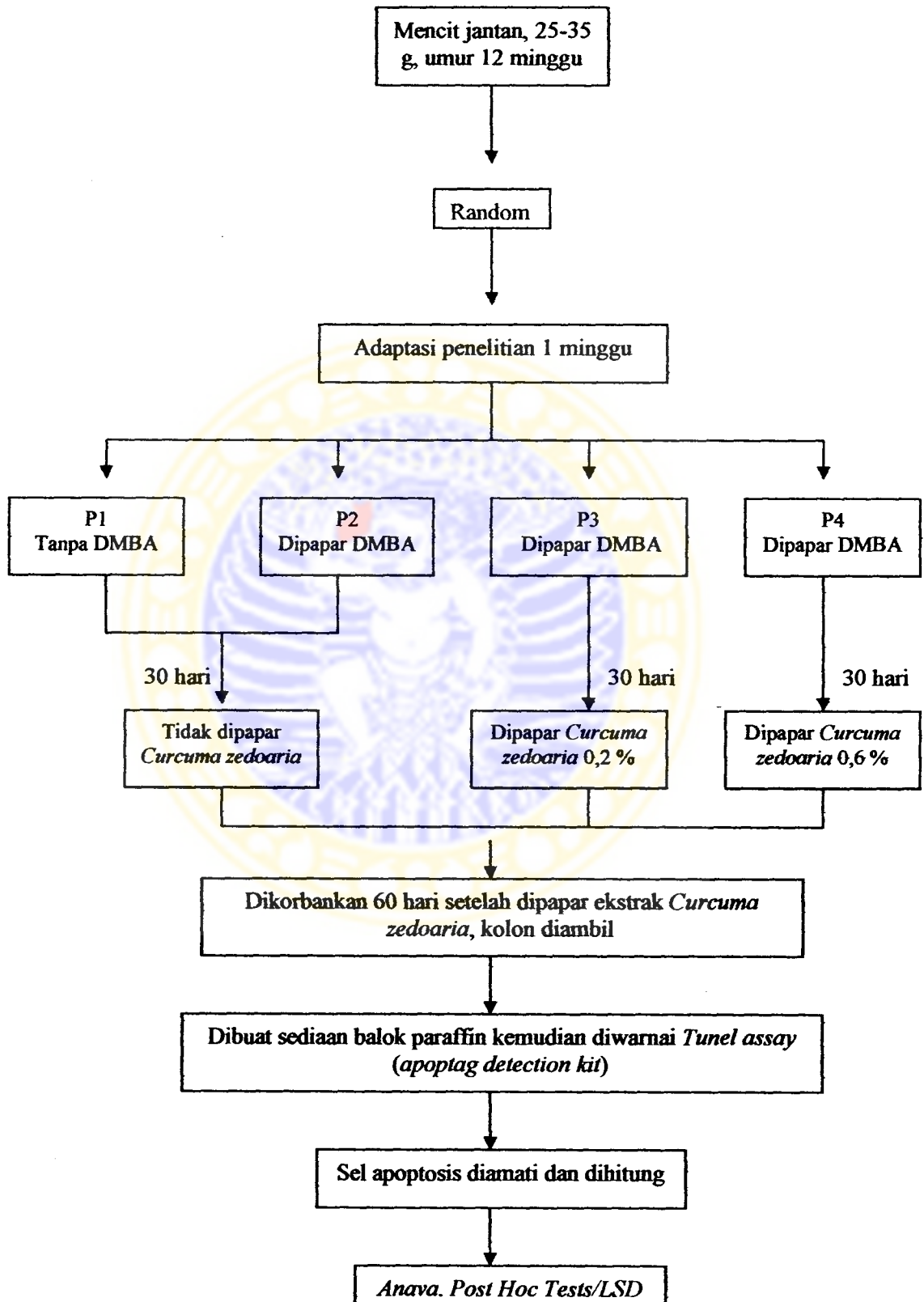
Mencit dikorbankan 2 bulan setelah pemaparan ekstrak *Curcuma zedoaria* dengan menggunakan metode *single fixative* kemudian mencit dibedah dan kolon dimasukkan ke larutan buffer formalin 10%. Selanjutnya kolon diproses menjadi sediaan dalam bentuk blok parafin dan kemudian dilakukan pewarnaan dengan teknik TUNEL (*Terminal Deoxyuridine Nukleotida End Labeling*) yang menggunakan *apoptag detection kit*. Protokol pemrosesan dan pengecatan jaringan dengan *apoptag detection kit* disajikan pada lampiran 3 dan 4.

Sediaan yang telah diwarnai diamati dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x, dan dilakukan penghitungan jumlah sel mukosa kolon yang mengalami apoptosis per 100 sel. Tiap satu lapang pandang diamati dan dihitung pada dua tempat sesuai dengan arah jarum jam pada jam 6 dan jam 12 dengan menggunakan *grateculae*. Tiap satu sediaan diamati pada 4 lapang pandang sesuai arah jarum jam 3, 6, 9 dan 12. Hasilnya kemudian dirata-rata. Data yang telah terkumpul dianalisis dengan analisis varians dan *Post Hoc Tests* (LSD)

#### 4.8 Analisis Data

Data dianalisis dengan menggunakan *Anava* (analisis varians). Bila terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan *Post Hoc Tests* (LSD) dengan  $\alpha = 0,05$  dan hasil uji bermakna bila diperoleh harga  $p < 0,05$  (Steel & Torrie, 1987)

### KERANGKA OPERASIONAL



## BAB V

### ANALISIS HASIL PENELITIAN

#### 5.1 Data Penelitian

Pemeriksaan terhadap jumlah sel mukosa kolon mencit yang mengalami apoptosis dilakukan dengan cara mengamati dan menghitung sel yang mengalami apoptosis per lapang pandang. Setiap satu sampel penelitian dilakukan pengamatan dan penghitungan sel yang mengalami apoptosis sebanyak empat lapang pandang sesuai dengan arah jarum jam pada jam 3, jam 6, jam 9 dan jam 12. Jumlah sel yang mengalami apoptosis pada satu lapang pandang diamati dan dihitung pada dua tempat sesuai dengan arah jarum jam pada jam 12 dan jam 6 dengan menggunakan *grateculae* pada pembesaran 400x. Jumlah sel yang mengalami apoptosis dihitung per 100 sel. Data hasil pengamatan dan penghitungan jumlah sel mukosa kolon mencit BALB/C jantan yang mengalami apoptosis disusun pada lampiran 5.

Hasil pewarnaan HE pada sel mukosa kolon mencit BALB/C jantan yang diberi ekstrak *Curcuma zedoaria* dan setelah dipapar DMBA disajikan pada gambar 5.1.

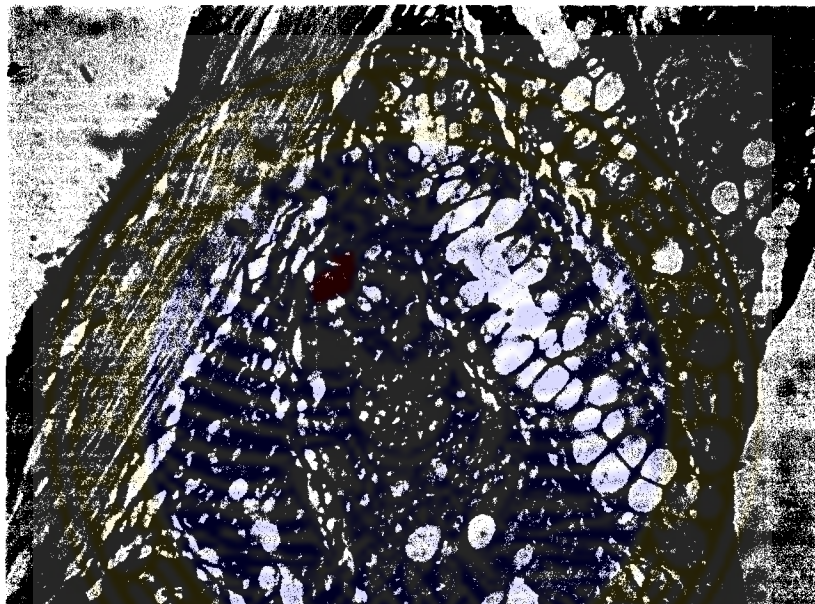
Hasil pewarnaan dengan *apoptag detection kit* pada sel mukosa kolon mencit BALB/C jantan yang tidak diberi ekstrak *Curcuma zedoaria* dan tidak dipapar DMBA disajikan pada gambar 5.2.

Hasil pewarnaan dengan *apoptag detection kit* pada sel mukosa kolon mencit BALB/C jantan yang tidak diberi ekstrak *Curcuma zedoaria* dan dipapar DMBA disajikan pada gambar 5.3.

Hasil pewarnaan dengan *apoptag detection kit* pada sel mukosa kolon mencit BALB/C jantan yang diberi ekstrak *Curcuma zedoaria* 0,2 % dan dipapar DMBA disajikan pada gambar 5.4.

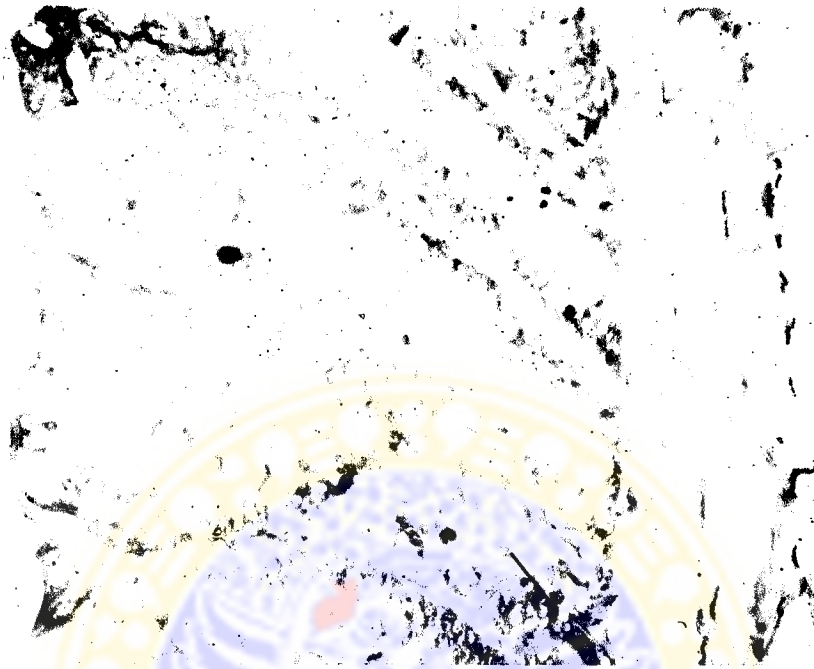
Hasil pewarnaan dengan *apoptag detection kit* pada sel mukosa kolon mencit BALB/C jantan yang diberi ekstrak *Curcuma zedoaria* 0,6% dan dipapar DMBA disajikan pada gambar 5.5.

Hasil pewarnaan dengan *apoptag detection kit* tanpa enzim Tdt dan nukleotida yang dilabel digoxigenin pada sel mukosa kolon mencit BALB/C jantan yang diberi ekstrak *curcuma zedoaria* 0,6% dan dipapar DMBA disajikan pada gambar 5.6.



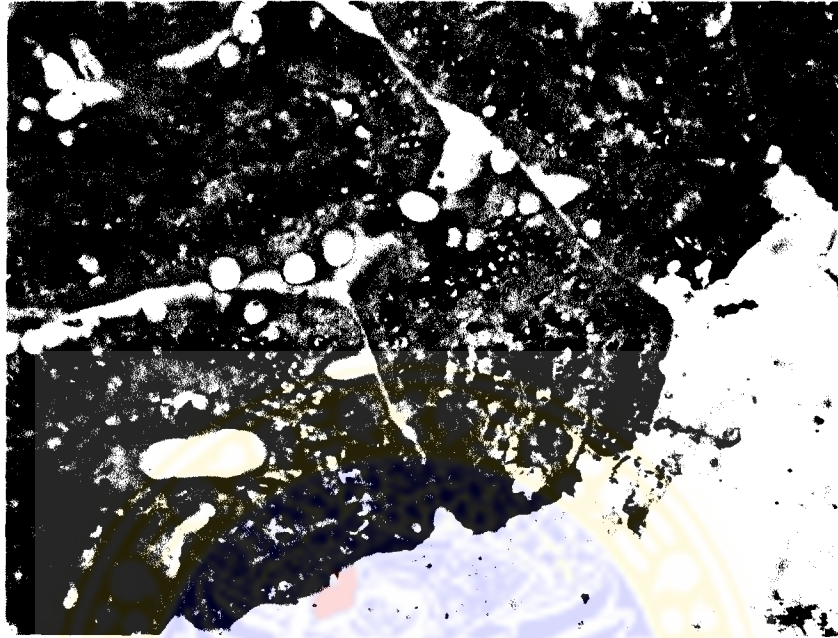
Gambar 5.1. Hasil pewarnaan HE pada sel mukosa kolon mencit BALB/C jantan yang diberi ekstrak *curcuma zedoaria* dan setelah dipapar DMBA dengan pembesaran 400x

Keterangan : Warna biru keunguan : inti sel (panah)  
Warna kemerahan : sitoplasma sel



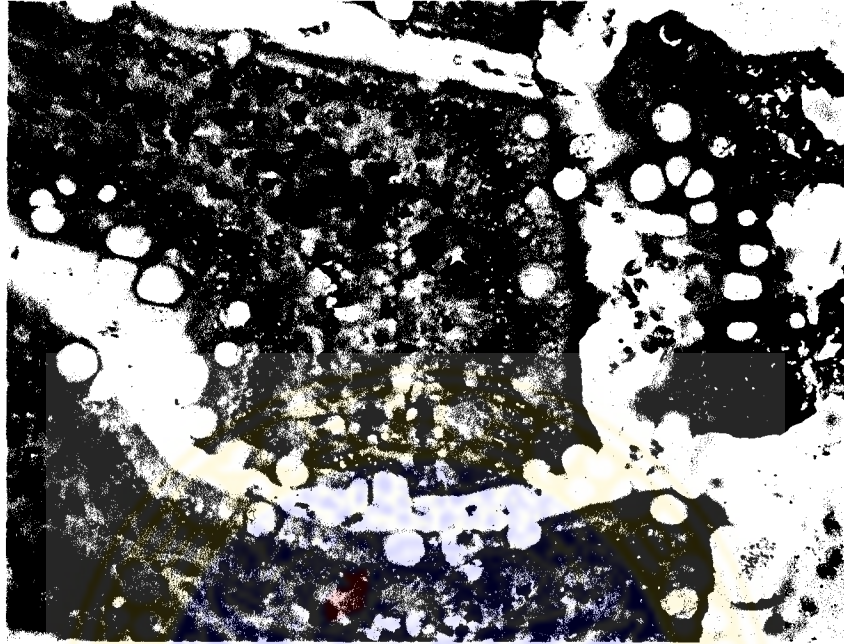
Gambar 5.2. Hasil pewarnaan dengan *apoptag detection kit* pada sel mukosa kolon mencit BALB/C jantan yang tidak diberi ekstrak *curcuma zedoaria* dan tidak dipapar DMBA dengan pembesaran 400x

Keterangan : Warna kecoklatan : sel yang mengalami apoptosis  
( ditunjuk panah )  
Warna hijau : sel yang tidak mengalami apoptosis



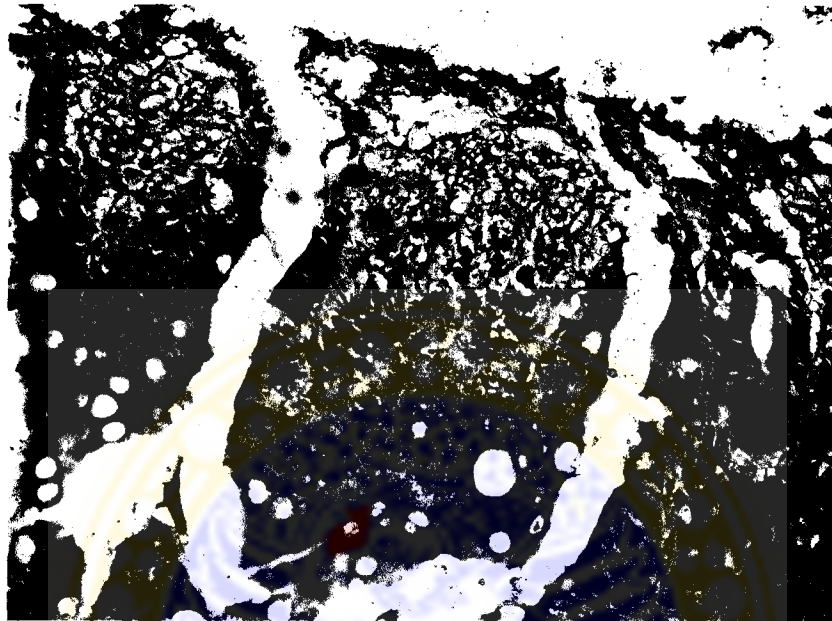
Gambar 5.3. Hasil pewarnaan dengan *apoptag detection kit* pada sel mukosa kolon mencit BALB/C jantan yang tidak diberi ekstrak *curcuma zedoaria* dan dipapar DMBA dengan pembesaran 400x

Keterangan : Warna kecoklatan : sel yang mengalami apoptosis  
Warna hijau : sel yang tidak mengalami apoptosis



Gambar 5.4. Hasil pewarnaan dengan *apoptag detection kit* pada sel mukosa kolon mencit BALB/C jantan yang diberi ekstrak *curcuma zedoaria* 0,2 % dan dipapar DMBA dengan pembesaran 400x

Keterangan : Warna kecoklatan : sel yang mengalami apoptosis  
( ditunjuk panah )  
Warna hijau : sel yang tidak mengalami apoptosis

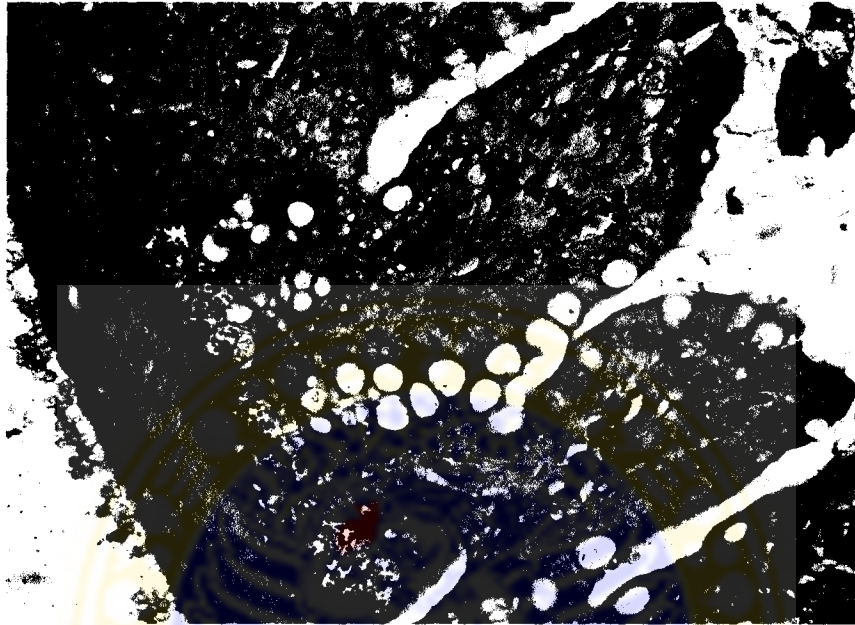


Gambar 5.5 Hasil pewarnaan dengan *apoptag detection kit* pada sel mukosa kolon mencit BALB/C jantan yang diberi ekstrak *curcuma zedoaria* 0,6% dan dipapar DMBA dengan pembesaran 400x

Keterangan : Warna kecoklatan : sel yang mengalami apoptosis  
( ditunjuk panah )

Warna hijau : sel yang tidak mengalami apoptosis





Gambar 5.6 Hasil pewarnaan dengan *apoptag detection kit* tanpa enzim Tdt dan nukleotida yang dilabel digoxigenin pada sel mukosa kolon mencit BALB/C jantan yang diberi ekstrak *curcuma zedoaria* 0,6% dan dipapar DMBA dengan pembesaran 400x

Keterangan : Warna hijau menunjukkan tidak ada ikatan antara 3-OH dari fragmen DNA dengan nukleotida yang Dilabel digoxigenin.

## 5.2 Analisis Data Hasil Penelitian

Sebelum dilakukan uji statistik terhadap data hasil penelitian, data terlebih dulu dilakukan uji homogenitas variasi antar kelompok (Sudjana, 1995). Uji homogenitas variasi dilakukan terhadap variabel apoptosis sel mukosa kolon. Uji homogenitas variasi variabel apoptosis sel mukosa kolon dilakukan dengan menggunakan *Levene test* yang disajikan pada lampiran 6.

Hasil *Levene test* terhadap jumlah sel mukosa kolon mencit yang mengalami apoptosis adalah  $p = 0,341$  ( $p > 0,05$ ). Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa variasi yang digunakan pada penelitian ini adalah homogen.

Data juga perlu diuji distribusinya. Hasil uji distribusi dengan *Uji Kolmogorov-Smirnov satu sampel* dari data penelitian ini disajikan pada lampiran 7. Berdasarkan hasil uji ini diketahui nilai  $p = 0,919$  ( $p > 0,05$ ) sehingga data tersebut berdistribusi normal.

Data dianalisis dengan analisis varian untuk mengetahui perbedaan jumlah sel mukosa kolon mencit BALB/C jantan yang mengalami apoptosis di antara masing-masing perlakuan. Bila terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan *Post Hoc Tests* (LSD) untuk mengetahui perbedaan jumlah sel mukosa kolon mencit jantan BALB/C jantan yang mengalami apoptosis antara perlakuan satu dengan perlakuan yang lain.

Jumlah sel mukosa kolon yang mengalami apoptosis pada mencit BALB/C jantan yang dipapar DMBA berbeda nyata dengan yang tidak dipapar DMBA, ditunjukkan oleh uji t 2 sampel bebas di mana didapatkan hasil  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ).

Tabel 5.1 Hasil Uji t 2 Sampel Bebas

Kelompok	$\bar{x}$	SD	Minimum	Maximum	t
1	9.52500	1.90681	7.250	12.125	t = 8,355 p = 0,000
2	1.72500	0.84963	0.500	2.750	

Hasil analisis varians jumlah sel mukosa kolon mencit yang mengalami apoptosis adalah berbeda nyata  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ) di antara 4 kelompok perlakuan. Uji *Post Hoc* (LSD) menunjukkan bahwa jumlah sel mukosa kolon yang mengalami apoptosis pada mencit BALB/C jantan yang diberi ekstrak *Curcuma zedoaria* 0,2% dan 0,6% setelah dipapar DMBA berbeda nyata dengan jumlah sel mukosa kolon yang mengalami apoptosis pada mencit BALB/C jantan yang tidak diberi ekstrak *Curcuma zedoaria*. Jumlah sel mukosa kolon yang mengalami apoptosis pada mencit yang diberi ekstrak *Curcuma zedoaria* 0,6% setelah terpapar DMBA lebih tinggi. Hasil analisis varians selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 6.

Tabel 5.2 Hasil Analisis Varian Anova

Kelompok	$\bar{x}$	SD	Minimum	Maximum	Anova
1	9.52500	1.90681	7.250	12.125	f = 181.025 p = 0.000
2	1.72500	0.84963	0.500	2.750	
3	19.35000	2.32244	16.375	22.875	
4	28.52500	2.29538	26.625	31.875	

Tabel 5.3 Hasil Pengujian LSD

Kelompok	1	2	3	4
1	-			
2	d = -7.80000* p = 0.000	-		
3	d = 9.82500* p = 0.000	d = 17.62500* p = 0.000	-	
4	d = 19.00000* p = 0.000	d = 28.80000* p = 0.000	d = 9.17500* p = 0.000	-

\* significant pada  $p = 0,05$

## BAB VI

### PEMBAHASAN

Fragmentasi merupakan salah satu ciri dari apoptosis (Contran 1999), fragmentasi DNA pada apoptosis dapat dideteksi dengan teknik *TUNEL (Terminal Deoxyuridine Nukleotide End Labeling) assay* yang merupakan dasar teknik *apoptag detection kit*. Prinsip dari *TUNEL assay* ini adalah menyambung terminal 3-OH dari fragmen DNA dengan nukleotida yang telah dilabel secara acak dengan digoxigenin. Reaksi penyambungan triphosphat nukleotida dengan ujung 3-OH dari fragmen DNA ini dikatalisis oleh enzim Tdt (*Terminal Deoxynukleotidyl Transferase*). Pelabelan nukleotida secara acak dimaksudkan untuk memicu ikatan antara digoxigenin-antidigoxigenin secara optimal (Anonimus, 1998). Prinsip *TUNEL assay* selengkapnya disajikan pada lampiran 4.

Pewarnaan dengan *apoptag detection kit* tanpa menggunakan enzim Tdt dan nukleotida yang dilabel digoxigenin digunakan sebagai kontrol pewarnaan. Pewarnaan dengan cara ini dimaksudkan untuk mencegah terjadinya ikatan antara ujung 3-OH dari fragmen DNA dengan triphosphat nukleotida sehingga tidak terjadi ikatan antara digoxigenin dan antidigoxigenin *peroxidase conjugate* yang pada akhirnya sel akan terwarnai dengan pewarnaan pembanding *fast green* saja. Hasil pewarnaan dengan cara ini pada mencit yang pakannya mengandung ekstrak curcuma zedoaria dan dipapar DMBA adalah semua sel berwarna hijau yang merupakan warna pembanding *fast green* dan tidak ada sel yang berwarna kecoklatan. Pewarnaan dengan *apoptag detection kit* yang menggunakan enzim Tdt dan nukleotida yang dilabel dengan digoxigenin pada kolon mencit yang sama

dengan yang digunakan untuk kontrol pewarnaan menunjukkan bahwa selain sel berwarna hijau juga terdapat sel yang berwarna kecoklatan. Hal ini menunjukkan bahwa pada pewarnaan untuk kontrol pewarnaan tidak terjadi ikatan ujung 3-OH dari fragmen DNA dengan triphosphat nukleotida yang dilabel digoxigenin dan tidak terjadi ikatan antara digoxigenin dengan antidigoxigenin *peroxidase conjugate* sehingga dengan penambahan DAB (*Diamino Benzidine*) yang merupakan substrat kromogenin tidak akan menyebabkan sel berwarna kecoklatan dan sel hanya akan menyerap warna hijau dari pewarna pembanding.

Pewarnaan yang menggunakan enzim Tdt dan nukleotida yang dilabel digoxigenin menyebabkan ikatan antara ujung 3-OH dari fragmen DNA dengan triphosphat nukleotida yang dilabel digoxigenin dan ikatan antara digoxigenin dengan antidigoxigenin peroksidase sehingga dengan penambahan substrat kromogenin akan menyebabkan sel yang *conjugate*, mempunyai ujung 3-OH dari fragmen DNA akan berwarna kecoklatan dan sel yang lain akan berwarna hijau. Warna kecoklatan ini terjadi karena ikatan antara ujung 3-OH dari fragmen DNA dengan nukleotida yang dilabel digoxigenin, digoxigenin dengan antidigoxigenin *peroksidase conjugate*, antara peroksidase dengan DAB substrat.

Berdasarkan hasil pewarnaan HE (gambar 5.1) pada kolon mencit yang sama dengan yang digunakan untuk kontrol pewarnaan menunjukkan bahwa inti yang diwarnai lebih banyak dibandingkan inti yang diwarnai pada pewarnaan dengan *apoptag detection kit*. Hal ini berarti bahwa warna kecoklatan yang tampak pada sel yang mengandung ujung 3-OH dari fragmen DNA pada pewarnaan dengan *apoptag detection kit* memang karena ikatan antara ujung 3-OH dengan substrat aktif dari *apoptag detection kit* dan kromogenin. Sel lain yang tidak mengandung ujung 3-OH

dari fragmen DNA tidak diwarnai dengan *apoptag detection kit*, tetapi dengan HE intinya tampak biru keunguan.

*Dimethylbenz(a) anthracene* (DMBA) merupakan bahan karsinogen kimiawi yang digunakan pada penelitian ini. DMBA termasuk golongan *polycyclic aromatic hydrokarbon* (PAH) yang termasuk katagori prokarsinogen (Contran,1999). DMBA merupakan produk dari lemak hewan pada proses pemanggangan daging dan pada proses pengasapan daging atau ikan, produk dari pembakaran tembakau terutama pada rokok sigaret (Devita,1993). Manusia secara tidak sadar sering kontak dengan DMBA bahkan memakan bahan makanan yang mengandung DMBA. Sedangkan DMBA merupakan bahan karsinogen kimiawi yang poten memicu karsinogenesis hampir pada semua jaringan manusia dan hewan, sehingga penting sekali untuk mencegah karsinogenesis akibat DMBA ini.

Berdasarkan hasil analisis statistik pada penelitian ini, pemaparan DMBA dapat menurunkan apoptosis sel mukosa kolon mencit secara nyata berbeda dengan mencit yang tidak dipapar dengan DMBA. Penurunan apoptosis ini terjadi pada hari ke-5 setelah pemaparan DMBA. Setelah pemaparan bahan karsinogen kimiawi, sel sudah memasuki tahap inisiasi tumor (Compher 1999). Tahap ini merupakan tahap yang sangat penting dalam proses karsinogenesis karena pada tahap ini sudah terjadi mutasi atau cedera permanen pada DNA. Sel yang telah mengalami cedera DNA bila terpapar oleh bahan yang berperan sebagai promotor maka kanker akan tumbuh. Sel mempunyai mekanisme pertahanan untuk menghindari tahap inisiasi ini yaitu dengan cara perbaikan DNA dan apabila perbaikan DNA gagal maka dengan cara apoptosis.

Apoptosis sangat diperlukan untuk mencegah karsinogenesis. Apoptosis ini merupakan kematian sel yang terjadi pada beberapa keadaan antara lain selama

perkembangan, ketika sel dirusak oleh agen yang berbahaya, sebagai mekanisme homeostasis pertahanan seperti pada reaksi imunologi dan pada penuaan (Contran,1999). Apoptosis yang terjadi pada penelitian ini adalah apoptosis yang terjadi ketika sel dirusak oleh agen berbahaya. Agen itu adalah bahan karsinogen kimiawi DMBA.

Kegagalan perbaikan DNA dan apoptosis menyebabkan cedera menjadi permanen dan memicu karsinogenesis. Cedera permanen pada DNA sel dapat mengubah gen yang mengatur apoptosis, mengaktifkan onkogen dan menginaktifkan gen supresor kanker. Ketiga hal ini menyebabkan perubahan produk gen dan kehilangan produk pengatur gen (Contran,1999). Perubahan pada gen yang mengatur apoptosis menyebabkan pengontrol populasi sel di jaringan tidak ada. Gen supresor kanker pada dasarnya menghambat pertumbuhan sel kanker. Inaktivasi gen ini menyebabkan penghambat pertumbuhan kanker tidak ada. Kekacauan kerja dari ketiga gen penting yang mengatur pertumbuhan sel secara normal ini menyebabkan sel tumbuh menjadi klon yang tidak normal, mengalami progresi dan akhirnya berkembang menjadi kanker. Apoptosis mencegah sel yang mengalami cedera DNA permanen tidak hidup, sehingga karsinogenesis dapat dihindari. Apoptosis sel epitel kolon mencit yang dipapar DMBA pada penelitian ini mengalami penurunan dibandingkan dengan yang tidak dipapar dengan DMBA. Hal ini menunjukkan bahwa DNA sel yang dipapar DMBA tersebut telah mengalami cedera permanen. Cedera DNA permanen ini akan diturunkan pada anak dari sel tersebut sehingga jumlah sel golongan itu terus menerus meningkat yang pada akhirnya akan berkembang menjadi kanker. Salah satu dasar molekuler kejadian kanker adalah kerusakan pada gen yang memicu apoptosis (Contran, 1999). Gangguan fungsi

apoptosis ini menyebabkan gangguan mekanisme homeostasis dalam mengontrol populasi sel di jaringan dan gangguan proses eliminasi sel yang telah mengalami mutasi. Mutasi pada protoonkogen, gen supresor kanker dan gen apoptosis dapat menyebabkan karsinogenesis. Oleh karena itu selama mutasi atau cedera DNA dapat diperbaiki atau diapoptosiskan maka karsinogenesis tidak akan terjadi. Demikian sebaliknya bila perbaikan sel yang mengalami cedera DNA dan apoptosis tidak terjadi maka karsinogenesis akan terjadi.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa jumlah apoptosis sel mukosa kolon mencit yang diberi ekstrak *Curcuma zedoaria* setelah dipapar DMBA secara nyata berbeda dengan mencit yang tidak diberi ekstrak *Curcuma zedoaria*. Perbedaan ini ditandai dengan peningkatan jumlah apoptosis pada sel mukosa kolon yang diberi ekstrak *Curcuma zedoaria*. Seperti yang diuraikan sebelumnya bahwa apoptosis merupakan hal yang sangat penting dalam proses karsinogenesis karena peningkatan apoptosis dapat mencegah karsinogenesis. Fakta yang didapat dari penelitian ini adalah pemberian ekstrak *Curcuma zedoaria* dapat meningkatkan apoptosis sel mukosa kolon mencit yang dipapar DMBA. Seharusnya adanya agen pemapar DMBA yang merupakan bahan karsinogenik kimiawi yang sangat potent memicu karsinogenesis ini menurunkan jumlah apoptosis sel epitel kolon (seperti pada hasil penelitian ini). Namun pemaparan DMBA pada mencit yang diberi ekstrak *Curcuma zedoaria* justru meningkatkan apoptosis. Hal ini berarti bahwa penambahan ekstrak *Curcuma zedoaria* pada mencit dapat mengurangi jumlah sel yang mengalami mutasi dengan cara meningkatkan apoptosis sehingga pada akhirnya dapat mencegah karsinogenesis.



Hasil penelitian ini sama dengan hasil penelitian Kawamori T dkk (1999) yang melaporkan bahwa penambahan ekstrak *Curcuma zedoaria* pada pakan tikus dapat menurunkan insiden kanker kolon yang diinduksi dengan bahan karsinogen kimiawi. Penambahan ekstrak *Curcuma zedoaria* pada mencit BALB/C jantan yang dipapar DMBA dapat meningkatkan jumlah apoptosis sel mukosa kolon dibandingkan kontrol. Jumlah sel mukosa kolon yang mengalami apoptosis pada kontrol lebih sedikit dibandingkan perlakuan karena pada kontrol mekanisme perbaikan DNA dan apoptosis mengalami kegagalan sehingga cedera DNA menjadi permanen dan karsinogenesis kolon dimulai. Sedangkan pada perlakuan jumlah sel mukosa kolon yang mengalami apoptosis lebih banyak dibanding kontrol. Hal ini berarti mekanisme apoptosis ditingkatkan sehingga dapat mencegah karsinogenesis karena sel yang DNA-nya mengalami cedera telah diapoptosiskan. Pemberian ekstrak *Curcuma zedoaria* 0,6 % pada mencit lebih efektif mempengaruhi jumlah apoptosis sel mukosa kolon mencit BALB/C jantan yang dipapar DMBA. Berdasarkan uji *Post Hoc Test* jumlah sel mukosa kolon yang mengalami apoptosis pada pemberian ekstrak *Curcuma zedoaria* 0,6 % lebih tinggi daripada pemberian ekstrak *Curcuma zedoaria* 0,2 %. Dengan demikian pemberian ekstrak *Curcuma zedoaria* pada mencit BALB/C jantan dapat meningkatkan jumlah sel mukosa kolon yang mengalami apoptosis sehingga dapat mencegah cedera permanen pada DNA akibat DMBA. Akhirnya pemberian ekstrak *Curcuma zedoaria* pada mencit dapat mencegah karsinogenesis.

## BAB VII

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan :

1. Pemaparan DMBA dapat menurunkan jumlah sel mukosa kolon mencit jantan yang mengalami apoptosis.
2. Pemberian ekstrak *Curcuma zedoaria* pada mencit jantan dapat meningkatkan jumlah sel mukosa kolon mencit yang mengalami apoptosis setelah dipapar DMBA.
3. Pemberian ekstrak *Curcuma zedoaria* 0,6 % lebih efektif dibandingkan dengan pemberian ekstrak *Curcuma zedoaria* 0,2 % untuk meningkatkan jumlah sel mukosa kolon mencit yang mengalami apoptosis setelah dipapar DMBA.

#### 7.2 Saran

Saran yang dapat dikemukakan berdasarkan hasil penelitian ini adalah :

1. Perlu dilakukan penelitian lanjut untuk mengungkap mekanisme apoptosis sel mukosa mencit yang diberi ekstrak *Curcuma zedoaria* setelah dipapar DMBA.
2. Perlu untuk lebih memanfaatkan ekstrak *Curcuma zedoaria* sebagai pengobatan alternatif untuk mencegah karsinogenesis kolon.
3. Perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh ekstrak *Curcuma zedoaria* terhadap sel mukosa kolon normal yang tidak dipapar oleh karsinogen kimiawi.

## DAFTAR PUSTAKA

- American Cancer Society. Cancer Statistics. 1998. *CA Cancer J. Klin.* 48 : 11-42
- Anonimus, 1998. *The Complete Apoptag Manual*, Intergen Compagny, pp 3-16
- Bush JA, KJ Cheung Jr, G Li, 2001. *Curcumin Induces Apoptosis in Human Melanoma Cells through a Fas Receptor/Caspase-8 Pathway Independent of p53*. *Exp Cello Res.*, 271 (2) : 305-14
- Bhaumik S, MD Jyothi, A. Khar, 2000. *Defferential modulation of nitric oxide production by curcumin in host macrophages and NK cells*. Centre for Cellular and Molecular Biology, Uppal Road 500 007, Hyderaba, India
- Contran RS, V Kumar, T Collins, 1999. *Robbins Pathologic Basics of Diseases*, 9<sup>th</sup> ed. Philladelphia : WB Saunders Company, pp 260 – 325
- Chung SE, AL Cheng, JK Lin, ML Kuo. *Inhibition by curcumin of diethylnitrosamine induced hepatic hyperplasia, inflamation, cellular gene products and cell cycle related proteins in rats*. *Food chem Toxicol* 2000 Nov; 38 (11) : 9911-5
- Hembing W, S Dalimartha, AS Wirian, 1996. *Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia*, jilid ke – 4, Jakarta : Penerbit Pustaka Kartini, hal 93-6
- Higgins J.E, A.P Kleinbaum. 1985. *Introduction to Randomized Clinical Trials North California USA* : Family Health International, Research Triagle Park, pp 31
- Huang, M-T, Z.Y Wang, C.A Georgiadis, et al. 1992. *Inhibitory effect of curcumin on tumor initiation by benzo(a)pyrene and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene*. *Carcinogenesis (Lond)*, 13 : 2183-2186.
- Huang, M-T, Y.R Lou, W Ma, et al. 1994. *Inhibitory effect of curcumin on forestomach, duodenal, and colon carcinogenesisnin mice*. *Cancer Res.* 54 : 5841-5847

- Jones EA, A Shahed, DA Shoskes, 2000. *Modulation of apoptotic and inflammatory genes by bioflavonoids and angiotensin II inhibition in ureteral obstruction*. Division of Urology, Harbor – UCLA Medical center, Torrance, California, USA
- Kawamori T, R Lubet, VE Steele, et al. 1999. *Chemopreventive Effect of Curcumin, a Naturally Occurring Anti – Inflammatory agent, during The Promotion/Progression Stages of Colon Cancer*. *Cancer Res.*, 59 (3) : 597-601
- Kerr JFR, CM Winterford, BV Harmon, 1993. *Apoptosis*. *Cancer* 73 : 2013 - 2026
- Kim MS, HJ Kang, A Moon. 2001. *Inhibition of invasion and Induction of Apoptosis by Curcumin in H-Ras-Transformed MCF10A Human Breast Epithelial Cells*. *Arch Pharm Res.*, 24 (4) : 349-54
- Martoprawiro SS, 1996. *Peranan Patologi Anatomi dalam Menegakkan Diagnostik Penyakit : dengan teknik HE, Histokimia, Imunohistokimia, Papanicouau dan MGG*, Surabaya : RSUD Dr. Soetomo, hal 10
- Martoprawiro SS, 2000. *Kanker Kegagalan Pengendalian Sel perlu Pencegahan dan Deteksi Dini, secara Ketat dan Akurat untuk Dapat Meningkatkan Kualitas Hidup Manusia*, Penerimaan jabatan Guru Besar dalam bidang Ilmu Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, hal 9-16, 24
- Martoprawiro SS, Sjahjenny MPH, Darmawan D, et al, 1992. *Kanker kegagalan pengendalian sel diterjemahkan dari Cancer the Misguided Cell oleh Abraham DMP dan Flexer*. Surabaya : bagian / lab / instansi patologi anatomi FK Unair RSUD Dr. Soetomo, hal 4.
- Mandal M, L Adam, J Mendelson and R Kumar. 1998. *Nuclear Targeting of Bax during Apoptosis in Human Colorectal Cancer cells*. *Oncogene*. 17 : 999-1007
- Matsuda H, K Ninomiya, T Morikawa, M Yoshikawa. *Inhibitory Effect and Action Mechanism of Sesquiterpenes from Zedoariae Rhizoma on D - Galactosamine / Lipopolysaccharide – Induces Liver Injury*. Kyoto Pharmaceutical University, Japan.

- Miller L.J, Marx J. 1998. *Apoptosis Science*. 281 : 1301
- Moragoda L, R Jaszewski, AP Majumdar, 2001. *Curcumin Induces Modulation of Cell Cycle and apoptosis in Gastric and Colon Cancer Cells*. *Anticancer Res.*, 21 (2A) : 873-8
- Pal S, T Choudhuri, S Chattopadhyay, et al, 2001. *Mechanisms of Curcumin – Induces Apoptosis of Ehrlich's Ascites Carcinoma Cells*. *Biochem Biophys Res.*, 288 (3) : 658-65
- Pereira M.A, D.J Grubbs, L.H Barnes, et al. 1996. *Effect of the phytochemicals, curcumin and quercetin, upon azoxymethane-induced colon cancer and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced mammary cancer in rats*. *Carcinogenesis (Lond)*. 17 : 1305-1311.
- Piwocka K, E Jaruga, J Skierski, et al. 2001. *Effect of Glutathione depletion on Caspase-3 Independent Apoptosis Pathway Induces by Curcumin in Jurkat Cells*. *Free Radic Biol Med.*, 31 (5) : 760-8
- Putra ST, 1997. *Patofisiologi Tingkat Sel Dalam : Patofisiologi Kedokteran*, ed 1 Surabaya : Gramik FK Unair.
- Ramsewak RS, DL DeWitt, MG Nair. *Cytotoxicity, Antioxidant and Anti-inflammatory activities of Curcumins I-III from Curcuma Longa*. *Departement of Horticulture and National Food Safety and Toxicology Center, Michigan State University, East Lansing 48824, USA*.
- Ramachandran C, W You. *Differential Sensitivity of Human Mammary epithelial and breast carcinoma cell lines to curcumin*. *Breast cancer Res Treat* 1999 Apr ; 54 (3) : 269-78
- Rao C.V, A Rivenson, B Simi, et al. 1995. *Chemoprevention of colon carcinogenesis by curcumin, a naturally occuring plant phenolic compoud*. *Cancer Res*. 55 : 259-266
- Steel RGD, H Torrie, 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometrik*, ed 2. Jakarta : Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama, hal 168.

**Van der Valk P, 1999. *Practical Pathology of the Cell Cycle*. Majalah Patologi 8 ;1-4**

**Zainuddin M, 2000. *Metodologi Penelitian*. Surabaya : Airlangga University Press, hal 54**



## Lampiran 1 : Hasil penghitungan besar sampel

Ulangan	Kontrol	Perlakuan
1	6,375	18,875
2	12,250	15,500
3	13,750	19,500
4	9,250	9,250
$\Sigma$	41,625	70,250
$\bar{X}$	10,40625	17,5625
SD	3,274547	1,927055

$$n = \frac{1}{1-f} \times \frac{2 \cdot (Z\alpha + Z\beta)^2 Sc^2}{(\bar{X}_c - \bar{X}_t)^2}$$

$$f = 0 ; Z\alpha = 1,96 ; Z\beta = 1,28$$

$$\bar{X}_c = 10,406$$

$$\bar{X}_t = 17,563$$

$$Sc = 3,275$$

$$n = 1 \times \frac{2(1,96 + 1,28)^2 \cdot (3,275)^2}{(10,406 - 17,563)^2}$$

$$n = 1 \times \frac{225.1243}{51.21191}$$

$$n = 1 \times 4,395936309$$

$$= 4,395936309 \approx 5$$

Pada penelitian ini besar sampel yang diambil 5 sehingga total sampel

4 (perlakuan) x 5 = 20 ekor mencit BALB/C jantan

**Lampiran 2: Susunan pakan standar ITB (per 10 kg) disusun oleh Lab Makanan Ternak FKH UNAIR**

Tepung Jagung	2,50 kg
Tepung Terigu	3,40 kg
Tepung Kacang Hijau	1,40 kg
Tepung Ikan	1,60 kg
Lemak Babi	0,80 kg
Vitamin B1	0,48 g
Vitamin B2	1,20 g
Nikotinamid	12,00 g
Kalsium Pantotenat	2,40 g
Vitamin B6	0,40 g
Kolin Bitartat	45.60 g
Multivitamin	40,00 g

Makanan dibuat dalam bentuk pelet untuk masing-masing perlakuan.



**Lampiran 3 : Teknik pemrosesan jaringan dengan teknik rutin dan teknik pengecatan *Hematosilin Eosin* (Martoprawiro, 1996)**

**A. Teknik Pemrosesan jaringan dengan teknik rutin**

1. Melakukan proses fiksasi, dehidrasi, clearing dan impregnasi dengan cara mencelupkan jaringan kedalam larutan seperti dibawah ini sesuai waktu yang telah ditentukan.

Tabung	Larutan	Waktu	Proses
1	Formalin 10%	2 jam	Fiksasi
2	Alkohol 70%	1 jam	Dehidrasi
3	Alkohol 80%	2 jam	Dehidrasi
4	Alkohol 95%	2 jam	Dehidrasi
5	Alkohol 96% + prusi	2 jam	Dehidrasi
6	Alkohol 96% + prusi	1 jam	Dehidrasi
7	Alkohol 96% + prusi	2 jam	Dehidrasi
8	Xilol	1 jam	Clearing
9	Xilol	2 jam	Clearing
10	Xilol	2 jam	Clearing
11	Parafin cair (58-60 <sup>0</sup> C)	2 jam	Impregnasi
12	Parafin cair (58-60 <sup>0</sup> C)	2 jam	Impregnasi

**2. *Embedding* dan penyayatan jaringan dengan mikrotom**

- 1) Alat cetak yang terbuat dari logam berbentuk siku-siku disusun diatas permukaan kaca yang sudah diolesi gliserin. Penggunaan gliserin ini untuk mempermudah pemisahan alat cetak dari blok parafin yang sudah beku.

- 2) Dua tempat parafin cair yaitu : parafin sebagai bahan *embedding* dan parafin sebagai media penyesuaian temperatur jaringan yang akan ditanam, dipersiapkan dengan temperatur optimum tetapi tidak mengembangkan alat cetak blok.
- 3) Parafin cair pada tempat pertama dituangkan ke dalam alat cetak hingga penuh pada permukaannya, lalu jaringan ditanam pada posisi yang sesuai dan bagian permukaan jaringan yang menempel pada kaca diusahakan rata.
- 4) Alat cetak dilepas bila parafin sudah cukup keras, lalu blok jaringan di label dan siap disayat.
- 5) Blok parafin tadi ditempelkan pada alat pemegangnya yang berupa lempengan logam yang sudah dipanasi. Perhatikan sisi blok mana yang akan dipotong, kemudian didinginkan pada suhu kamar agar melekat erat.
- 6) Pisau mikrotom dipasang pada pegangan mikrotom membentuk sudut  $5 - 10^{\circ}$ . Pisau harus diusahakan selalu tajam dan permukaannya rata benar.
- 7) *Water bath* dipersiapkan dengan mengatur suhu air dibawah titik leleh parafin ( $\pm 48^{\circ}C$ ).
- 8) Blok yang sudah menempel pada pemegangnya dipasang pada mikrotom dan siap dilakukan pemotongan tipis dengan ketebalan yang dikehendaki, umumnya 4 – 8 mikron.
- 9) Hasil pemotongan berupa pita tipis dengan hati-hati dipindahkan kedalam *water bath* agar sayatan jaringan mengembang dengan baik.

- 10) Sayatan diseleksi dan dipindahkan keatas gelas objek yang telah diolesi dengan *mayer albumin* (putih telur) atau polilisin sebagai bahan perekatnya dan sudah diberi label sesuai label pada blok.
- 11) Sediaan dibiarkan kering dan dimasukkan kedalam oven dengan suhu optimum ( $58 - 60^{\circ} \text{C}$ ) selama 30 menit, dan sediaan siap dicat.

#### B. Teknik Pengecatan *Hematosilin Eosin*

1. Sediaan dicelup dalam larutan xilol bak I selama 2 menit.
2. Sediaan dipindahkan dalam larutan xilol II selama 2 menit.
3. Dalam alkohol absolut 2 bak, bak I, bak II, masing-masing 1 menit.
4. Dalam alkohol 95% 2 bak, bak I, bak II, masing-masing 1 menit.
5. Di cuci dalam air yang mengalir selama 10 menit.
6. Dimasukkan dalam larutan *Mayer hematoksilin* selama 15 menit.
7. Di cuci kembali dengan air.
8. Dimasukkan dalam eosin antara 15 detik sampai 2 menit.
9. Dimasukkan dalam alkohol 95%, bak I, bak II, masing-masing 1 menit.
10. Dalam alkohol absolut, bak I, II, III masing-masing 2 menit
11. Terakhir dalam xilol bak I, II, III masing-masing 2 menit.
12. *Mounting*.

#### Lampiran 4 : Dasar teknologi, prinsip, metode apoptag dan prosedur pemeriksaan apoptosis dengan apoptag.

##### A. Dasar Teknologi

Dasar teknologi apoptag adalah *TUNEL (Terminal Deoxyuridine Nukleotide End Labelling) Assay*. Kerusakan *strand* DNA dideteksi dengan melabel ujung bebas 3-OH secara enzimatik dengan nukleotida yang dimodifikasi. Ujung DNA yang terbentuk dari fragmentasi DNA ini ada pada inti yang mengalami apoptosis maupun *apoptotik body*. Sedangkan pada inti yang normal maupun yang berproliferasi, dimana terdapat ujung 3-OH dalam jumlah yang tidak signifikan, tidak tercat oleh kit.

*Apoptag detection kit* mendeteksi *single strand break* maupun *double strand break* yang berhubungan dengan apoptosis. Teknik ini dapat mendeteksi tahap awal apoptosis pada saat terjadi kondensasi kromatin dan kerusakan *strand* DNA masih sedikit, sebelum terjadi perubahan morfologis pada inti

##### B. Prinsip Metode Apoptag

Reagen pada *apoptag detection kit* dirancang untuk menyambung ujung 3-OH secara *in situ* dengan nukleotida yang dilabel dengan atau tidak dilabel secara kimiawi. Nukleotida pada apoptag dilabel dengan digoxigenin untuk metode *indirect*. Nukleotida yang terkandung pada *reaction buffer* disambung dengan ujung 3-OH dari DNA secara enzimatik dengan bantuan *terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt)*. Tdt mengkatalisis penyambungan triphosphat nukleotida ke ujung 3-OH dari *double strand* maupun *single strand* DNA. Nukleotida yang dipakai terdiri dari nukleotida yang dilabel atau tidak dilabel digoxigenin. Pelabelan nukleotida dengan digoxigenin secara acak bertujuan untuk memicu ikatan antibodi anti digoxigenin dengan digoxigenin.

Prinsip pemeriksaan dengan *apoptag detection kit* adalah fragmen DNA yang telah disambung dengan nukleotida yang dilabel digoxigenin diikat dengan *anti digoxigenin peroxidase conjugate* sehingga dengan penambahan substrat kromogenin pada sel yang mengandung ujung 3-OH akan berwarna kecoklatan, sedangkan sel yang tidak mengandung ujung 3-OH akan berwarna hijau.

### C. Prosedur Pemeriksaan Apoptosis dengan *Apoptag Detection Kit*

#### 1. Deparafinisasi jaringan :

- 1) Spesimen di cuci tiga kali dengan *xylene* masing-masing selama lima menit.
- 2) Spesimen dicuci dua kali dengan etanol absolut masing-masing selama lima menit.
- 3) Spesimen di cuci satu kali dengan etanol 95% dan satu kali dengan etanol 70% masing-masing selama tiga menit
- 4) Spesimen di cuci satu kali dengan PBS selama lima menit.

#### 2. Persiapan pewarnaan :

- 1) *Proteinase K* (20  $\mu\text{g/ml}$ ) diteteskan langsung pada spesimen (60  $\mu/5 \text{ cm}^2$ ) selama lima belas menit.
- 2) Spesimen dicuci dua kali dengan  $\text{dH}_2\text{O}$  *copling* jaringan masing-masing selama dua menit.

#### 3. Menghilangkan *endogenous peroxidase*.

- 1)  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% diteteskan dalam PBS selama lima menit pada suhu kamar.
- 2) Spesimen dicuci dua kali dengan PBS masing-masing selama dua menit dalam *copling* jaringan.

#### 4. Menggunakan *equilibration buffer*

- 1) Cairan di sekitar potongan jaringan disingkirkan dengan kertas pengering.
- 2) *equilibration buffer* 75  $\mu\text{l}$  diteteskan langsung pada spesimen.

- 3) Diinkubasi paling sedikit sepuluh menit pada suhu kamar.
5. Menggunakan *working strength Tdt Enzyme*
  - 1) Cairan disekitar potongan jaringan disingkirkan dengan kertas pengering.
  - 2) *Working strength Tdt Enzyme* segera ditetaskan pada potongan jaringan sebanyak  $55 \mu\text{l}/5 \text{ cm}^2$ .
  - 3) Diinkubasi selama satu jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dalam wadah yang lembab.
6. Menggunakan *stop/wash buffer*
  - 1) Spesimen diletakkan dalam *copling jaringan* yang berisi *working strength stop/wash buffer*, digoncangkan selama lima belas detik kemudian diinkubasi selama sepuluh menit pada suhu kamar.
  - 2) Anti digoxigenin *peroxidase conjugate* dikeluarkan dari tempat penyimpanan dan dihangatkan pada suhu kamar.
7. Menggunakan Anti-Digoxigenin *Peroxidase Conjugate*
  - 1) Spesimen dicuci tiga kali dengan PBS masing-masing selama satu menit.
  - 2) Cairan diantara potongan jaringan dikeringkan dengan kertas pengering.
  - 3) Anti-digoxigenin *peroxidase conjugate* ditetaskan pada sediaan, digunakan kira-kira  $65 \mu\text{l}/5 \text{ cm}^2$  pada permukaan spesimen
  - 4) Diinkubasi dalam tempat lembab selama tiga puluh menit pada suhu kamar.
8. Mencuci dalam Larutan PBS
  - 1) Spesimen dicuci sebanyak empat kali dengan PBS dalam *copling jaringan* masing-masing selama dua menit pada suhu kamar.
  - 2) Sementara mencuci sediaan, disiapkan *working strength peroxidase substrate*.
9. Pemberian warna pada sediaan dengan *peroxidase substrate*
  - 1) Cairan diantara potongan jaringan dihilangkan secara hati-hati dengan kertas pengering.

- 2) *Peroxidase substrate* ditetaskan secukupnya sampai menutupi seluruh permukaan jaringan ( $75 \mu\text{l}/5 \text{ cm}^2$ )
- 3) Dibiarkan selama sepuluh menit pada suhu kamar.
- 4) Untuk memonitor timbulnya warna dapat dilihat dengan mikroskop cahaya.

#### 10. Mencuci spesimen

- 1) Spesimen dicuci tiga kali dengan  $\text{dH}_2\text{O}$  dalam *copling* jaringan masing-masing selama satu menit.
- 2) Slide diinkubasi dengan  $\text{dH}_2\text{O}$  dalam *copling* jaringan selama lima menit pada suhu kamar.

#### 11. Pemberian *counterstain specimen*

- 1) *Fast green 0,5%* ditetaskan pada slide selama sepuluh menit pada suhu kamar.
- 2) Spesimen dicuci tiga kali dengan  $\text{dH}_2\text{O}$  masing-masing selama lima menit.

#### 12. *Mount Specimen*

- 1) Spesimen dikeringkan dengan *cylene*
- 2) Cairan diantara sediaan dihilangkan dengan kertas pengering
- 3) *Mounting medium* seperti *Permount* ditetaskan kemudian di tutup dengan *cover glass*

#### 13. Diamati dibawah mikroskop

**Lampiran 5 : Hasil pengamatan dan penghitungan jumlah sel mukosa kolon mencit BALB/C jantan yang mengalami apoptosis per 100 sel pada pembesaran 400 x**

	LP I		LP II		LP III		LP IV		Rerata
	1	2	1	2	1	2	1	2	
<b>Perlakuan I</b>									
1	8	7	5	6	10	6	11	5	7,250
2	12	11	11	9	13	12	6	11	10,625
3	10	8	12	7	9	12	7	9	9,250
4	10	14	12	11	15	12	9	14	12,125
5	6	10	7	12	8	10	9	5	8,375
<b>Perlakuan II</b>									
1	0	1	1	3	2	4	1	0	1,500
2	4	3	5	1	4	1	4	0	2,750
3	0	1	1	0	0	1	0	1	0,500
4	1	3	4	1	1	3	2	3	2,250
5	3	2	1	2	3	0	2	0	1,625
<b>Perlakuan III</b>									
1	25	21	26	20	24	19	22	26	22,875
2	18	20	25	18	15	20	16	21	19,125
3	25	19	16	21	17	22	21	15	19,500
4	16	19	16	20	22	20	17	21	18,875
5	20	15	14	18	16	19	12	17	16,375
<b>Perlakuan IV</b>									
1	25	28	26	30	30	24	21	29	26,625
2	30	26	32	35	30	35	30	37	31,875
3	28	24	33	27	35	29	34	29	29,875
4	25	21	30	28	32	27	22	28	26,625
5	30	21	32	23	26	31	27	31	27,625

Keterangan : LP = Lapang pandang



Lampiran 6 : Hasil analisis varians (*oneway*) jumlah sel mukosa kolon mencit BALB/C jantan yang mengalami apoptosis per 100 sel pada pembesaran 400x

## NPar Tests

### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Apoptosis
N		20
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	14.78125
	Std. Deviation	10.51158
Most Extreme Differences	Absolute	.124
	Positive	.124
	Negative	-.120
Kolmogorov-Smirnov Z		.554
Asymp. Sig. (2-tailed)		.919

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

## Oneway

### Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					Kontrol	5		
Sel Kanker	5	1.72500	.84963	.37997	.67004	2.77996	.500	2.750
Sel Kanker + Kunyit 0,2%	5	19.35000	2.32244	1.03863	16.46630	22.23370	16.375	22.875
Sel Kanker + Kunyit 0,6%	5	28.52500	2.29538	1.02652	25.67491	31.37509	26.625	31.875
Total	20	14.78125	10.51158	2.35046	9.86168	19.70082	.500	31.875

### Test of Homogeneity of Variances

#### Apoptosis

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.202	3	16	.341

### ANOVA

#### Apoptosis

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2039.290	3	679.763	181.025	.000
Within Groups	60.081	16	3.755		
Total	2099.371	19			

## Post Hoc Tests

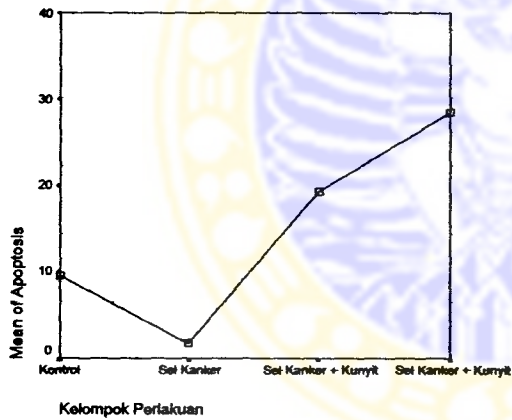
### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Apoptosis  
LSD

(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Sel Kanker	7.80000*	1.22557	.000	5.20190	10.39810
	Sel Kanker + Kunyit 0,2%	-9.82500*	1.22557	.000	-12.42310	-7.22690
	Sel Kanker + Kunyit 0,6%	-19.00000*	1.22557	.000	-21.59810	-16.40190
Sel Kanker	Kontrol	-7.80000*	1.22557	.000	-10.39810	-5.20190
	Sel Kanker + Kunyit 0,2%	-17.62500*	1.22557	.000	-20.22310	-15.02690
	Sel Kanker + Kunyit 0,6%	-26.80000*	1.22557	.000	-29.39810	-24.20190
Sel Kanker + Kunyit 0,2%	Kontrol	9.82500*	1.22557	.000	7.22690	12.42310
	Sel Kanker	17.62500*	1.22557	.000	15.02690	20.22310
	Sel Kanker + Kunyit 0,6%	-9.17500*	1.22557	.000	-11.77310	-6.57690
Sel Kanker + Kunyit 0,6%	Kontrol	19.00000*	1.22557	.000	16.40190	21.59810
	Sel Kanker	26.80000*	1.22557	.000	24.20190	29.39810
	Sel Kanker + Kunyit 0,2%	9.17500*	1.22557	.000	6.57690	11.77310

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

## Means Plots



## Lampiran 7 : Hasil Uji t 2 Sampel Bebas

## T-Test

## Group Statistics

Kelompok Perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Apoptosis	Kontrol	5	9.52500	1.90681	.85275
	Sel Kanker	5	1.72500	.84963	.37997

## Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Apoptosis	Equal variances assumed	3.246	.109	8.355	8	.000	7.80000	.93358	5.64717	9.95283
	Equal variances not assumed			8.355	5.528	.000	7.80000	.93358	5.46751	10.13249