



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**Hambatan Karsinogenesis Ekstrak Bji dan Bungkil Kedelai pada  
Kolon Mencit : Fokus pada Apoptosis, Displasia, Hiperplasia, dan  
Mitosis**

**TESIS**

**ANINDINI WINDA AMALIA**

**NPM: 1406598636**

**FAKULTAS FARMASI  
PROGRAM STUDI HERBAL MEDIK  
DEPOK  
JANUARI 2017**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**Hambatan Karsinogenesis Ekstrak Biji dan Bungkil Kedelai pada  
Kolon Mencit : Fokus pada Apoptosis, Displasia, Hiperplasia, dan  
Mitosis**

**TESIS**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains**

**ANINDINI WINDA AMALIA**

**NPM: 1406598636**

**FAKULTAS FARMASI  
PROGRAM STUDI HERBAL MEDIK  
DEPOK  
JANUARI 2017**

## HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :

Nama : Anindini Winda Amalia  
NPM : 1406598636  
Program Studi : Herbal Medik  
Judul Tesis : Hambatan Karsinogenesis Ekstrak Biji dan Bungkil  
Kedelai pada Kolon Mencit: Fokus pada Apoptosis,  
Displasia, Hiperplasia, dan Mitosis

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Herbal pada Program Studi Herbal Medik Fakultas Farmasi Universitas Indonesia

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof. Dr. Berna Elya, M. Si, Apt (  )  
Pembimbing II : Dr. Kusmardi, MS (  )  
Penguji I : Dr. Katrin, MS, Apt (  )  
Penguji II : Dr. Kurnia Agustini M. Si, Apt (  )  
Ketua Sidang : Dr. Anton Bahtiar, M. Biomed, Apt (  )

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 3 Januari 2017

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Anindini Winda Amalia

NPM : 1406598636

Tanda Tangan



Tanggal : 3 Januari 2017

## HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Anindini Winda Amalia  
NPM : 1406598636  
Program Studi : Magister Herbal  
Fakultas : Farmasi  
Jenis karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Hambatan Karsinogenesis Ekstrak Biji dan Bungkil Kedelai pada Kolon Mencit: Fokus pada Apoptosis, Displasia, Hiperplasia, dan Mitosis

berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 3 Januari 2017

Yang menandatangani



The image shows a handwritten signature in black ink over a 5000 Rupiah banknote. The signature is written in a cursive style. The banknote is green and yellow, with the number '5000' and the text 'LIMA RIBU RUPIAH' visible. The banknote also features the Garuda Pancasila logo and the serial number '02553AEF359138784'.

(Anindini Winda Amalia)

## ABSTRAK

Nama : Anindini Winda Amalia  
Program Studi : Herbal Medik  
Judul Tesis : Hambatan Karsinogenesis Ekstrak Biji dan Bungkil Kedelai pada Kolon Mencit: Fokus pada Apoptosis, Displasia, Hiperplasia, dan Mitosis

Kanker colorektal merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat yang utama. Banyak penelitian telah membuktikan bahwa kedelai memiliki kemampuan kemopreventif dan anti kanker. Penelitian ini menyelidiki hambatan karsinogenesis ekstrak biji kedelai (EK) dan bungkil kedelai (EB) yang mengandung lunasin pada model kanker kolon *in vivo*. Pada penelitian ini menggunakan mencit jantan Swiss Webster berusia 12 minggu yang diinduksi azoxymethane (AOM) (10 mg/kg) dan dextran natrium sulfat (DSS) 2%. Apoptosis, displasia, hiperplasia dan mitosis merupakan penanda terjadinya karsinogenesis kolon. Hasilnya pemberian ekstrak biji dan bungkil kedelai meningkatkan apoptosis ( $p=0,001$ ), dengan efek terbaik ditunjukkan oleh EK<sub>2</sub> (150 mg/ 20gr BB)( $p=0,009$ ) dan EB<sub>1</sub> (75 mg/ 20gr BB)( $p=0,436$ ). Pemberian ekstrak biji dan bungkil kedelai menurunkan displasia (0,024), dengan efek terbaik ditunjukkan oleh EK<sub>3</sub> (200 mg/ 20gr BB)( $p=0,0002$ ) dan EB<sub>3</sub> (200 mg/ 20gr BB)( $p=0,003$ ). Pemberian ekstrak biji dan bungkil kedelai menurunkan hiperplasia (0,000), dengan efek terbaik ditunjukkan oleh EK<sub>3</sub> (200 mg/ 20gr BB)( $p=0,000$ ) dan EB<sub>3</sub> (200 mg/ 20gr BB)( $p=0,002$ ). Pemberian ekstrak biji dan bungkil kedelai menurunkan mitosis (0,008), dengan efek terbaik ditunjukkan oleh EK<sub>3</sub> (200 mg/ 20gr BB)( $p=0,003$ ) dan EB<sub>1</sub> (75 mg/ 20gr BB)( $p=0,173$ ). Pemberian ekstrak biji dan bungkil dapat menghambat karsinogenesis kolon ditinjau dari meningkatnya apoptosis serta berkurangnya displasia, hiperplasia, dan mitosis sel.

Kata kunci : Azoxymethane, Apoptosis, Displasia, DSS, Hiperplasia, Kedelai, Lunasin, Mitosis

## ABSTRACT

Name : Anindini Winda Amalia  
Program Study : Magister Herbal  
Title : Inhibition of carcinogenesis by seed and soybean meal extract in colon of mice: apoptosis, dysplasia, hyperplasia, and mitosis

Colon cancer is major public health problems. Many research prove that soybeans shown chemopreventive and anti-cancer effect. This study investigates the inhibition of carcinogenesis soybean seed extract (EK) and soybean meal extract (EB) containing lunasin in colon cancer models in vivo. In this study use male Swiss Webster mice aged 12 weeks, induced azoxymethane (AOM) (10 mg / kg) and dextran sodium sulfate (DSS) 2%. Apoptosis, dysplasia, hyperplasia and mitosis is a marker of colon carcinogenesis. The result is the provision of soybean seed and soybean meal increase apoptosis ( $p = 0.001$ ), with the best effects shown by EK2 (150 mg / 20gr BB) ( $p = 0.009$ ) and EB1 (75 mg / 20gr BB) ( $p = 0.436$ ). Soybean seed and soybean meal extract decrease dysplasia ( $p=0.024$ ), with the best effect shown by EK3 (200 mg / 20gr BB) ( $p = 0.0002$ ) and EB3 (200 mg / 20gr BB) ( $p = 0.003$ ). Soybean seed extract and soybean meal extract decrease hyperplasia ( $p=0.000$ ), with the best effects shown by EK3 (200 mg / 20gr BB) ( $p = 0.000$ ) and EB3 (200 mg / 20gr BB) ( $p = 0.002$ ). Soybean seed and soybean meal extract decrease mitosis ( $p=0.008$ ), with the best effect shown by EK3 (200 mg / 20gr BB) ( $p = 0.003$ ) and EB1 (75 mg / 20gr BB) ( $p = 0.173$ ). Soybean seeds and soybean meal extract can inhibit colon carcinogenesis in terms of increase apoptosis and decrease dysplasia, hyperplasia and mitosis.

Kata kunci : Azoxymethane, Apoptosis, Dysplasia, DSS, Hyperplasia, Lunasin, Mitosis, Soybean

## KATA PENGANTAR

Puji Syukur saya panjatkan kehadirat Allah SWT karena atas berkat rahmat dan rahimNya saya dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “**Hambatan Karsinogenesis Ekstrak Biji dan Bungkil Kedelai pada Kolon Mencit: Fokus pada Apoptosis, Displasia, Hiperplasia, dan Mitosis**”. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Sains pada Fakultas Farmasi Universitas Indonesia.

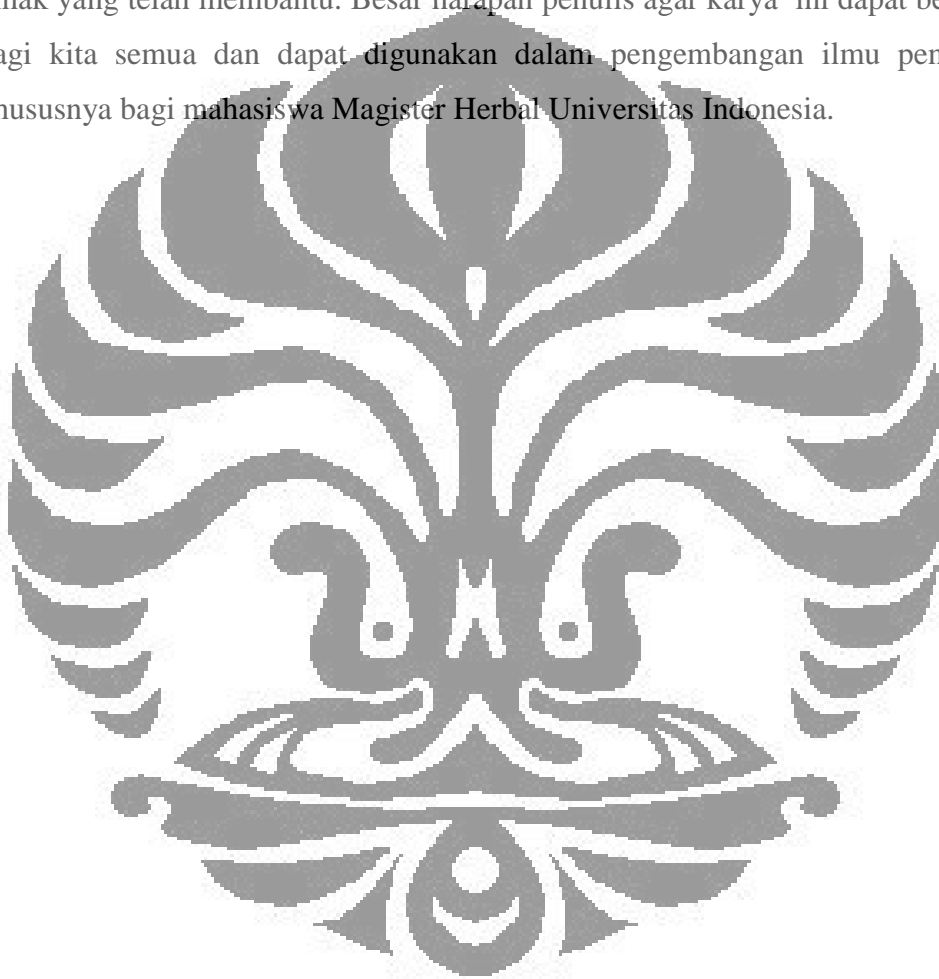
Saya menyadari banyaknya bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari awal kuliah sampai selesai penyusunan tesis ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

- (1) Prof. Dr. Berna Elya, M.Si, Apt selaku dosen pembimbing I yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini;
- (2) Dr. Kusmardi, MS, selaku dosen pembimbing II atas segala pendampingan dan kesedian beliau dalam penyusunan tesis ini;
- (3) Dr. Katrin, MS selaku penguji I yang telah memberikan bimbingan dan saran;
- (4) Dr. Kurnia Agustin, M.Si, Apt selaku penguji II yang telah memberikan bimbingan dan saran;
- (5) Dr. Anton Bahtiar, M.Biomed, Apt selaku ketua sidang yang telah memberikan bimbingan dan saran;
- (6) Prof. Dr. Effionora, M.Si, Apt selaku ketua Program Studi Magister Fakultas Farmasi Universitas Indonesia;
- (7) Bapak dan ibu pengajar Magister Herbal Fakultas Farmasi Universitas Indonesia atas ilmu pengetahuan dan bantuan yang telah diberikan selama menempuh pendidikan di Magister Herbal;
- (8) Seluruh teknisi Pusat Biofarmaka LPPM-IPB atas dukungannya;
- (9) Teknisi laboratorium patologi eksperimental FK UI, atas dukungan penelitian in vivo;



- (10) Seluruh teman-teman S2 Herbal Universitas Indonesia yang selalu memberikan doa, dukungan, dan semangat kepada penulis;
- (11) Orang tua dan keluarga saya yang telah memberikan bantuan dukungan material dan moral; dan
- (12) Sahabat yang telah membantu saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Akhir kata, saya berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Besar harapan penulis agar karya ini dapat bermanfaat bagi kita semua dan dapat digunakan dalam pengembangan ilmu pengetahuan khususnya bagi mahasiswa Magister Herbal Universitas Indonesia.



Penulis  
2017

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS .....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI ILMIAH .....	v
ABSTRAK .....	vi
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xiii
DAFTAR TABEL .....	xiv
DAFTAR AKRONIM .....	xv
<b>1. PENDAHULUAN</b>	
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian .....	5
1.3.1. Tujuan Umum .....	5
1.3.2. Tujuan Khusus .....	5
1.4. Hipotesis Penelitian .....	5
1.5. Manfaat Penelitian .....	6
1.5.1. Manfaat Teoritik .....	6
1.5.2. Manfaat Praktis .....	6
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1. Kanker Kolorektal .....	7
2.1.1. Anatomi dan Histologi Usus Besar .....	7
2.1.2. Pengertian Kanker Kolorektal .....	9
2.1.3. Penyebab .....	10
2.1.3.1. Faktor Internal .....	10
2.1.3.2. Faktor Eksternal .....	10
2.1.4. Tanda dan Gejala .....	11
2.1.5. Patogenesis .....	12
2.1.5.1. Adenoma-carcinoma sequence.....	13
2.1.5.2. Jalur HNPCC .....	16
2.1.5.3. Jalur de novo.....	16
2.1.5.4. Jalur colitis cancer .....	17
2.2. Karsinogenesis Kolorektal .....	17
2.3. Model Karsinogenesis Kolorektal dengan Induksi Azoksimetan (AOM) dan Dextran Sodium Sulfate (DSS) .....	21

2.4. Aspirin .....	26
2.5. Kedelai .....	30
2.6. Lunasin .....	32
2.7. Apoptosis .....	35
2.8. Lesi Premaligna Kanker Kolorektal .....	38
2.8.1. Hiperplasia .....	40
2.8.2. Displasia .....	40
2.9. Mitosis .....	42
2.10 Ekstraksi .....	43
2.11 Kerangka Konsep .....	47

### **3. METODOLOGI PENELITIAN**

3.1. Desain Penelitian .....	48
3.2. Tempat dan Waktu Penelitian .....	48
3.3. Bahan Penelitian .....	48
3.3.1. Simplisia Biji Kedelai .....	48
3.3.2. Bungkil Kedelai .....	49
3.3.3. Hewan Coba .....	49
3.3.4. Bahan Kimia .....	49
3.3.5. Alat Penelitian .....	50
3.4. Parameter simplisia .....	50
3.4.1. Mikroskopik .....	50
3.4.2. Penetapan Kadar Air .....	50
3.4.3. Penetapan Kadar Abu .....	50
3.4.4. Penetapan Kadar Sari Larut Air .....	51
3.4.5. Penetapan Kadar Sari Larut Etanol .....	51
3.5. Produser Pelaksanaan .....	52
3.6. Pembuatan Ekstraksi Biji dan Bungkil Kedelai .....	52
3.6.1. Preparasi Biji dan Bungkil Kedelai .....	52
3.6.2. Optimasi Ekstraksi Biji dan Bungkil Kedelai .....	53
3.6.3. Penentuan Kandungan Lunasin dengan Metode HPLC ....	53
3.6.4. Pembuatan Ekstrak Biji dan Bungkil Kedelai .....	54
3.7. Parameter Ekstrak .....	55
3.7.1. Penetapan Kadar Air .....	55
3.7.2. Penetapan Kadar Abu .....	55
3.7.3. Penetapan Kadar Abu Tak Larut Asam .....	55
3.7.4. Penetapan Cemarkan Mikroba .....	56
3.7.5. Penetapan Cemarkan Logam Berat .....	57
3.8. Identifikasi Senyawa Fitokimia .....	58
3.9. Pengujian In Vivo Hambatan Karsinogenesis pada Kolon Mencit	60
3.9.1. Populasi dan Sampel .....	60
3.9.2. Jumlah Sampel .....	60

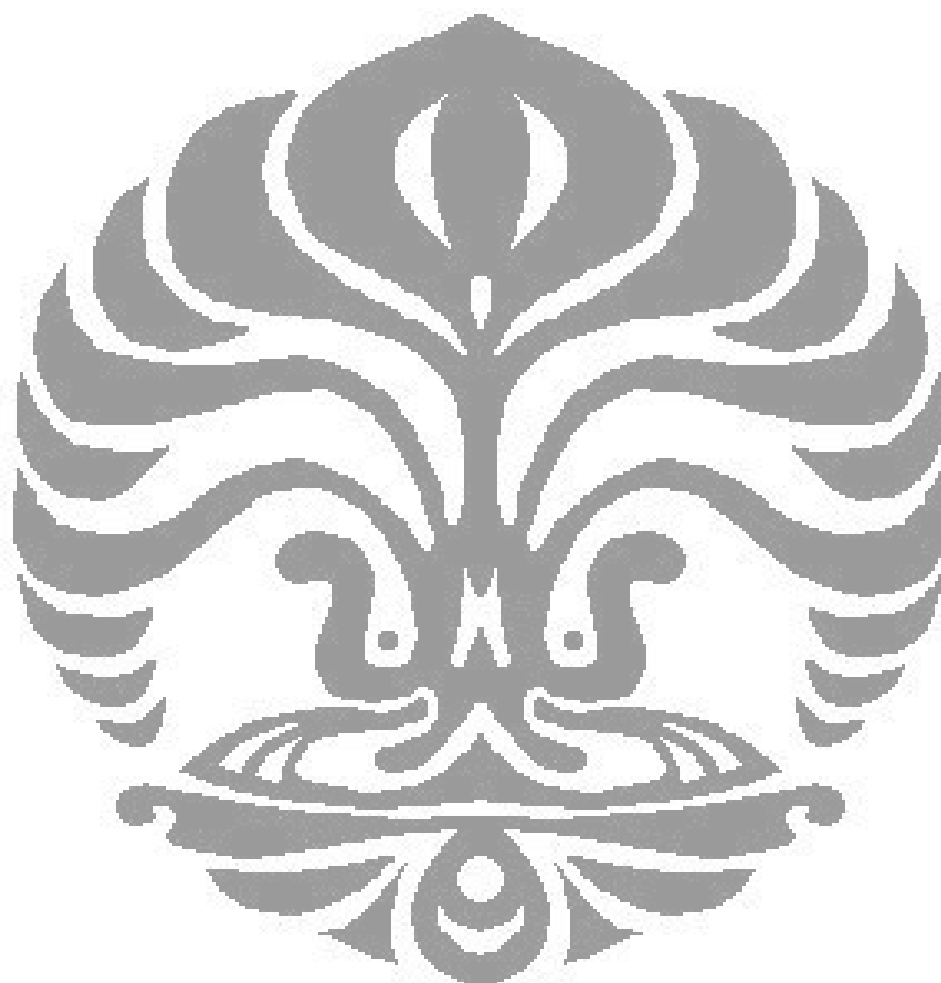
3.9.3. Etika Penelitian .....	62
3.9.4. Cara Kerja .....	62
3.9.5. Pewarnaan Hematoksin dan Eosin .....	63
3.9.6. Pewarnaan Imunohistokimia Caspase-3.....	64
3.9.7. Intepretasi Pengamatan Hispatologi .....	65
3.9.8. Intepreatasi Hasil Ekspresi Caspase-3 .....	65
3.10. Identifikasi Variabel .....	66
3.11. Definisi Operasional .....	66
3.12. Analisis Data .....	67
<b>4. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1. Ekstraksi .....	68
4.2. Pengujian Sisa Pelarut .....	68
4.3. Parameter Biji Kedelai .....	70
4.4. Parameter Ekstrak Biji dan Bungkil Kedelai .....	70
4.5. Kandungan Lunasin dalam Ekstrak Biji dan Bungkil Kedelai .....	73
4.6. Skrining Fitokimia Ekstrak Biji dan Bungkil Kedelai .....	74
4.7. Efek Pemberian Ekstrak Biji dan Bungkil Kedelai Terhadap Berat Badan Mencit yang Diinduksi AOM dan DSS.....	78
4.8. Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji dan Bungkil Terhadap Apoptosis .....	80
4.9. Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji dan Bungkil Terhadap Displasia .....	84
4.10. Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji dan Bungkil Terhadap Hiperplasia .....	86
4.11 Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji dan Bungkil Terhadap Mitosis .....	88
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1. Kesimpulan .....	89
5.2. Saran .....	89

## DAFTAR GAMBAR

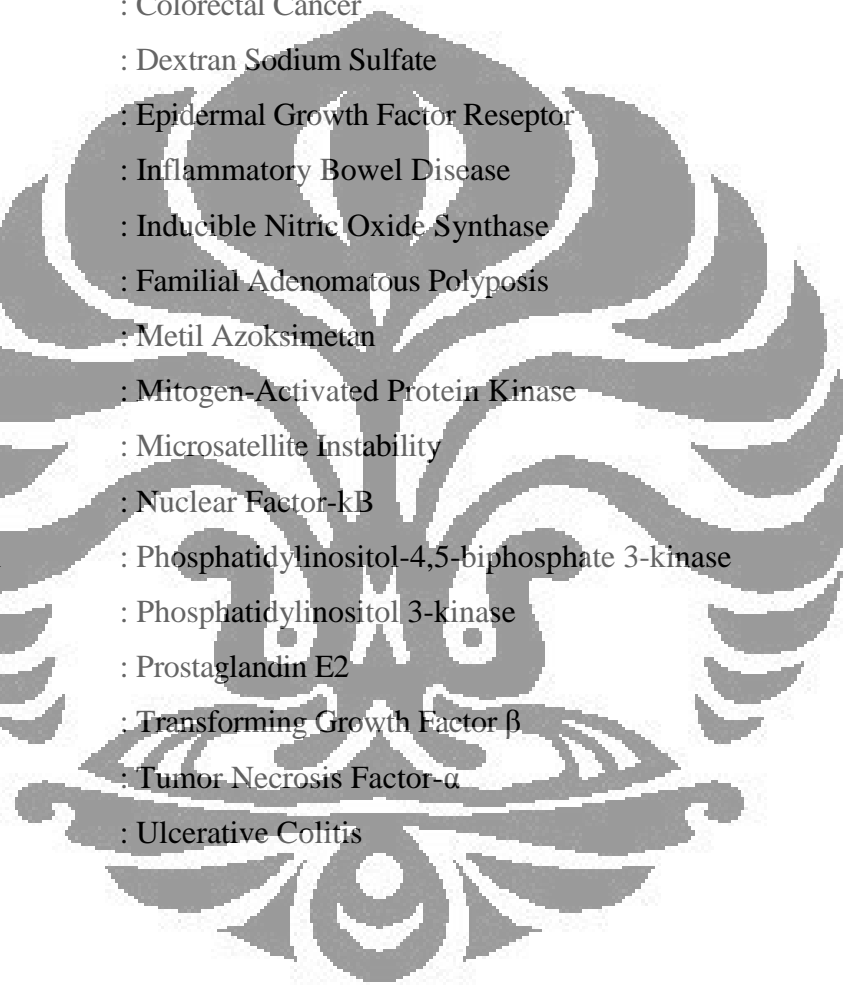
Gambar 2.1.	Anatomi Kolon dan Rektum Normal .....	7
Gambar 2.2.	Histologi Usus Besar .....	8
Gambar 2.3.	Peningkatan Laju Pembelahan Sel dan Penurunan Laju Apoptosis yang Memicu Perkembangan Tumor .....	12
Gambar 2.4.	Jenis Karsinogenesis Korektal pada Manusia.....	13
Gambar 2.5.	Mekanisme Karsinogenesis .....	20
Gambar 2.6.	Metabolisme Azoksimetan .....	22
Gambar 2.7.	Jalur Sinyal Azoksimetan .....	24
Gambar 2.8.	Histologi Lesi Kolon Tikus yang Diinduksi AOM dan DSS....	26
Gambar 2.9	Struktur Aerosol .....	26
Gambar 2.10	Mekanisme Kerja Aspirin dalam Menghambat Sikloosigenase.....	27
Gambar 2.11.	Mekanisme Molekuler Aspirin .....	29
Gambar 2.12	Kedelai ( <i>Glycine max</i> ).....	30
Gambar 2.13	Mekanisme Kerja Lunasin .....	34
Gambar 2.14	Regulasi Apoptosis .....	38
Gambar 2.15	<i>Colorectal Cancer Premaligna Lesion</i> .....	39
Gambar 2.16	Fase Mitosis .....	42
Gambar 2.17	Proses Menjadi Aneuploid.....	43
Gambar 2.17	Bagan Kerangka Konsep .....	47
Gambar 3.1	Kedelai Grobogan .....	48
Gambar 3.2	Bungkil Kedelai.....	49
Gambar 3.3	Skema Prosedur Penelitian .....	52
Gambar 3.4	Alur Penelitian Hambatan Karsinogenesis pada Kolon Mencit	63
Gambar 3.5	Skema Hubungan Antar Variabel Penelitian.....	66
Gambar 4.1	Hasil Ekstrak Kering Biji Kedelai dan Bungkil Kedelai .....	68
Gambar 4.2	Hasil skrining fitokimia alkaloid .....	75
Gambar 4.3	Hasil skrining fitokimia flavonoid .....	76
Gambar 4.4	Hasil skrining fitokimia steroid/terpenoid .....	76
Gambar 4.5	Hasil skrining fitokimia polifenol/tanin .....	77
Gambar 4.6	Hasil skrining fitokimia saponin.....	77
Gambar 4.7	Rerata Berat Badan Mencit .....	78
Gambar 4.8	Grafik Rerata Skor Apoptosis .....	80
Gambar 4.9	Gambaran Imunohistokimia Caspase-3.....	81
Gambar 4.10	Grafik Rerata Skor Displasia .....	84
Gambar 4.11	Gambaran HE Displasia .....	85
Gambar 4.12	Grafik Rerata Skor Hiperplasia .....	87
Gambar 4.13	Grafik Rerata Skor Mitosis .....	88

## DAFTAR TABEL

Tabel 3.1.	Kelompok Perlakuan .....	61
Tabel 4.1.	Sisa pelarut fosfat dalam ekstrak PBS biji dan bungkil kedelai.....	69
Tabel 4.2.	Parameter biji kedelai varietas grobogan .....	70
Tabel 4.3.	Parameter ekstrak biji dan bungkil kedelai .....	71
Tabel 4.4.	Kandungan lunasin pada ekstrak biji dan bungkil kedelai .....	74
Tabel 4.5.	Hasil skrining fitokimia ekstrak kedelai dan bungkil kedelai .....	75



## DAFTAR AKRONIM



ACF	: Aberrant Crypt Foci
AOM	: Azoksimetan
APC	: Adenomatous Polyposis Coli
CD	: Crohn Disease
COX	: Cyclooxygenase
CRC	: Colorectal Cancer
DSS	: Dextran Sodium Sulfate
EGFR	: Epidermal Growth Factor Reseptor
IBD	: Inflammatory Bowel Disease
INOS	: Inducible Nitric Oxide Synthase
FAP	: Familial Adenomatous Polyposis
MAM	: Metil Azoksimetan
MAPK	: Mitogen-Activated Protein Kinase
MSI	: Microsatellite Instability
NF- $\kappa$ B	: Nuclear Factor- $\kappa$ B
PIK3CA	: Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase
PI3K	: Phosphatidylinositol 3-kinase
PGE <sub>2</sub>	: Prostaglandin E <sub>2</sub>
TGF- $\beta$	: Transforming Growth Factor $\beta$
TNF- $\alpha$	: Tumor Necrosis Factor- $\alpha$
UC	: Ulcerative Colitis

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan salah satu penyebab morbiditas dan mortalitas di seluruh dunia, terdapat sekitar 14 juta kasus baru dan 8,2 juta kematian terkait kanker pada tahun 2012. Kanker paru, kanker hati, kanker lambung, kanker kolorektal, kanker payudara, dan kanker esofagus adalah penyebab terbesar kematian akibat kanker setiap tahunnya. Kanker kolorektal (*colorectal cancer, CRC*) menempati posisi ketiga (lebih dari 940.000 kasus) setelah kanker paru (1,2 juta kasus) dan kanker payudara (1 juta kasus) (WHO, 2015).

*International Agency for Research on Cancer (IARC)* menyatakan prevalensi CRC di seluruh dunia hampir sama antara laki-laki dan perempuan, pada laki-laki sebanyak 746.000 kasus (10% dari total) dan pada perempuan sebanyak 614.000 kasus (9,2% dari total). Hampir 55% kasus CRC terjadi di negara-negara maju. Angka kejadian tertinggi terjadi di Australia dan Selandia Baru (laki-laki sebanyak 44,8 per 100.000 dan wanita sebanyak 32,2 per 100.000), sedangkan angka kejadian terendah di Afrika Barat (laki-laki sebanyak 4,5 per 100.000 dan wanita sebanyak 3,8 per 100.000) (IARC, 2012).

CRC banyak terjadi di negara maju, namun tidak dipungkiri saat ini angka kejadian kanker kolorektal juga meningkat prevalensinya di negara-negara berkembang. Hal tersebut terjadi karena perubahan pola hidup masyarakat antara lain: peningkatan konsumsi daging dan makanan olahan, menurunnya konsumsi makanan berserat (buah-buahan dan sayuran), peningkatan berat badan (obesitas), aktifitas fisik yang rendah, merokok, dan asupan alkohol yang tinggi (Theodoratou, Farrington, Tenesa, McNeill, Cetnarskyj, Korakakis, et al, 2014).

Prevalensi CRC di Asia Tenggara meningkat tiap tahunnya. CRC di Asia Tenggara sebanyak 6,95/100.000 populasi. Hal tersebut cukup rendah bila dibandingkan dengan insiden yang terjadi di negara-negara maju, namun lebih tinggi bila dibandingkan dengan insiden yang terjadi di Sub Sahara Afrika (Kokki, Papana, Campbell, dan Theodoratou, 2013).



CRC merupakan salah satu masalah kesehatan yang ada di Indonesia dan saat ini menempati urutan kanker nomor tiga paling banyak terjadi diantara kanker yang lain. Insiden CRC di Indonesia per 100.000 penduduk adalah 19,1 untuk laki-laki dan 15,6 untuk wanita (Ferlay, Shin, Forman, Mathers, dan Parkin, 2010). Insiden CRC di Indonesia lebih rendah daripada insiden di Australia, Selandia Baru, dan Eropa Barat, namun insiden kasus CRC di Indonesia termasuk tinggi karena negara ini menempati urutan keempat populasi penduduk terbesar di dunia dengan lebih dari 235 juta penduduk (Abdullah, Sudoyo, Utomo, Fauzi, dan Rani, 2012).

Pasien CRC di Indonesia lebih banyak terjadi usia lebih muda bila dibandingkan dengan pasien CRC di negara maju. Lebih dari 30% kasus berusia 40 tahun atau lebih muda (Departemen Kesehatan RI, 1995), sedangkan di negara maju pasien yang lebih muda dari 50 tahun hanya 2 – 8 % (Parramore, Wei, Yeh, 1998; Lee, Fletcher, Sullivan, Vetto, 1994). Kejadian CRC di negara maju dikaitkan dengan kelainan genetik atau herediter (Turkiewicz, Fletcher, Sullivan, Vetto, 1994; Chung, Eu, Machin, Ho, Nyam, Leong, et al, 1998), sedangkan di Indonesia bersifat sporadik dan meningkat kejadiannya pada masa produktif seseorang (Abdullah, Sudoyo, Utomo, Fauzi, dan Rani, 2012). Hal tersebut tentunya menjadi masalah kesehatan utama di Indonesia.

Pengobatan kanker sampai saat ini masih dilakukan melalui pembedahan, kemoterapi, dan radiasi. Pengobatan dengan kemoterapi masih belum memberikan hasil yang memuaskan terutama pada kanker yang mengalami metastasis, karena selektivitas dan spesifitas obat kanker sangat rendah, sehingga dapat menimbulkan efek samping yang serius (Wahyuningsih, 2010). Hal ini yang menjadi pendorong untuk mencari obat kanker baru yang lebih selektif dan sensitif. Saat ini telah banyak penelitian untuk mencari obat kanker dengan bahan alam yang diyakini dapat menekan efek samping tersebut.

Salah satu pemakaian bahan alam untuk terapi kanker adalah dengan menggunakan kedelai. Protein yang ada di kedelai diketahui dapat menghambat pertumbuhan kanker kolon. Sebuah studi dari Rayaprolu, Hettiarachchy, Chen, Kannan, dan Mauromostakos (2013) menunjukkan bahwa peptida yang berasal

dari bungkil kedelai secara signifikan menghambat pertumbuhan sel sebesar 73% untuk kanker kolon (HCT-116). Pada sebuah studi meta-analisis dan kontrol studi kasus menunjukkan konsumsi kedelai dapat mengurangi risiko CRC secara signifikan terutama pada populasi orang Asia (Yu, Jing, Li, Zhao, & Wang, 2016).

Lunasin, turunan bioaktif peptida dari kedelai sebagai peptida baru yang diperoleh dari ekstraksi biji kedelai telah diteliti memiliki dampak positif pada sejumlah fungsi fisiologis dalam tubuh. Lunasin terdiri dari 43 residu asam amino dengan berat molekul 5,5 kDa. Pada beberapa penelitian, lunasin menunjukkan efek antioksidan, anti-inflamasi, antikanker, dan mengatur biosintesis kolesterol dalam tubuh (Lule, Garg, Pophaly, Hitesh, & Tomar, 2015).

Lunasin telah terbukti memiliki efek antikanker yang kuat melalui penghambatan asetilasi histon dan efek antiinflamasi melalui supresi NF- $\kappa$ B (Aluko, 2012). Lunasin selektif membunuh sel-sel yang berubah dengan mengganggu dinamika asetilasi-deasetilasi histon saat transformasi terjadi. Protein Rb supresor tumor berinteraksi dengan promotor E2F dan HDAC menjaga histon inti dalam keadaan deasetilasi. Inaktivasi Rb oleh onkoprotein E1A memisahkan kompleks Rb-HDAC dan membuat histon inti mengalami asetilasi oleh *histone acetyltransferase* (HATs). Lunasin dapat bersaing dengan HATs untuk berikatan dengan deasetilasi histon inti dalam menghentikan transkripsi dan membuat sel apoptosis. Ketika terjadi perubahan sel menjadi abnormal yang membuat supresor tumor p53 dilemahkan, lunasin mengambil alih sebagai supresor tumor pengganti dan selektif membunuh sel yang berubah (Hernández-Ledesma & de Lumen, 2008). Hal tersebut membuat lunasin menjadi salah satu bahan alam yang dapat direkomendasikan sebagai kemopreventif untuk mengatasi kanker.

Studi dengan sel kanker kolon secara *in vitro* menunjukkan lunasin menyebabkan fase siklus sel G2/M *arrest* dan menginduksi apoptosis jalur mitokondria. Hal ini mengakibatkan peningkatan aktivitas caspase-9 dan aktivitas caspase-3 (eksekutor apoptosis) pada sel kanker kolon H-29 dan KM12L4 yang diberi lunasin (Dia & de Mejia, 2010). Mekanisme ini menunjukkan bahwa lunasin dapat menginduksi apoptosis pada sel kanker kolon manusia.

Pemberian lunasin secara *in vivo* dengan injeksi intraperitoneal (4 mg/kg BB hari) mengurangi metastasis kanker kolon secara signifikan. Namun pemberian secara oral (20 mg/kg BB) tidak signifikan mengurangi metastasis kanker kolon (Dia & de Mejia, 2013). Hal ini yang menjadi salah satu alasan penelitian ini dilakukan, karena belum ada penelitian lebih lanjut tentang pemberian lunasin pada dosis oral untuk menghambat preneoplasia kanker kolon secara *in vivo*.

Perubahan sel epitel normal usus besar menjadi CRC merupakan akumulasi perubahan molekuler genetik yang menyebabkan gangguan dalam pertumbuhan sel, diferensiasi, dan apoptosis. Hal tersebut diketahui dapat merubah homeostasis antara proliferasi dan apoptosis pada sel epitel usus besar dan selama perkembangan kanker homeostatis tersebut akan terganggu secara progresif. Proliferasi sel akan meningkat sebanding dengan tingkat keparahan hiperplasia yang terjadi serta dapat berkembang lebih lanjut menjadi displasia, dan pada akhirnya bila proliferasi tersebut terus terjadi tanpa diimbangi dengan apoptosis dapat menjadi CRC (Koornstra, de Jong, Hollema, de Vries, Kleibeuker, 2003).

Induksi kanker kolorektal dengan AOM dan DSS sebanyak 1% atau lebih sudah cukup memberikan efek yang kuat terhadap promosi tumor di mencit atau tikus dalam 14 minggu (Suzuki, Konho, Sugie, Tanaka, 2005). Keuntungan yang diperoleh dari model ini adalah murah, karsinogen yang poten, nyaman, valid, *well appreciated*, dan digunakan secara luas (Suzuki, Miyamoto, Yasui, Sugie, Tanaka, 2007). Induksi AOM memberikan hasil yang sama dengan kanker kolorektal sporadik manusia dalam hal terjadinya respon dengan bahan promosi dan preventif (Rosenberg, Giardina, Tanaka, 2009)

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efektifitas ekstrak biji dang bungkil kedelai pada hambatan karsinogenesis kolon mencit yang diinduksi Azoksimetan (AOM) dan dextran sodium sulfat (DSS) dengan berfokus pada apoptosis, hiperplasia, displasia, dan mitosis sel epitel kolon mencit.

## 1.2 Rumusan Masalah

Prevalensi dan mortalitas penyakit kanker kolorektal terus meningkat. Lunasin dari kedelai dipercaya memiliki aktivitas kemopreventif, dapat dijadikan

**Universitas Indonesia**

salah satu pilihan untuk mengatasi kanker kolorektal. Apoptosis, displasia, hiperplasia, dan mitosis pada sel epitel kolon dapat menjadi tanda awal dalam perkembangan kanker kolorektal. Rumusan masalah penelitian ini :

- a. Apakah ekstrak biji kedelai dapat menghambat karsinogenesis pada kolon mencit ditinjau dari apoptosis, displasia, hiperplasia, dan mitosis?
- b. Apakah ekstrak bungkil kedelai dapat menghambat karsinogenesis pada kolon mencit ditinjau dari apoptosis, displasia, hiperplasia, dan mitosis?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1 Tujuan Umum**

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk membuktikan ekstrak biji dan bungkil kedelai dapat menghambat karsinogenesis pada kolon mencit yang diinduksi Azoksimetan (AOM) dan Dextran Sodium Sulfate (DSS).

#### **1.3.2 Tujuan Khusus**

Tujuan khusus penelitian ini adalah untuk:

- a. Membuktikan ekstrak biji kedelai dapat menghambat karsinogenesis pada kolon mencit ditinjau dari apoptosis, displasia, hiperplasia, dan mitosis.
- b. Membuktikan ekstrak bungkil kedelai dapat menghambat karsinogenesis pada kolon mencit ditinjau dari apoptosis, displasia, hiperplasia, dan mitosis.

### **1.4 Hipotesis Penelitian**

Hipotesis pada penelitian ini:

- a. Ekstrak biji kedelai dapat menghambat karsinogenesis pada kolon mencit ditinjau dari meningkatnya apoptosis serta berkurangnya displasia, hiperplasia, dan mitosis.
- b. Ekstrak bungkil kedelai dapat menghambat karsinogenesis pada kolon mencit ditinjau dari meningkatnya apoptosis serta berkurangnya displasia, hiperplasia, dan mitosis.

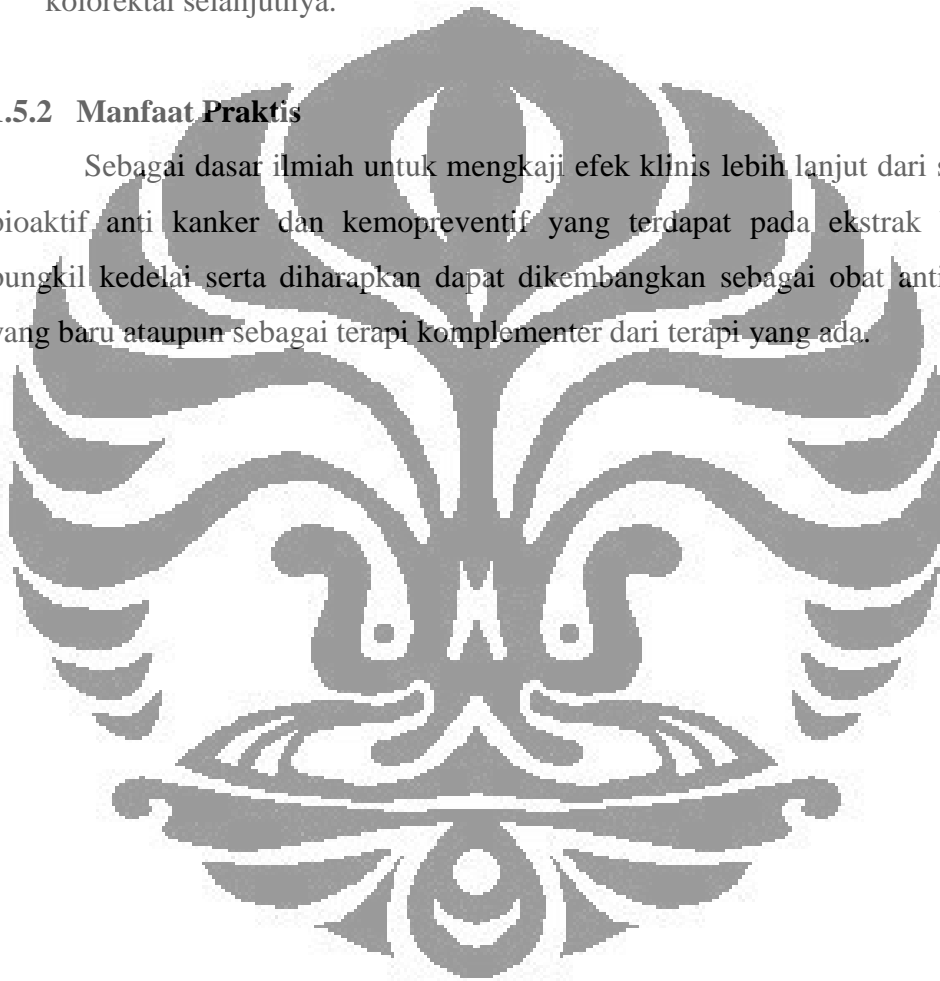
## 1.5 Manfaat Penelitian

### 1.5.1 Manfaat Teoritik

- a. Diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai kemampuan ekstrak biji dan bungkil kedelai dalam menghambat karsinogenesis pada kolon mencit yang diinduksi AOM dan DSS ditinjau dari apoptosis, displasia, hiperplasia, dan mitosis.
- b. Memberikan kontribusi ilmiah terhadap penelitian-penelitian kanker kolorektal selanjutnya.

### 1.5.2 Manfaat Praktis

Sebagai dasar ilmiah untuk mengkaji efek klinis lebih lanjut dari senyawa bioaktif anti kanker dan kemopreventif yang terdapat pada ekstrak biji dan bungkil kedelai serta diharapkan dapat dikembangkan sebagai obat anti kanker yang baru ataupun sebagai terapi komplementer dari terapi yang ada.



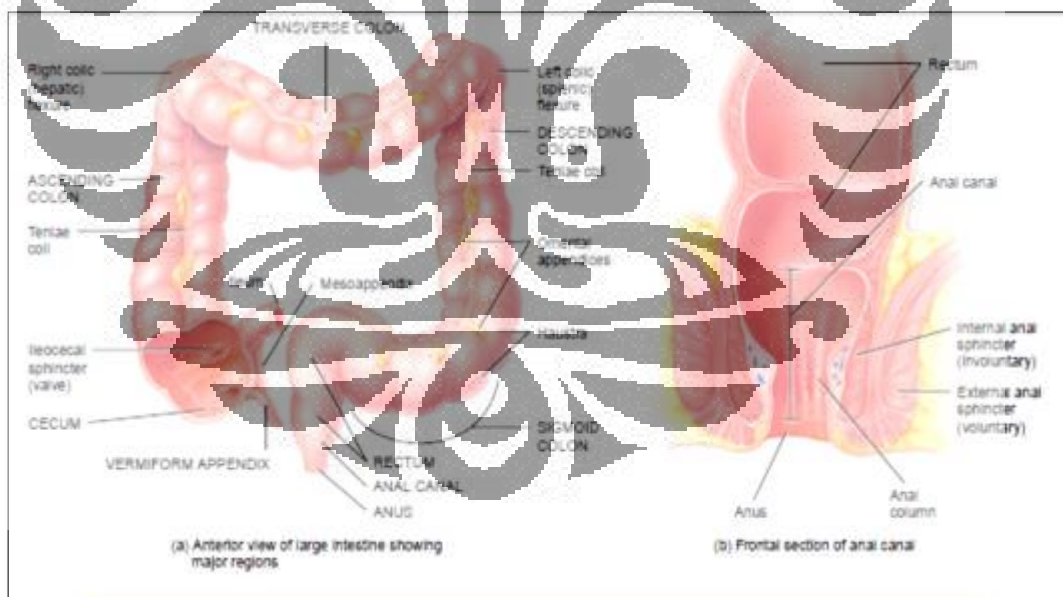
## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Kanker Kolorektal

##### 2.1.1 Anatomi dan Histologi Usus Besar

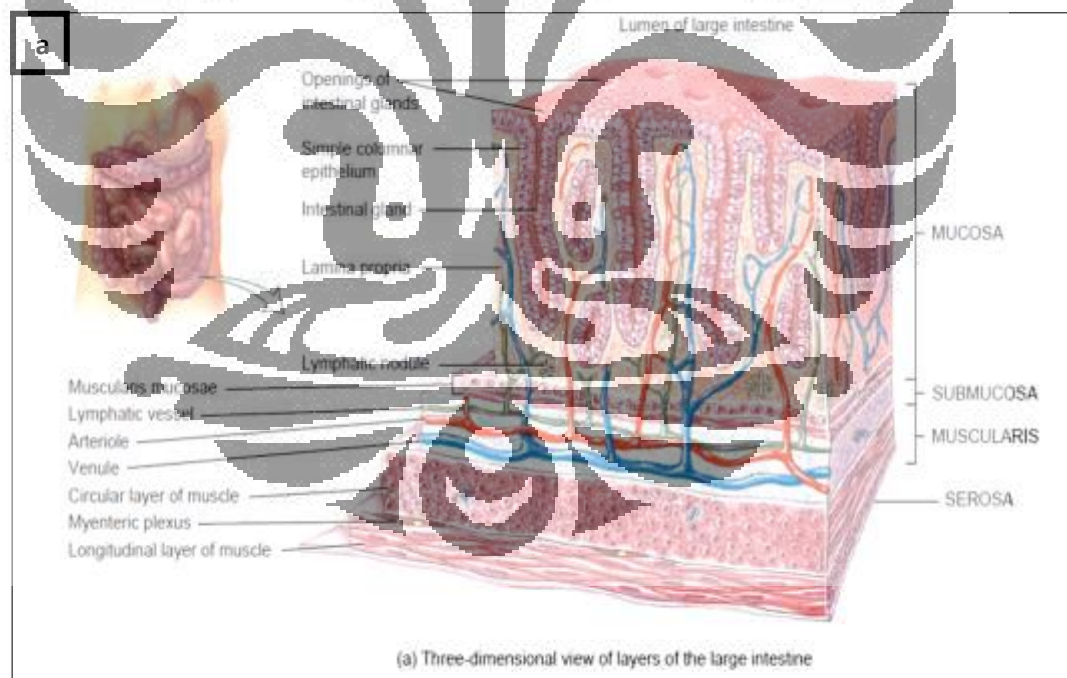
Usus besar memiliki panjang sekitar 1,5 m dan diameter 6,5 cm. Diameternya memanjang dari ileum sampai ke anus. Usus besar melekat pada dinding perut posterior oleh mesokolon, yang merupakan lapisan ganda peritoneum. Secara struktur, empat daerah utama usus besar adalah sekum, kolon, rektum dan anus. Fungsi usus besar adalah melakukan peristaltik untuk memndorong isi usus besar ke dalam anus; bakteri dalam usus besar mengubah protein menjadi asam amino, memecah asam amino, dan menghasilkan beberapa vitamin B dan vitamin K; menyerap air, ion, dan vitamin; membentuk feses; dan pengosongan rektum dengan proses defekasi (Tortora & Derrickson, 2009). Anatomi kolon dan rektum normal dapat dilihat pada Gambar 2.1.

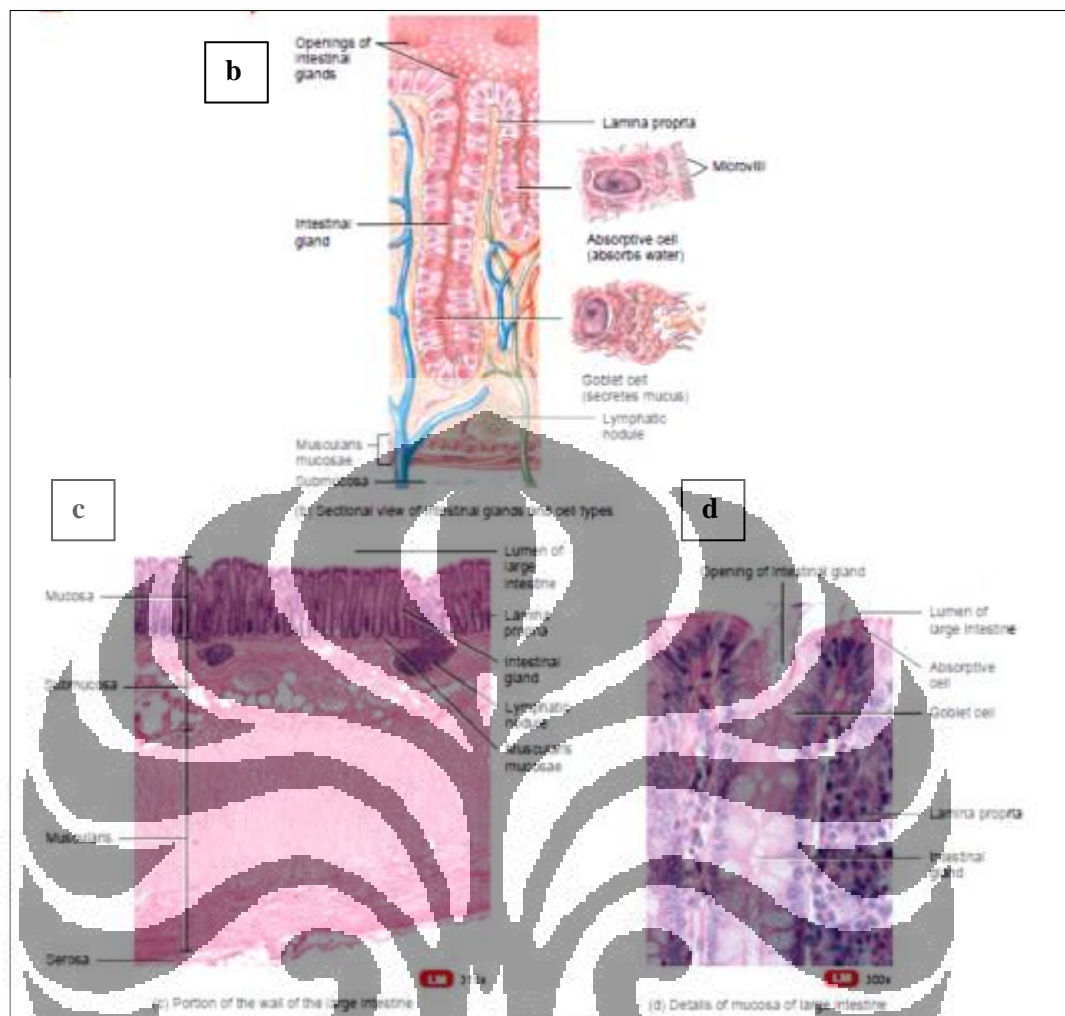


[sumber: Tortora & Derrickson, 2009]

**Gambar 2.1** Anatomi kolon dan rektum normal

Dinding usus besar terdiri dari empat lapisan yaitu: mukosa, submukosa, muskularis, dan serosa. Mukosa terdiri dari epitelium kolumnar sederhana, lamina propria (jaringan ikat areolar), dan muskularis mukosa (otot polos). Epitelium terdiri dari sebagian besar sel absorptif dan sel goblet. Sel absorptif memiliki fungsi utama dalam penyerapan air dan sel goblet mensekresikan mukus yang berfungsi melumasi bagian isi kolon. Sel absorptif dan sel goblet terletak memanjang di kelenjar tubular intestinal (*crypt* / kripta) yang tersebar sepanjang mukosa. Nodul limfatik ditemukan di lamina propria dari mukosa dan dapat tersebar dari mukosa muskularis sampai ke submukosa. Usus besar tidak memiliki vili seperti yang terdapat di usus halus, namun memiliki mikrovili pada sel absorptif. Lapisan submukosa terdiri dari jaringan ikat areolar. Lapisan muskularis terdiri dari lapisan luar longitudinal dan lapisan internal melingkar otot polos. Lapisan serosa usus besar adalah bagian dari viseral peritoneum (Tortora & Derrickson, 2009). Histologi usus besar dapat dilihat pada Gambar 2.2.





[sumber: Tortora & Derrickson, 2009]

Keterangan: **a.** Tampilan tiga dimensi lapisan usus besar **b.** Tampilan kelenjar usus dan tipe sel **c.** Lapisan dinding usus besar **d.** Bagian mukosa usus besar

**Gambar 2.2** Histologi usus besar

### 2.1.2 Pengertian Kanker Kolorektal

American Cancer Society (ACS) menyatakan kanker adalah pertumbuhan sel yang abnormal yang membelah secara tidak terkontrol dan menginvasi jaringan normal di sekitarnya (ACS, 2014). Kanker dinyatakan juga sebagai penyakit akibat kegagalan mekanisme pengaturan multiplikasi pada organisme multiseluler sehingga terjadi perubahan yang tidak terkontrol. Transformasi tersebut disebabkan oleh perubahan gen di dalam sel. Sel yang bertransformasi akan terus menerus berproliferasi dan menekan pertumbuhan sel normal.



Pertumbuhan yang tidak terkendali tersebut diikuti dengan invasi ke jaringan sekitar dan metastase ke bagian tubuh lain (Alfred & Bruce, 1997; Kodner & Robert, 1999; Allen, 1995; Compton, 2005).

Kanker kolorektal adalah pertumbuhan sel abnormal yang terjadi di usus besar dan atau rektum. Kebanyakan kanker kolorektal berkembang perlahan – lahan selama beberapa tahun. Sebelum menjadi kanker, terjadi sebuah pertumbuhan jaringan atau tumor yang disebut sebagai polip non-kanker pada lapisan usus besar atau rektum. Tumor adalah jaringan abnormal dan bisa menjadi benigna ataupun maligna (ACS, 2014).

### 2.1.3 Penyebab

Penyebab kanker kolorektal belum diketahui dengan pasti. Namun kanker kolorektal memiliki beberapa faktor resiko yaitu faktor resiko internal dan eksternal (Triantafyllidis, Nasioulas, Kosmidis, 2009; ACS, 2014).

#### 2.1.3.1 Faktor Internal

Faktor internal dapat berupa mutasi yang diturunkan atau herediter (faktor genetik) seperti *Familial Adenomatous Polyposis* (FAP) serta *Heredity Nonpolyposis Colorectal Cancer* (HNPCC); hormon; kondisi kekebalan tubuh; dan mutasi yang terjadi selama proses metabolisme yang tidak terkait dengan sindrom kanker herediter dan dikenal sebagai kanker kolorektal sporadis. Faktor resiko lainnya adalah riwayat anggota keluarga yang menderita polip, kanker kolorektal, kolitis ulseratif, dan akromegali. Selain itu latar belakang etnis atau ras juga dapat meningkatkan faktor resiko dari kanker kolorektal. Beberapa ras atau etnis seperti orang Amerika, keturunan Afrika, dan bangsa Yahudi memiliki faktor resiko yang lebih tinggi kanker kolorektal bila dibandingkan etnis lainnya. Usia juga menjadi faktor resiko seseorang menderita kanker kolorektal, setelah usia 50 tahun (9 dari 10 orang) terindikasi mengidap kanker kolorektal.

#### 2.1.3.2 Faktor Eksternal

Faktor eksternal yang dapat menyebabkan kanker kolorektal sporadik antara lain adalah gaya hidup tidak sehat, adanya paparan patogen seperti bakteri dan

virus, bahan kimia, dan radiasi. Faktor resiko yang terkait gaya hidup seperti kebiasaan menelan makanan yang tidak dikunyah secara sempurna, tingginya konsumsi daging merah (100 gr /hari), makanan tinggi lemak, konsumsi makanan yang diolah dengan pewarna sintetik dan pengawet, alkohol, dan penggunaan hormon sebagai terapi serta rendahnya asupan kalsium dan folat, konsumsi sayuran dan buah yang mengandung antioksidan dan serat (Arjoso, Sudoyo, Satria, 2008; Beck, Robert, Rombeau, Stamos, Wexner, 2009). Zat besi sebagai pengoksidasi (prooksidan), N-nitroso, hetrosiklik amin, dan *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons* (PAH) sebagai hasil metabolisme daging merah juga dapat menjadi pencetus terjadinya kanker (Beck, Robert, Rombeau, Stamos, Wexner, 2009)

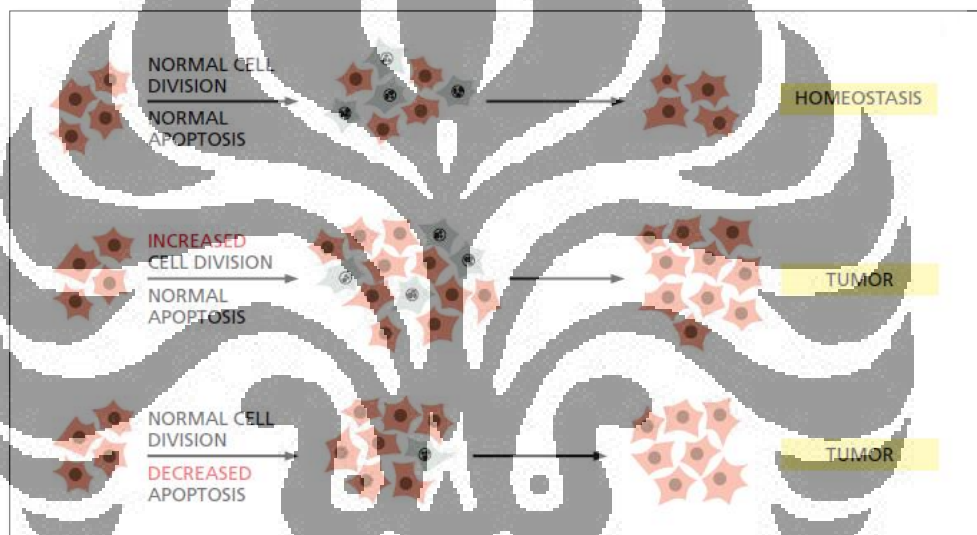
Selain itu, kebiasaan merokok dan meminum alkohol, menderita penyakit diabetes melitus tipe 2, kurangnya olahraga, kelebihan berat badan (obesitas), dan kolesistektomi menjadi faktor resiko menyebabkan kanker (Beck, Robert, Rombeau, Stamos, Wexner, 2009; ACS, 2014).

#### **2.1.4 Tanda dan Gejala**

Tanda dan gejala dari kanker kolorektal yang perlu diwaspadai dan menjadi indikasi kanker kolorektal antara lain perubahan dalam kebiasaan buang air besar seperti diare, sembelit atau defekasi yang berlangsung lebih dari beberapa hari. Adanya perasaan ingin buang air besar, namun tidak kunjung keluar setelah lama di toilet. Terjadinya perdarahan dubur, tinja berwarna gelap, atau adanya darah dalam feses (bloody stool). Selain itu, pada stadium lanjut terkadang ditandai dengan kram atau sakit perut, perut membesar, muntah, mudah lelah dan lesu, turunnya nafsu makan, serta turunnya berat badan (Arjoso, Sudoyo, Satria, 2008; ACS, 2014).

### 2.1.5 Patogenesis

Peningkatan laju mutasi tiap sel dapat meningkatkan probabilitas kanker. Adanya faktor pertumbuhan (*growth factors*) yang distimulasi secara berlebihan akan mengakibatkan jumlah dan laju pembelahan sel meningkat (Markowitz, Bertagnoli, 2009). Pada jaringan dewasa yang normal, sel – selnya dapat berpoliferasi secara terus menerus dan jumlahnya tetap karena jumlah sel yang mati sama dengan sel yang dibentuk. Hal tersebut merupakan mekanisme homeostasis tubuh. Peningkatan laju pembelahan sel dan penurunan laju apoptosis yang memacu perkembangan tumor dapat dilihat pada Gambar 2.3.

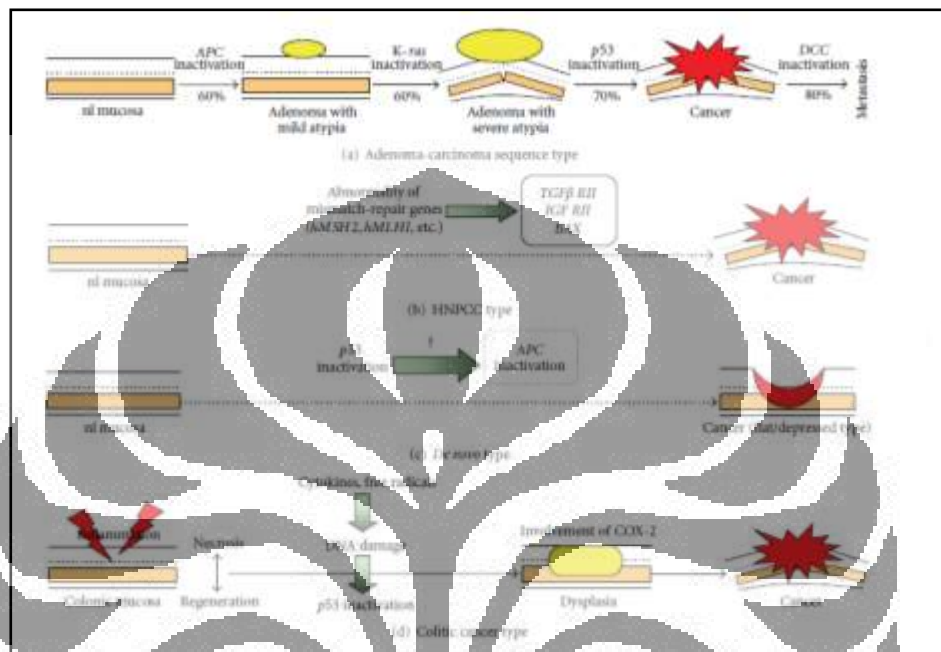


[sumber: Alberts, Johnson, Lewis, Rafi, Roberts, Walter, 2008]

**Gambar 2.3** Peningkatan laju pembelahan sel dan penurunan laju apoptosis yang memacu perkembangan tumor

*Programmed Cell Death (PCD)* atau kematian sel terprogram melalui apoptosis memainkan peranan penting dalam menjaga keseimbangan tersebut, jika jumlah sel yang hidup terlalu banyak maka laju apoptosis akan meningkat untuk membuang sel yang berlebihan jumlahnya. Kemampuan ini hilang pada sebagian besar jenis kanker dan menyebabkan terjadinya pertumbuhan tumor (Alberts, Johnson, Lewis, Rafi, Roberts, Walter, 2008).

Terdapat empat jenis karsinogenesis kolorektal pada manusia antara lain (*adenoma-carcinoma sequence type*, *hereditary nonpolyposis colorectal cancer* (HNPCC), *de novo type*, dan *colitis-associated*) (Tanaka, 2009; Tanaka, 2011). Jenis karsinogenesis kolorektal pada manusia dapat dilihat pada Gambar 2.4.



[sumber: Tanaka, 2011]

Gambar 2.4 Jenis karsinogenesis kolorektal pada manusia

### 2.1.5.1 Adenoma-carcinoma sequence

*Adenoma-carcinoma sequence* merupakan proses multistep yang kompleks, dimana terjadi akumulasi perubahan gen yang mengontrol pertumbuhan sel dan diferensiasinya, berdampak pada perubahan neoplastik fenotif. Model ini mengasumsikan bahwa gen *adenomatous polyposis coli* (APC) mengalami mutasi pada tahap awal proses karsinogenesis. Gen APC teridentifikasi sebagai gen penyebab *familial adenomatous polyposis* (FAP) dan terlibat dalam regulasi  $\beta$ -catenin, penyusun sitoskeleton, apoptosis, pengatur siklus sel dan adhesi sel. Mutasi APC terjadi hingga 80% pada adenoma dan adenokarsinoma serta 4,3% dari *aberrant crypt foci* (ACF) (Tanaka, 2009).

APC protein diterjemahkan dari gen APC yang merupakan faktor utama dalam sinyal jalur Wnt dan APC dalam pengaturan proliferasi sel melalui

pengikatan dan degradasi protein  $\beta$ -catenin yang berperan mempromosikan proliferasi sel. Namun, mutasi protein APC tidak bisa mengikat dan mendegradasi protein  $\beta$ -catenin sehingga, protein  $\beta$ -catenin mengalami translokasi ke nukleus dan berikatan dengan *T-cell factor* / faktor peningkat transkripsi limfosit, dengan targetnya *c-myc*, *cyclin D1* dan *c-jun* gen dan mempromosikan proliferasi sel (Tanaka, 2009).

Gen K-ras merupakan salah satu onkogen dan diasumsikan mengalami mutasi setelah gen APC dalam CRC. *Ras-guanosin 5'-trifosfat* (GTP) berikatan dengan sitoplasma Raf-1 dan mengalami translokasi ke membran plasma dimana Raf-1 menjadi aktif dengan mekanisme kurang diketahui. Sinyal ditransmisikan ke *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) / pengatur sinyal ekstraseluler kinase dan pengatur downstream sinyal ekstraseluler kinase oleh aktivasi dan promosi proliferasi dan diferensiasi sel. Aktivasi mutasi pada gen K-ras telah diidentifikasi dalam berbagai macam karsinogenesis manusia. Bentuk mutasi ini diketahui untuk merangsang proliferasi, transformasi dan diferensiasi sel. Mutasi gen Ras terjadi pada 58% adenoma yang besarnya lebih dari 1 cm dan di 47% dari karsinoma. Namun, mutasi K-ras ditemukan di 9% adenoma yang besarnya kurang dari 1 cm. Selain itu, berkat identifikasi titik mutasi yang sama di pasien adenoma dan adenokarsinoma, diperkirakan bahwa mutasi gen K-ras terjadi selama tahap awal karsinogenesis dan terkait dalam peningkatan ukuran tumor (Tanaka, 2009)

Lebih dari 90% dari CRC primer diikuti dengan hilangnya LOH kromosom 18q, menunjukkan delesi di karsinoma kolorektal (DCC), gen masuk dalam wilayah kehilangan alelnya. Beberapa studi, telah mengaitkan kromosom 18q LOH di CRC untuk reduksi ekspresi DCC pada tingkat RNA dan tingkat protein, meskipun beberapa penelitian telah gagal untuk menemukan bukti untuk reduksi transkrip DCC dan / atau tingkat protein dalam CRC. Oleh karena itu, sedikit temuan dalam menentukan apakah DCC hilang / inaktivasi merupakan faktor penting dalam karsinogenesis atau hanya epiphenomenon. Namun, studi terbaru melaporkan bahwa DCC difungsikan sebagai bagian dari kompleks reseptor untuk netrin-1. Selanjutnya, di berbagai *cell line*, DCC pada ntrin-1 berikatan dan mengaktifkan jalur ERK dan dalam ketiadaan dari netrin-1,

**Universitas Indonesia**

menginduksi apoptosis melalui caspase-9. Kehadiran netrin-1 blok DCC menginduksi apoptosis. Mutasi DCC membuat sel immortal yang disebabkan oleh transmisi terus menerus dari sinyal kehidupan dalam ketiadaan netrin-1 (Tanaka, 2009).

Hal paling penting dalam menentukan batas antara adenoma dan adenocarcinoma adalah mutasi gen p53. Gen p53 adalah gen supresor tumor yang spesifik dan mutasinya telah terdeteksi di berbagai kanker, mutasi p53 atau LOH ada pada sekitar 75% dari CRC. Di sisi lain, mutasi ini adalah titik konversi dari adenoma ke adenocarcinoma karena jarang terdeteksi pada adenoma. Stress intrinsik dan ekstrinsik sel berdampak pada jalur p53. Protein p53 bertindak sebagai sensor stres seluler dan peningkatan kadar p53 menyebabkan fase G1 *arrest* dari siklus sel, penuaan seluler atau apoptosis dengan induksi berbagai gen target. G1 *arrest* merupakan mekanisme checkpoint, dimana sel-sel yang mengalami kerusakan DNA, ditahan di fase G1 untuk dilakukan perbaikan DNA sebelum siklus sel berlanjut. Mekanisme ini membatasi penyebaran mutasi berpotensi onkogenik. Adanya p53 pada jalur apoptosis juga disebabkan oleh kerusakan DNA pada jenis sel tertentu, yang mengalami proliferasi sel berlebihan (Tanaka, 2009).

Pemeran utama dari p53 pada induksi sel siklus *arrest* adalah p21, perkembangan yang tertahan (*growth arrest*) dan kerusakan DNA yang diinduksi gen 45 (GADD45). Gen p21 secara luas diterima sebagai *cyclin-dependent* inhibitor kinase yang dapat mempengaruhi perkembangan siklus sel dari G1 ke fase S dengan mengontrol aktivitas CDK. Di sisi lain, GADD45 menghambat perkembangan sel dari G0 ke fase S dan memainkan peran penting dalam pemeliharaan stabilitas kromosom. Pemeran utama lain dari p53 menginduksi apoptosis adalah pro-apoptotic Bcl-2 protein Bax. BH-3 hanya protein Noxa dan p53 pengatur modulator apoptosis. Protein ini memiliki kemampuan menginduksi mitokondria sitokrom c untuk lepas. Dengan demikian, transaktivasi dari promotornya melalui p53 mungkin menyebabkan aktivasi caspase. Oleh karena itu, hilangnya fungsi p53 sebagai faktor transkripsi berefek transformasi sel menjadi maligna (Tanaka, 2009).

### 2.1.5.2 Jalur HNPCC (*Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*)

Hubungan antara penyimpangan stabilitas gen dan CRC ini diungkapkan oleh HNPCC, juga disebut sindrom Lynch. Ketidakstabilan pengulangan tandem pendek, atau mikrosatelit (MSI), adalah karakteristik tumor dari penderitanya. Dalam kebanyakan CRC HNPCC, MSI telah terbukti sebagai hasil mutasi dalam perbaikan mismatch DNA, *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2* dan *hMSH6* gen. Kebanyakan urutan mikrosatelit dalam genom berada dalam *non-coding* atau urutan intronik dan mutasi di intron ini diyakini bersifat *silence* dan tidak berurutan. Namun, gen mungkin berisi MSI dalam area kodingnya. Beberapa gen telah diidentifikasi, termasuk reseptor untuk faktor pertumbuhan, seperti *transforming growth factor- $\beta$  reseptor II*, *reseptor insulin-like growth factor-II*, regulator untuk siklus sel, dan regulator dari apoptosis. Transformasi ke arah keganasan (*maligna*) terjadi ketika gen target tersebut bermutasi (Tanaka, 2009).

### 2.1.5.3 Jalur *de-novo*

Bentuk klasik dari CRC ditandai dengan perkembangan dari polip adenomatosa berurutan menjadi adenoma-karsinoma, dengan akumulasi progresif perubahan genetik. Pada 1980-an, beberapa peneliti Jepang mulai melaporkan adanya karsinoma berbentuk flat / datar dengan diameter kurang dari 10 mm yang dikenal dengan *de novo*, cenderung mencapai lapisan yang lebih dalam pada tahap awal dari polypoid jenis karsinoma adenoma. Karsinoma flat menunjukkan mutasi lebih sedikit dari APC dan K-ras gen daripada polypoid jenis karsinoma, walaupun mutasi gen p53 terlihat pada tingkat yang sama seperti pada polypoid-jenis karsinoma. Namun, inaktivasi epigenetik faktor Ras terkait (RASSF) 1A oleh hipermetilasi daerah promotor sering terdeteksi dalam karsinoma flat. RASSF1A mengatur jalur pro-apoptotik melalui heterodimerisasi dengan Ras efektor NORE1 dan berinteraksi dengan pro-apoptotik protein kinase MST1, yang memediasi efek apoptosis Ras. Oleh karena, inaktivasi RASSF1A menyebabkan penyimpangan dalam jalur ras-sinyal tanpa melibatkan K-ras mutasi gen. Ada hubungan terbalik yang signifikan antara RASSF1A hipermetilisasi dan mutasi K-

ras. Hasil ini menunjukkan bahwa RASSF1A memainkan peran penting dengan p53 di jalur karsinogenesis *de novo* (Tanaka, 2009).

#### 2.1.5.4. Jalur Colitis Cancer

*Ulcerative colitis* (UC) dan *Crohn Disease* (CD) pada *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) tidak diketahui etiologinya. Pada tahun 1925, Crohn dan Rosenberg melaporkan kasus pertama CRC terkait IBD. Sejak itu, diakui bahwa CRC angka kejadiannya tinggi pada pasien UC dengan kolitis ekstensif yang durasinya lebih dari 8-10 tahun. Selain itu, flat displasia dianggap lesi pra-kanker yang terjadi pada mukosa kolon pasien IBD. Oleh karena itu, IBD terkait dengan CRC diyakini perkembangan terjadi dari tidak displasia ke indefinite displasia ke displasia tingkat rendah ke displasia tingkat tinggi ke karsinoma. Beberapa inflamasi terkait gen, ditranskripsikan oleh faktor transkripsi umum, *nuclear factor-kB* (NF-kB), seperti *cyclooxygenase* (COX)-2, *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), *interferon- $\gamma$* , *tumor necrosis factor- $\alpha$*  dan *interleukin-1 $\beta$* , yang meningkat pada mukosa yang radang dan tetap tinggi pada neoplasma kolon. NF-kB adalah pusat pengatur aktivasi transkripsi dari sejumlah gen yang terlibat dalam adhesi sel, respon imun dan pro-inflamasi, apoptosis, diferensiasi dan pertumbuhan. Induksi gen tersebut dalam sel epitel usus dengan pengaktifan NF-kB sangat berpengaruh terhadap peradangan mukosa dan perbaikannya. Namun, aktivasi kronis NF-kB menginduksi promosi pergantian sel epitel dan *reactive oxygen and nitrogen species* (RONS) Diperkirakan bahwa tingginya pergantian sel epitel dan kerusakan DNA disebabkan oleh munculnya RONS yang mendorong proses karsinogenesis (Tanaka, 2009).

## 2.2 Karsinogenesis Kolorektal

Karsinogenesis adalah proses pembentukan sel normal menjadi kanker (Tjarta, 1973). Karsinogenesis merupakan proses yang kompleks dan bertingkat, yang diawali dari terbentuknya suatu populasi sel yang abnormal, kemudian berlanjut menjadi serangkaian mutasi dan perubahan pola ekspresi gen. Proses ini terjadi akibat pengaruh berbagai faktor (multifaktor) yang menyerang tubuh secara bertahap (multistage). Proses perubahan dari sel normal menjadi kanker



memerlukan waktu cukup lama. Bahan-bahan yang dapat menyebabkan sel kanker disebut karsinogen. Karsinogenesis dapat diinisiasi oleh karsinogen kimia (zat-zat kimia lingkungan, makanan yang terkontaminasi mikotoksin), agen fisika (radiasi sinar UV, sinar X dan lain-lain), agen biologis seperti Epstein Barr virus, human papilloma virus, yang dapat menyebabkan kerusakan DNA hingga terjadi mutasi (Oliveira, Colaço, Chaves, Pinto, Cruz, Lopes, 2007). Proses karsinogenesis adalah suatu proses bertahap terjadinya kanker, yang terdiri atas tiga tahap yaitu inisiasi, promosi, dan progresi (Markowitz, Bertagnolli, 2009; Atmakusuma, 2010).

Inisiasi adalah tahap permulaan dimana sel normal berubah menjadi premaligna. Karsinogen harus merupakan mutagen, yaitu suatu zat yang dapat menimbulkan mutasi gen. Pada tahap inisiasi, karsinogen bereaksi dengan DNA, kemudian menyebabkan amplifikasi gen dan produksi kopi multipel gen. Pada proses inisiasi ini, karsinogen yang merupakan inisiator adalah mutagen. Proses ini permanen dan ireversibel, dan proses tidak mengubah ekspresi gen (Markowitz, Bertagnolli, 2009).

Promosi kanker yang merupakan perkembangan awal sel yang terinisiasi membentuk klon melalui pembelahan; berinteraksi melalui komunikasi sel ke sel; stimulasi mitogenik, faktor diferensiasi sel, dan proses mutasi dan non mutasi (epigenetik) yang semuanya mungkin berperan dalam tahap awal pertumbuhan pra-neoplastik. Pada tahap ini sel mengalami sejumlah perubahan tambahan dalam genom yang berpotensi mengakselerasi ketidakstabilan genom sel. Promosi membutuhkan waktu beberapa tahun (Markowitz, Bertagnolli, 2009).

Tahap promosi berlangsung lama bisa lebih dari sepuluh tahun. Suatu proses panjang yang disebabkan oleh kerusakan yang melekat dalam materi genetik di dalam sel. Melalui mekanisme epigenetik akan terjadi ekspansi sel-sel rusak membentuk premalignansi dari populasi multiseluler tumor yang melakukan proliferasi. Senyawa-senyawa yang merangsang pembelahan sel disebut promotor atau epigenetik karsinogen (Markowitz, Bertagnolli, 2009).

Tahap progresi diawali dari transformasi malignansi yang menggambarkan perubahan genomik yang cepat dimana populasi klonal sel yang berevolusi akan

mengarah pada perkembangan malignansi/keganasan jika tidak dihambat oleh lingkungan mikro dalam sel. Progresi malignansi sebagai fase karsinogenik dengan perbanyakkan sel yang telah mengalami transformasi yang relatif tertunda sampai mengalami peningkatan keganasan dan mampu untuk bermigrasi ke jaringan normal di sekitarnya dan yang lebih jauh (metastasis). Kanker yang dapat dideteksi secara klinis membutuhkan waktu beberapa tahun bergantung pada perkembangan vaskularisasi kanker, proses inflamasi dan interaksi dengan lingkungan mikro dan komunitas seluler di sekitar sel transforman berada. Progresi adalah tahap karsinogenesis yang paling dekat dengan data klinis (Markowitz, Bertagnoli, 2009).

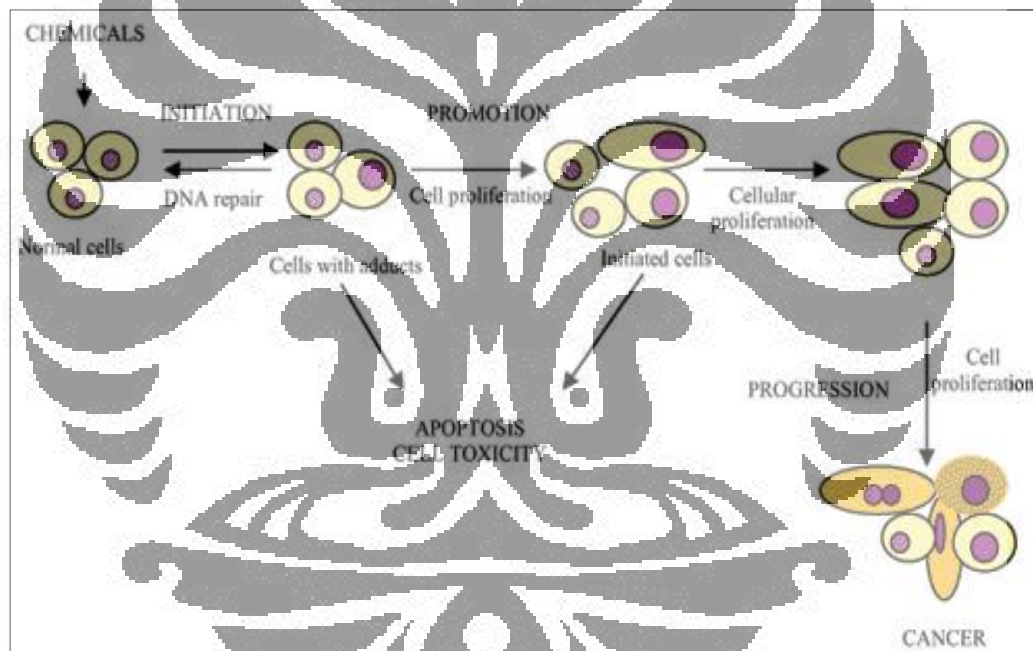
Pada tahap progresi terjadi instabilitas genetik yang menyebabkan perubahan-perubahan mutagenik dan epigenetik. Proses ini akan menghasilkan klon baru sel-sel tumor yang memiliki aktivitas proliferasi, bersifat invasif (menyerang) dan potensi metastatiknya meningkat. Selama tahapan ini, sel-sel maligna berkembang biak menyerbu jaringan sekitar, menyebar ke tempat lain. Jika tidak ada yang menghalangi pertumbuhannya, akan terbentuk dalam jumlah yang cukup besar untuk mempengaruhi fungsi tubuh, dan gejala-gejala kanker muncul. Tahap terakhir ini berlangsung selama lebih dari satu tahun, sehingga seluruh karsinogenesis dapat berlangsung selama dua puluh tahun (Markowitz, Bertagnoli, 2009).

Karsinogen genotoksik menginduksi pembentukan tumor melalui kerusakan pada DNA. Karsinogen ini akan mengalami metabolisme di jaringan target menjadi suatu metabolit yang reaktif, yang akan mempengaruhi DNA melalui reaksi kovalen, membentuk *DNA adduct*. Karsinogen genotoksik juga dapat menimbulkan kerusakan DNA secara tidak langsung, melalui pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) yang dapat mengoksidasi DNA atau membentuk produk peroksidasi lipid yang akan bereaksi dengan DNA (Oliveira, Colaço, Chaves, Pinto, Cruz, Lopes, 2007; Byrns, Peening, 2011).

Bila kerusakan DNA akibat karsinogen genotoksik tidak mengalami perbaikan maka hasil metabolit dari bahan karsinogenik ini akan mengadakan ikatan dengan rantai DNA, sehingga DNA menjadi defek. Sebagai akibat dari

adanya defek DNA, tubuh berusaha untuk melakukan perbaikan DNA yang dikenal dengan DNA *repair*. Bila perbaikan DNA ini tidak berhasil, sel yang bersangkutan (sel yang memiliki DNA abnormal) tersebut akan dieksekusi atau dimusnahkan (Oliveira, Colaço, Chaves, Pinto, Cruz, Lopes, 2007).

Apabila proses eksekusi ini tidak mampu dilakukan oleh tubuh, maka sel tersebut memiliki DNA cacat yang bersifat permanen. Kondisi ini dikenal dengan fase inisiasi. Selanjutnya, sel yang memiliki DNA cacat tersebut akan mengalami proliferasi dan diferensiasi, serta berkembang menjadi malignan (ganas) yang dikenal dengan fase promosi (Oliveira, Colaço, Chaves, Pinto, Cruz, Lopes, 2007). Mekanisme karsinogenesis dapat dilihat pada Gambar 2.5.



[sumber: Oliveira, Colaço, Chaves, Pinto, Cruz, Lopes, 2007]

Keterangan: Karsinogen kimia mempengaruhi sel normal, menyebabkan mutasi genetik, sel akan berproliferasi berkembang menjadi sel kanker melalui tahap promosi dan

**Gambar 2.5** Mekanisme karsinogenesis

Epigenetik adalah perubahan status fenotip yang tidak didasarkan pada perubahan genotip, dalam arti bahwa ada perubahan ekspresi gen yang tidak disebabkan oleh perubahan sekuen DNA. Berbeda dengan mutasi DNA, yang

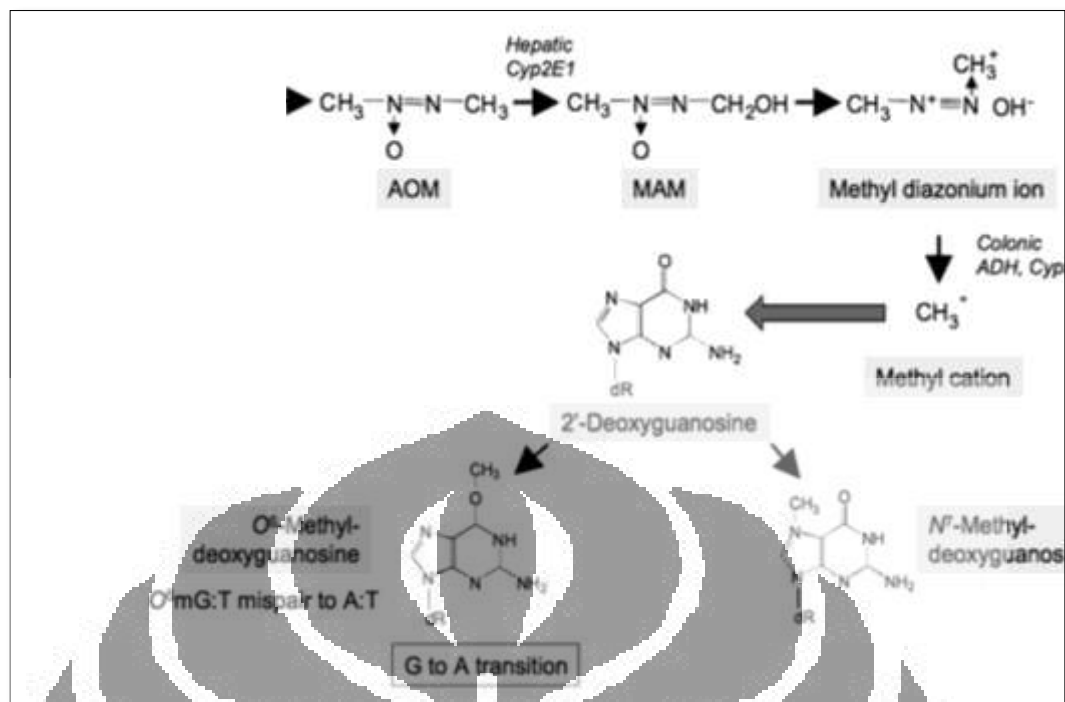
berakibat perubahan sekuen DNA dan perubahan ekspresi gen yang ireversibel, gangguan epigenetik adalah potensial reversibel, tetapi tetap stabil selama pembelahan sel sehingga perubahan epigenetik ini diwariskan kepada sel anak saat pembelahan sel (Kresno, 2010).

Karsinogen kimia yang banyak digunakan untuk menginduksi lesi pada usus besar yang mirip dengan keganasan pada manusia adalah 1) amina aromatik heterosiklik: 2-amino-3-metilimidazo [4,5] kuinolin (IQ) dan 2-amino-6-fenilimidazol [4,5] piridin (PhIP); 2) amina aromatik: 3,2'-dimetil-4-aminobifenil (DMBA); 3) senyawa alkilnitrosamida: metilnitrosourea (MNU) dan N-metil-n-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG); 4) dimetilhidrazin: 1,2-dimetilhidrazin (DMH) dan metabolitnya, azoksimetan (AOM) (Rosenberg, Giardina, Tanaka, 2009).

### 2.3 Model Karsinogenesis Kolorektal dengan Induksi Azoksimetan (AOM) dan Dextran Sodium Sulfate (DSS)

AOM merupakan karsinogen kimia yang telah banyak dipakai dalam penelitian mekanisme kanker kolorektal sporadis pada manusia. AOM diketahui merupakan karsinogen yang sangat poten dalam menyebabkan kanker kolorektal pada tikus/mencit. Perkembangan kanker kolorektal yang dihasilkan menyerupai pola yang terjadi pada manusia. Pemberian AOM menyebabkan sel-sel epitel mengalami perubahan dari lesi kecil *aberrant crypt foci* (ACF) menjadi adenoma dan *adenocarcinoma* (Rosenberg, Giardina, Tanaka, 2009; Chen, Huang, 2009; Robertis, Massi, Poeta, Carroti, Sergio, Cecchetelli, et al., 2011).

AOM tidak berinteraksi langsung dengan DNA, tetapi harus diaktivasi terlebih dahulu oleh enzim CYP2E1. Gugus metil pada AOM akan dihidroksilasi menjadi metilazoksimetanol (MAM), yang kemudian akan menjadi senyawa pengalkilasi yang sangat reaktif ion metildiazonium. Metildiazonium akan mengalkilasi guanin DNA menjadi O<sup>6</sup>-MEG dan O<sup>4</sup> metiltimin. Hasil alkilasi guanin DNA dapat mengawali terjadinya tumorigenesis melalui beberapa gen penting dalam jalur sinyal intraseluler (Rosenberg, Giardina, Tanaka, 2009; Chen, Huang, 2009). Metabolisme azoksimetan dapat dilihat pada Gambar 2.6.



[sumber: Rosenberg, Giardina, Tanaka, 2009]

Keterangan : AOM dimetabolisme di hati oleh enzim CYP2E1, menjadi MAM, MAM akan diuraikan menjadi ion metildiazonium yang akan memetilasi 2-deoksiguanosin DNA menjadi  $\text{O}^6$ mG dan  $\text{N}^7$ metil deoksiguanosin.

**Gambar 2.6** Metabolisme azoksimetan

Adanya mutasi DNA menyebabkan: 1) jalur K-ras teraktivasi dan sinyal *downstream* jalur PI3K/Akt dan MAPK juga ikut teraktivasi, 2) mutasi  $\beta$ -catenin, dapat mencegah degradasi  $\beta$ -catenin oleh GSK-3 sehingga terjadi akumulasi  $\beta$ -catenin yang menyebabkan proliferasi sel, 3) terjadinya hambatan terhadap TGF $\beta$ , suatu protein pro-apoptosis (Rosenberg, Giardina, Tanaka, 2009).

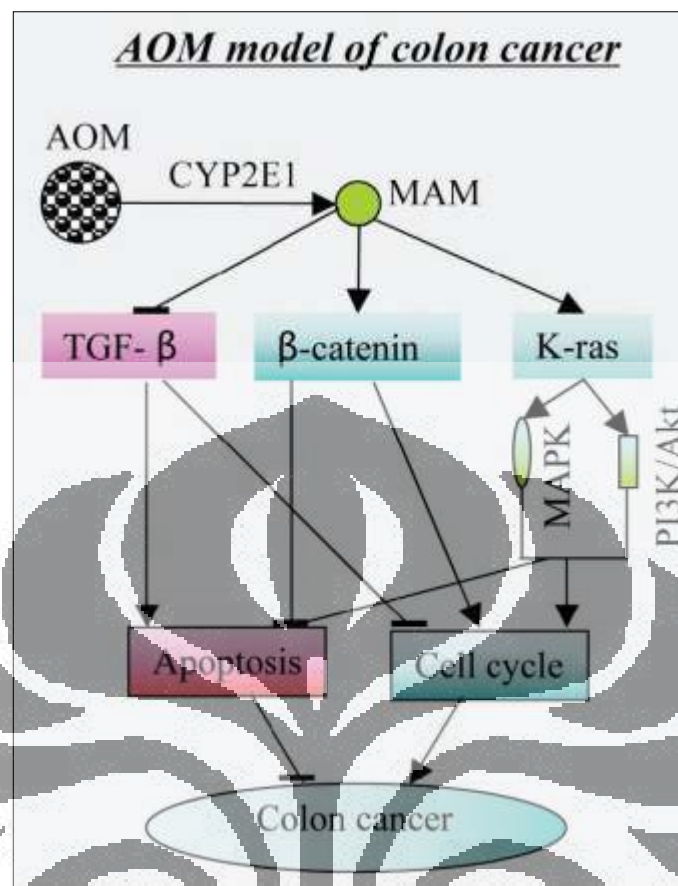
Jalur K-ras berperan penting dalam karsinogenesis kanker kolorektal. Metabolit AOM, MAM menyebabkan mutasi transverse pada gen *K-ras* dari G:C ke A:T pada kodon 12 yang berasal dari *O*<sup>6</sup>-methyl-deoxyguanine adducts. Mutasi tersebut menyebabkan gen K-ras teraktivasi. K-ras adalah suatu *G-protein* yang mengatur jalur sinyal intraseluler *MAPK* dan *PI3K/Akt*, sehingga pada gilirannya akan mengatur pertumbuhan sel, proliferasi dan metabolisme glukosa. Kedua jalur intraseluler tersebut berperan penting dalam karsinogenesis beberapa jenis kanker termasuk kanker kolorektal (Rosenberg, Giardina, Tanaka, 2009; Chen, Huang, 2009).

*β-catenin* memegang juga peranan penting dalam adhesi sel, yang juga merupakan protein onkogenik. *β-catenin* terkait dengan *cadherin* atau suatu *catenin* untuk menghubungkan sitoskeleton aktin, ia juga merupakan gen aktivator transkripsional dalam jalur sinyal Wnt. Dalam bentuk bebas *β-catenin* berasosiasi dengan *scaffolding protein*, aksin dan *Apc*, difosforilasi oleh *GSK-3β* (*Glycogen synthase kinase 3-beta*), kemudian akan didegradasi oleh proteasom (Rosenberg, Giardina, Tanaka, 2009; Chen, Huang, 2009).

Bila terjadi mutasi pada *β-catenin*, *β-catenin* tidak dapat membentuk kompleks dan tidak mengalami degradasi. Akibatnya kadar *β-catenin* bebas meningkat dan akan berikatan *T-cell Factor (TCF)/Lymphoid enhancer factor (LEF)* membentuk kompleks yang akan mengaktifkan gen transkripsi dan proliferasi sel. AOM menyebabkan mutasi *β-catenin* pada kodon 33 dan 41 yaitu residu serin dan treonin yang merupakan target fosforilasi *GSK-3β* (Rosenberg, Giardina, Tanaka, 2009; Chen, Huang, 2009).

Jalur *transforming growth factor (TGF-β)*. *TGF-β* yang meliputi isoform 1,2 dan 3 dapat menghambat pertumbuhan sel, proliferasi dan progresivitas siklus sel dengan demikian mempunyai efek anti-tumor. *TGF-β* juga merupakan protein apoptosis. Defek sinyal *TGF-β* dijumpai dalam 20-30% pasien kanker kolorektal. Aktivitas jalur *TGF-β* menurun setelah pemberian AOM, yang memediasi AOM untuk menginduksi terjadinya kanker kolorektal (Rosenberg, Giardina, Tanaka, 2009; Chen, Huang, 2009).

AOM dimetabolisme menjadi MAM yang akan menyebabkan mutasi DNA. Mutasi pada *TGFβ*, menyebabkan inaktivasi *TGFβ*, sementara mutasi pada *β-catenin*, dapat mencegah degradasi *β-catenin* oleh *GSK-3β*, sedangkan gen *Ras* akan diaktifkan sehingga menurunkan terjadinya apoptosis, meningkatkan cell cycle yang menyebabkan terjadinya kanker kolon (Chen & Huang, 2009). Jalur sinyal azoksimetan dapat dilihat pada Gambar 2.7.



[sumber: Chen & Huang, 2009]

**Gambar 2.7** Jalur sinyal azoksimetan.

DSS adalah senyawa polisakarida sulfat yang banyak digunakan untuk menginduksi terjadinya peradangan pada model eksperimental kanker kolorektal terkait inflamasi (Yan, Kolachala, Dalmaso, Nguyen, Laroui, 2012). Model ini sederhana, reproduksibel dan mampu menghasilkan lesi yang menyerupai karakteristik fitur histologi kolitis pada manusia (Tanaka, 2011; Yan, Kolachala, Dalmaso, Nguyen, Laroui, 2012). Fitur khas kolitis muncul pada hari ke-3 dan maksimum terjadi pada hari ke tujuh (Yan, Kolachala, Dalmaso, Nguyen, Laroui, 2012).

Induksi kolitis pada mencit dengan menggunakan dekstran sodium sulfat (DSS) merupakan model yang paling umum digunakan karena caranya mudah, onset, durasi, dan tingkat keparahan peradangan segera dan dapat dikendalikan. Induksi kolitis dilakukan dengan cara memberikan DSS dalam air minum mencit

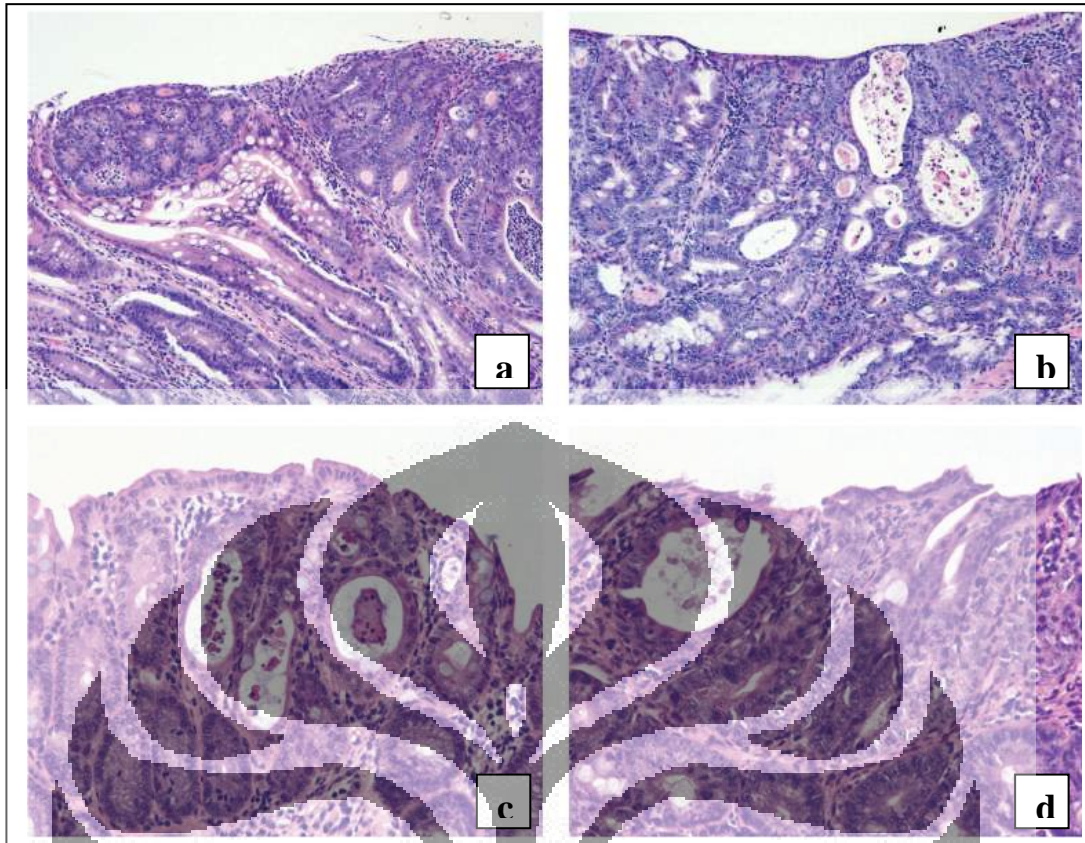
*ad libitum*. Mencit akan mengalami kolitis akut, kronis atau kolitis yang dapat menginduksi terjadinya lesi displastik, tergantung pada konsentrasi, durasi dan frekuensi pemberian DSS (Tanaka, 2011; Yan, Kolachala, Dalmaso, Nguyen, Laroui, 2012; Per̃se, Cerar, 2012).

DSS tahan terhadap degradasi oleh mikroflora usus dan stabil pada kondisi pH yang berbeda (4,0-7,5). DSS menyebabkan kerusakan fungsi sawar mukosa epitel, yang memungkinkan masuknya antigen dan mikroorganisme luminal ke dalam mukosa, yang mengakibatkan terjadinya respon inflamasi yang berat (Per̃se, Cerar, 2012).

AOM telah digunakan secara rutin untuk menginduksi tumor usus besar pada mencit. Pada pemberian AOM berulang secara intraperitoneal, berkembang menjadi tumor spontan dalam waktu 30 minggu. Sedangkan pada pemberian AOM dan DSS menyebabkan pertumbuhan tumor kolorektal pada mencit terjadi dalam waktu 10 minggu (Chen, Huang, 2009).

Tanaka, Konho, Suzuki, Yamada, Sugie dan Mori (2003) memaparkan bahwa dengan pemberian DSS dalam air minum dengan dosis 2% selama seminggu setelah satu kali injeksi AOM (10 mg /kgBB) dapat menghasilkan sejumlah neoplasma kolon dengan mutasi  $\beta$ -catenin pada tikus jantan ICR dalam 20 minggu. Penelitian lain menunjukkan bahwa pemakaian AOM dan DSS sebanyak 1% atau lebih sudah cukup memberikan efek yang kuat terhadap promosi tumor di mencit atau tikus dalam 14 minggu (Suzuki, Konho, Sugie, Tanaka, 2005). Hispatologi lesi kolon tikus yang diberi AOM dan DSS (2%) dapat dilihat pada Gambar 2.8.



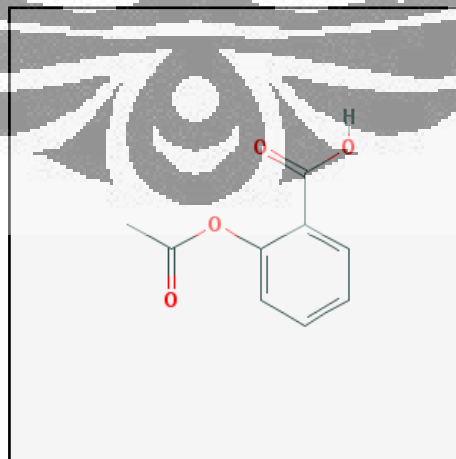


[sumber: Suzuki, Konho, Sugie, Tanaka, 2005]

Keterangan: **a.**Dua adenoma tubular terlihat. **b.**Histologi diferensiasi adenocarcinoma tubular. **c.**High grade dysplasia dengan sedikit nuclear atypia. **d.**High grade dysplasia ditandai dengan nuclear atypia. (pewarnaan HE)

**Gambar 2.8** Histopatologi lesi kolon tikus yang diberi AOM dan DSS (2%).

#### 2.4. Aspirin (asetosal, *acidum acetylsalicylicum*)

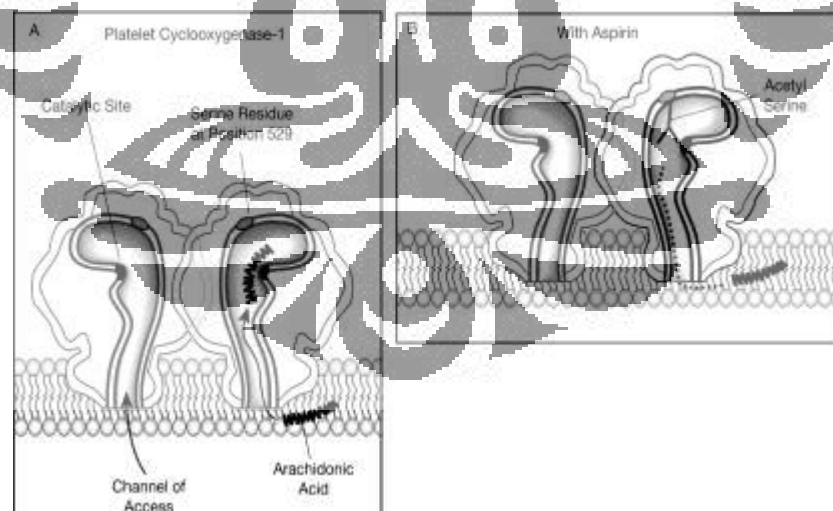


[sumber: NCBI, 2016]

**Gambar 2.9** Struktur Asetosal

Farmakokinetik: Asetosal dengan cepat diserap dalam lambung dan usus halus bagian atas, dalam keadaan utuh dapat melintasi membran gastrointestinal dengan cara difusi pasif. Asetosal dapat mengalami hidrolisis oleh enzim esterase didalam saluran cerna. Bioavailabilitas bentuk sediaan tablet reguler 40-50%. Kadar puncaknya dalam plasma dicapai 30 sampai 40 menit. Waktu paruh asetosal didalam plasma 15-20 menit. Biotrasformasi asetosal terjadi dibanyak jaringan, terutama di mikrosom dan mitokondria hati dan diekskresi dalam bentuk metabolitnya terutama melalui ginjal, sebagian kecil melalui keringat dan empedu (Patrono, Rodriguez, Landolfi, Baigent, 2005)

Mekanisme kerja asetosal (lihat Gambar 2.10), dengan cara inaktivasi enzim siklooksigenase secara permanen. Asetosal akan berdifusi melalui membran sel, masuk kedalam situs aktif enzim COX, akan berikatan dengan residu arginin 120. Kemudian asetosal akan mengasetilasi residu serin (serin 529 dalam human COX-1 dan serin 516 dalam human COX-2) untuk mencegah enzim COX berikatan dengan asam arachidonat. Asetosal dapat menghambat COX-2 dengan kadar asetosal yang lebih tinggi daripada untuk menghambat COX-1 (Patrono, Rodriguez, Landolfi, Baigent, 2005).



Sumber : [Patrono, Rodriguez, Landolfi, Baigent, 2005]

Keterangan: A. Asam arakidonat masuk kedalam saluran hidrofobik dan berikatan dengan sisi katalitik enzim siklooksigenase. B. Aspirin menghambat akses asam arakidonat ke situs katalitik dengan cara mengasetilasi secara ireversibel residu serin enzim siklooksigenase pada posisi 529, sehingga tidak terbentuk prostaglandin.

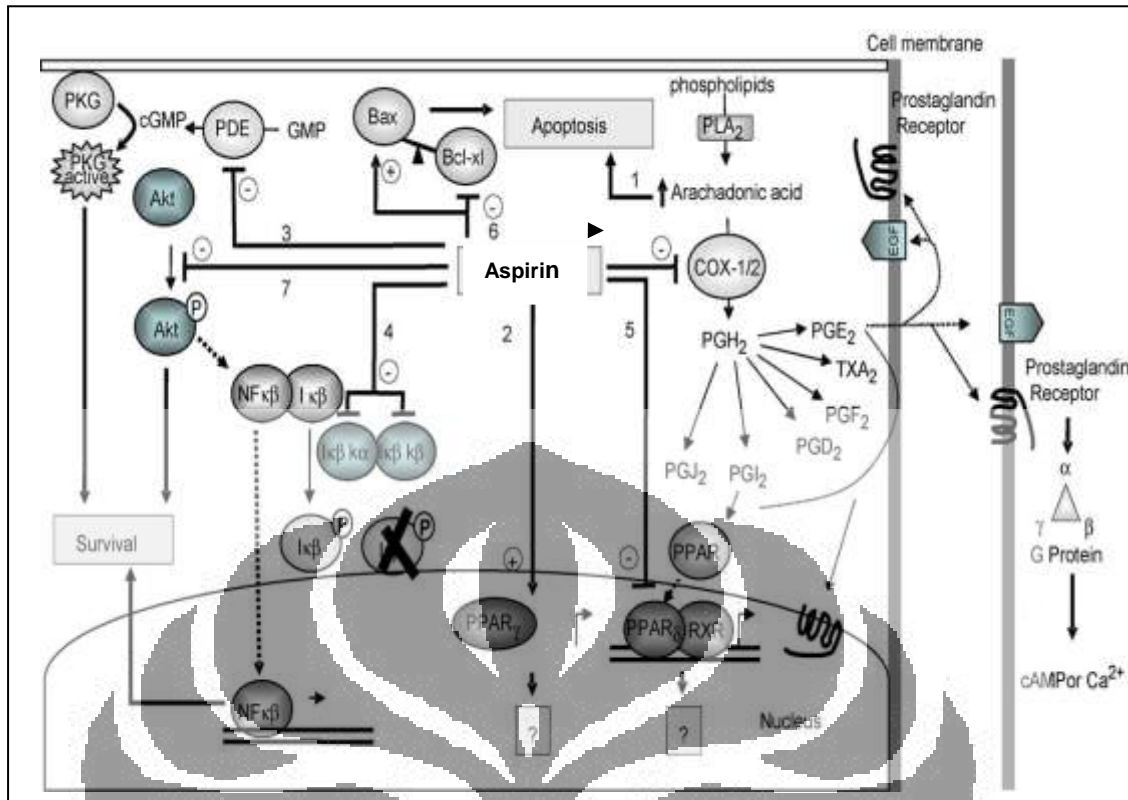
**Gambar 2.10** Mekanisme kerja aspirin dalam menghambat siklooksigenase

Universitas Indonesia

Efek samping asetosal yang timbul, akibat penghambatan isoform COX konstitutif, siklooksigenase (COX-1). COX-1 berfungsi sebagai gen *housekeeping* bertanggung jawab untuk pemeliharaan mukosa lambung, pengaturan aliran darah ginjal pada pembuluh aferen ginjal, dan regulasi agregasi platelet. COX-2 adalah gen yang terbentuk pada saat terjadinya inflamasi, cepat mengalami transkripsi dalam menanggapi cedera jaringan. Oleh karena itu, sifat asetosal sebagai anti-inflamasi, analgesik, dan antipiretik akibat hambatannya terhadap COX-2, sedangkan ulserasi gastro intestinal akibat hambatannya terhadap COX-1.

Pada kanker usus besar COX-2 akan diinduksi, menyebabkan pertumbuhan tumor dengan memproduksi prostaglandin yang menghambat apoptosis dan menginduksi pembentukan pembuluh darah baru (Patrono, Rodriguez, Landolfi, Baigent, 2005). Konsumsi asam asetil salisilat juga dapat mencegah pertumbuhan adenoma polip di epitel usus besar serta menunda pertumbuhan adenoma polip tersebut (Robert, Sandler, Halabi, Baron, Budinger, Paskett, et al., 2003; Rothwell, Wilson, Elwin, Norrving, Algra, 2010).

Selain menghambat enzim COX-2, mekanisme aspirin lainnya adalah menghambat peroxome proliferation activator receptor delta ( $PPAR\sigma$ ), meningkatkan fosforilasi  $\beta$ -catenin, dan menghambat IKB kinase sehingga NF $\kappa$ B tidak terlepas dari ikatannya dengan IKB (lihat Gambar 2.11) (Stark, Reid, Sansom, Guichard, Mayer, et al., 2007).



Sumber : [Stark, Reid, Sansom, Guichard, Mayer, et al., 2007]

Keterangan: A. gambar sebelah kiri, aspirin menghambat siklooksigenase, terjadi akumulasi asam arakidonat yang akan mempromosikan apoptosis. Bila enzim PLAA2 tidak dihambat akan terbentuk PGI<sub>2</sub> yang akan berikatan dengan PPAR, PPAR masuk kedalam inti yang akan mempengaruhi gen yang mengatur transkripsi sehingga akan meningkatkan terjadinya proliferasi; B. Gambar sebelah kiri mekanisme aspirin jalur NFκB, aspirin akan meningkatkan fosforilasi IκB, sehingga NFκB bebas dan tertranslokasi kedalam nukleus yang akan mempengaruhi transkripsi gen yang

**Gambar 2.11** Mekanisme molekuler aspirin

## 2.5 Kedelai



[sumber: Lim, 2012]

**Gambar 2.12** Kedelai (*Glycine max*) a. Tanaman kedelai b. Biji kedelai

### 2.5.1 Taksonomi Kedelai / *Glycine max* (USDA, 2015)

Kerajaan	: Plantae
Subkerajaan	: Tracheobionta
Subdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnolipsida
Subkelas	: Rosidae
Bangsa	: Fabales
Suku	: Fabaceae / Leguminosae
Marga	: <i>Glycine</i> Wild
Jenis	: <i>Glycine max</i> (L.) Merr

### 2.5.2 Asal dan Penyebaran

Kedelai berasal dari Cina, namun sekarang telah dibudidayakan di banyak negara baik yang beriklim tropis, subtropis dan bersuhu panas. Beberapa negara produsen utama kedelai antara lain adalah Amerika Serikat, Brazil, Argetina, Cina, dan India (Lim, 2012).

### 2.5.3 Deskripsi Tanamana

Terna tahunan tegak dengan tinggi 0,2 – 1,8 m, kadang bercabang di apek, warna kecoklatan atau keabu-abuan. Tata daun berseling (alternate), trifoliate

**Universitas Indonesia**

pinat, panjang petiola 2-20 cm, stipulanya bulat telur, 3-7 mm, acuminate. Pucuk daun mudanya pada 1,5-4 mm petiolules, tipis, bulat telur, sub-orvicular, atau elips-lanset, 5-12 x 2,5-8 cm, pangkal cunate atau bulat, apex acuminate atau obtuse mucronate; pangkal daun lebih besar, bagian lateral lebih kecil dan bentuk oval miring. Bunga terminal atau aksilaris, 5-8 tandan bunga kompak, kadang satu bunga atau berada di aksila bawah. Bunga kecil, biseksual, papilionaceous, kelopak berbentuk tabung dengan 2 di atas dan 3 lobus lebih rendah, setose, persisten, corolla, 4,5-10 mm, ungu atau ungu pucat, merah muda atau putih, obovate-suborbicular, apeks sedikit cekung, crenate, obovate, benang sari 10 dialdephous, ovarium berbulu, melengkung dengan stinga berbentuk kepala. Legum sekulen, liontin, lonjong, berbulu halus. Biji 2-5, bulat telur sampai subglubose, 1 x 5 – 8 mm, kulit biji halus, kuning, hijau, coklat, hitam atau bercak dan belang-belang (Lim, 2012).

#### 2.5.4 Kedelai dan Kanker

Kedelai adalah sejenis kacang-kacangan yang sejak lama telah dikonsumsi di seluruh dunia, tetapi paling sering dikonsumsi di negara-negara Asia seperti Cina, Jepang, Korea, Taiwan, dan Indonesia. Konsumsi kedelai negara-negara ini rata-rata mencapai 20-80 gram / hari dalam berbagai bentuk termasuk kedelai, kacangbuh, tepung kedelai, susu kedelai, tahu dan produk fermentasi kedelai seperti tempe, miso, natto, pasta kedelai dan kecap (Coward, Barnes, Setchell, Barnes, 1993; Wang & Murphy, 1994). Asupan tersebut setara dengan asupan harian 25-100 mg total isoflavon (Messina, McCaskill-Stevens, Lampe, 2006) dan konsumsi protein kedelai antara 8-50 gr (Erdman Jr, Jadger, Lampe, Setchell, Messina, 2004). Negara Barat mengkonsumsi lebih sedikit kedelai, hanya sekitar 1-3 gram sehari, dan sebagian dalam bentuk olahan seperti minuman kedelai, sereal, energy bars dan burger kedelai (Fournier, Erdman, Gordon, 1998).

Studi epidemiologi menunjukkan konsumsi kedelai dapat menurunkan resiko penyakit kardiovaskuler (Anderson, Smith, Washnock, 1999) dan kanker seperti payudara, prostate, endometrium, paru-paru, dan kandung kemih (Hernández-Ledesma, Hsieh, Dia, de Mejia, de Lumen, 2011). Beberapa penelitian lainnya dengan hewan coba yang mendukung sifat antikanker dari

kedelai telah terbukti menekan pertumbuhan tumor di berbagai jaringan termasuk kulit, kandung kemih, payudara dan prostat (Messina & Flickinger, 2002). Pada dekade terakhir, penelitian isolasi dan identifikasi berbagai senyawa biologi aktif atau fitokimia yang terkandung dalam kedelai dengan efek pencegahan kanker telah berkembang dengan pesat. Senyawa tersebut antara lain isoflavonoid (genistein, daidzein, dan glycitein), Bowman–Birk protease inhibitor, kunitz trypsin inhibitor, lecitins, dan lunasin (Hernández-Ledesma, Hsieh, Dia, de Mejia, de Lumen, 2011).

## 2.6 Lunasin

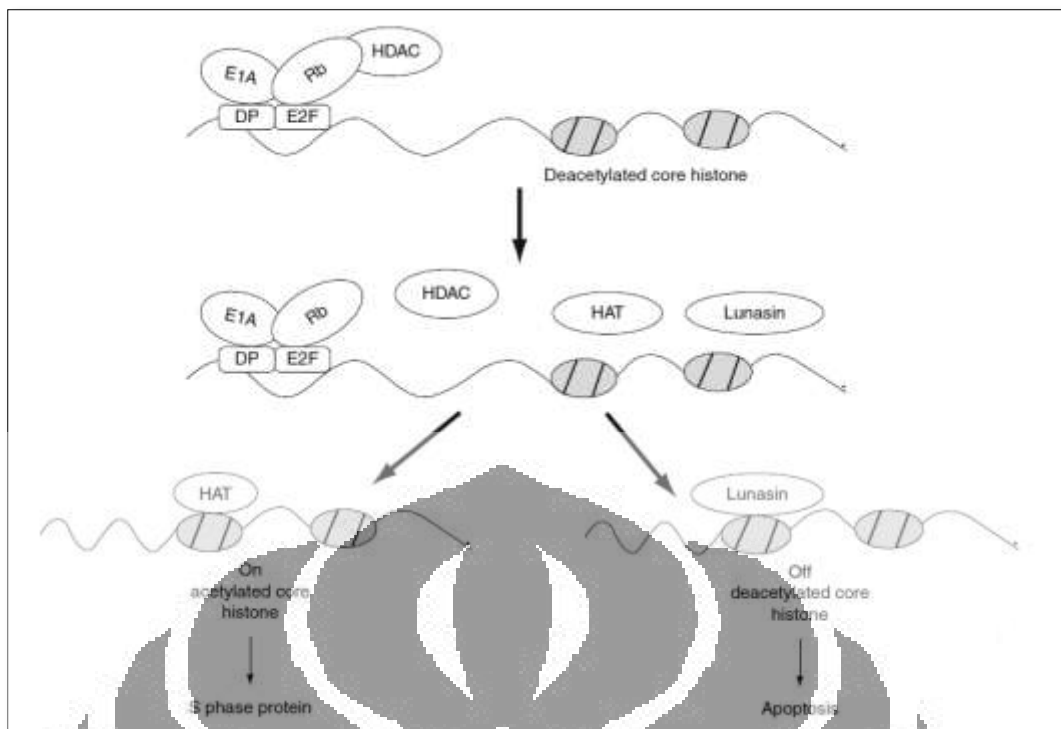
Lunasin adalah peptida baru dengan urutan SKWQHQQDSCR KQKQGVNLTPEKHIMEKIQGRGDDDDDDDDDD, awalnya diisolasi dari kotiledon kedelai (Galvez, Revilleza, de Lumen, 1997). Lunasin terdiri dari 43 residu asam amino dengan urutan yang unik termasuk keberadaan motif adhesi sel terdiri dari RGD dan asam karboksilat terdiri dari sembilan residu asma aspartat (Hernández-Ledesma, Hsieh, Dia, de Mejia, de Lumen, 2011). Pada pemeriksaan ELISA oleh U.S Departement of Agriculture menunjukkan bahwa konsentrasi lunasin berkisar antar 0,1 – 1,3 gram tiap 100 gram tepung kedelai. Sedangkan konsentrasi lunasin pada bentuk komersial protein kedelai berkisar 13 – 44 mg / 100 gram produknya. (de Mejia, Vasconez, de Lumen, Nelson, 2004).

Sampai saat ini, penelitian terkait bioavailabilitas lunasin yang dilakukan pada hewan dan manusia telah menunjukkan hasil yang menajjikan. Studi pada tikus yang diberi protein kedelai yang diperkaya lunasin ditemukan 35% lunasin mencapai jaringan target dan organ dengan utuh dan dalam bentuk aktif (Jeong, Jeong, Kim, de Lumen, 2007). Lunasin juga telah menunjukkan stabilitas terhadap pepsin dan pancreatin secara in vitro (Jeong, Lee, Jeong, Park, Cheong, de Lumen, 2009; Jeong, Jeong, Hsieh, Hernández-Ledesma, de Lumen, 2010). Studi bioavailabilitas pertama pada manusia menunjukkan 4,5% dari lunasin yang dikonsumsi dalam bentuk protein kedelai mencapai plasma dari pria sehat yang menjadi relawan (Dia, Torres, de Lumen, Erdman, de Mejia, 2009).

Purifikasi lunasin dari kedelai yang dihilangkan minyaknya dengan kombinasi *ion-exchange* kromatografi dan *size exclusion* kromatografi menunjukkan aktivitas yang ampuh dalam melawan sel-sel kanker kolon manusia (Dia, Wang, Oh, de Lumen, de Mejia, 2009). Lunasin menyebabkan sitotoksitas dalam empat *cell lines* kanker kolon manusia yang berbeda dengan nilai IC50 13.0  $\mu\text{M}$  untuk sel KM12L4, 21.6  $\mu\text{M}$  untuk sel RKO, 26.3  $\mu\text{M}$  untuk sel HCT-116 dan 61.7  $\mu\text{M}$  untuk sel HT-29 (Dia & de Mejia, 2011). Hasil tersebut menunjukkan bahwa lunasin paling poten membunuh kanker dari sel KM12L4 dibandingkan dengan sel yang lain. Kristal violet pewarnaan sel kanker kolon HT-29 menunjukkan bahwa mulai dari 10  $\mu\text{M}$ , lunasin menyebabkan perubahan morfologi dan jumlah sel kanker (Dia & de Mejia, 2010).

Mekanisme kerja lunasin adalah dengan penghambatan asetilasi histon. Lunasin menunjukkan berkompetisi dengan enzim *histone acetyltransferase* (HATs) seperti *yGCN5* dan *PCAF* untuk menghambat asetilasi histon dan menekan perkembangan siklus sel (Jeong, Lam, de Lumen, 2002; Jeong, Jeong, Kim, Park, Lee, Kweon, et al, 2007; Jeong, Jeong, Park, Lee, Lee, Lee, et al, 2007). Asetilasi menyebabkan gangguan pada kromatin dan aktivasi transkripsi gen (Dwarakanath, Verma, Bhatt, Parmar, Raj, 2008). Lunasin telah dilaporkan menghambat asetilasi histon dalam sel mamalia yang diinduksi bahan kimia karsinogen dan atau onkogen virus yang memprovokasi inaktivasi penekan tumor seperti RB, p52, dan pp32. Ketika lunasin hadir dalam inti sel, lunasin bertindak sebagai pengganti penekan tumor dan mengikat histon inti deasetilasi dengan kuat dan mengganggu keseimbangan antara asetilasi-deasetilasi sel abnormal serta memicu apoptosis (de Lumen, 2005). Mekanisme kerja lunasin dapat dilihat pada Gambar 2.13.





[sumber: Hernandez-Ledesma & de Lumen, 2012]

**Gambar 2.13** Mekanisme kerja lunasin

Studi dengan sel kanker kolon HT-29 dan KM12L4 menunjukkan lunasin menyebabkan fase siklus sel G2/M *arrest* dan menginduksi apoptosis jalur mitokondria (Dia & de Mejia, 2010). Fase siklus sel G2/M *arrest* disebabkan dengan seiring bertambahnya ekspresi protein p21 di sel kanker kolon HT-29, sedangkan ekspresi protein p21 dan p27 keduanya diatur oleh pemberian lunasin di sel kanker kolon KM12L4. Pengukuran ekspresi protein dengan apoptosis jalur mitokondria menunjukkan lunasin mempengaruhi rasio Bax untuk Bcl-2 dengan *up-regulating* pro-apoptosis dan *down-regulating* anti-apoptosis Bcl-2. Hal tersebut dikaitkan dengan peningkatan ekspresi pro-apoptosis clusterin, yang memiliki pengaruh positif pada peningkatan ekspresi p21. Translokasi Bax ke dalam membran mitokondria mengakibatkan pelepasan sitokrom c ditunjukkan dengan peningkatan ekspresi sitosol sitokrom c dalam sel kanker kolon KM12L4 yang diberi lunasin. Hal ini mengakibatkan peningkatan aktivitas caspase-9 dan aktivitas caspase-3 (eksekutor apoptosis) pada sel kanker kolon H-29 dan KM12L4 yang diberi lunasin (Dia & de Mejia, 2010). Mekanisme ini menunjukkan bahwa lunasin dapat menginduksi apoptosis pada sel kanker kolon manusia.

Lunasin juga memiliki aktivitas antiinflamasi dan antioksidan yang mungkin berkontribusi untuk sifat kemopreventifnya. Pada sebuah studi, lunasin poten menghambat liposakarida (LPS) yang menginduksi produksi mediator pro-inflamasi interleukine (IL-6), *tumor necrosis factor* (TNF- $\alpha$ ) dan prostaglandin E2 (PGE2) di sel RAW 264.7 melalui jalur supresi nuclear factor (NF)- $\kappa$ B (Hernández-Ledesma, Hsieh, de Lumen, 2009; de Mejia & Dia, 2009). Telah dilaporkan juga bahwa protein ini mengaktifkan aktivitas antiinflamasi melalui modulasi *cyclooxygenase-2* (COX-2)/ PGE2 dan *inducible nitric oxide synthase* (iNOS)/ jalur oksida nitrat (Dia, Wang, Oh, de Lumen, de Mejia, 2009). Selain itu, lunasin memiliki sifat antioksidan yang kuat, mengurangi induksi LPS yang memproduksi ROS oleh sel makrofag dan bertindak sebagai penangkap (*scavenger*) radikal bebas yang poten (Hernández-Ledesma, Hsieh, de Lumen, 2009).

## 2.7 Apoptosis

Apoptosis adalah mekanisme kematian sel yang terprogram yang berperan dalam pengaturan homeostasis, proses ini menghasilkan keseimbangan dalam jumlah sel tertentu melalui eliminasi sel yang rusak dan proliferasi fisiologis. Deregulasi apoptosis mengakibatkan keadaan patologis, termasuk proliferasi sel abnormal seperti yang dijumpai pada kanker. Ada berbagai bukti yang menyatakan kontrol apoptosis dikaitkan dengan gen yang mengatur berlangsungnya siklus sel, diantaranya gen p53, Rb, Myc, E1A, dan anggota famili Bcl-2. Gangguan regulasi dan proliferasi sel baik akibat onkogen dominan maupun inaktivasi tumor supressor gen ada hubungannya dengan kontrol apoptosis (Goepel, 1996; de Bruin & Medema, 2008).

Proses apoptosis dikendalikan oleh berbagai tingkat sinyal sel, yang dapat berasal dari pencetus intrinsik maupun ekstrinsik. Sinyal intrinsik apoptosis merupakan suatu respon yang diinisiasi oleh sel sebagai respon terhadap stress dan akhirnya dapat mengakibatkan kematian sel. Pengikatan reseptor nuklear oleh glukokortikoid, panas, radiasi, kekurangan nutrisi, infeksi virus dan hipoksia merupakan keadaan yang dapat menimbulkan pelepasan sinyal apoptosis intrinsik melalui kerusakan sel. Sedangkan, yang termasuk pada sinyal ekstrinsik antara

lain hormon, faktor pertumbuhan, *nitric oxide* dan *cytokine*. Semua sinyal tersebut harus dapat menembus membran plasma ataupun transduksi untuk dapat menimbulkan respon (de Bruin & Medema, 2008).

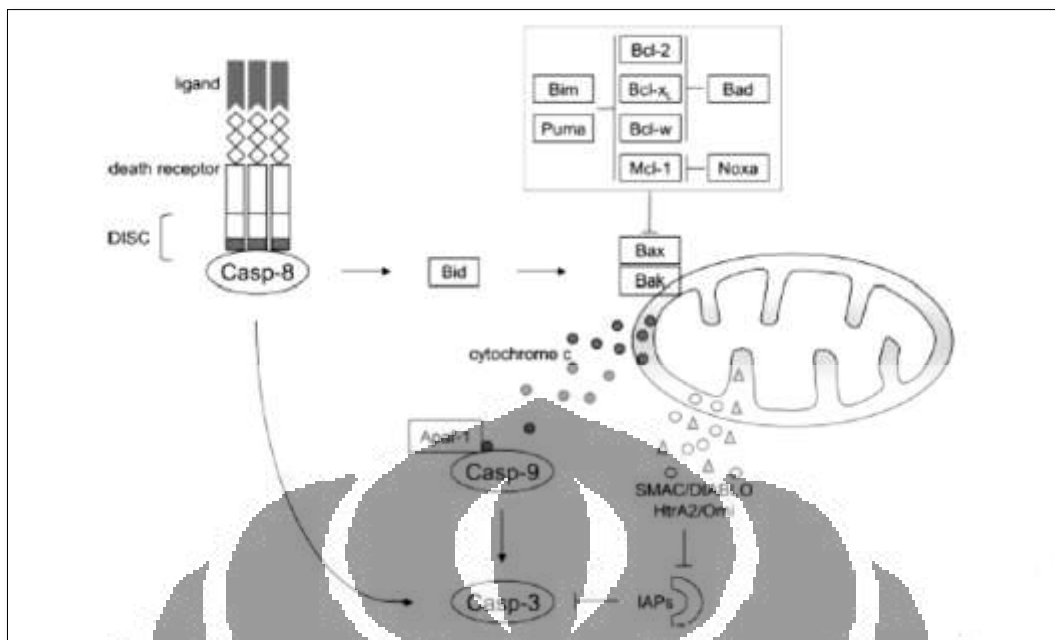
Sebelum terjadi proses kematian sel melalui enzim, sinyal apoptosis harus dihubungkan dengan jalur kematian sel melalui regulasi protein. Pada regulasi ini terdapat dua metode yang telah dikenali untuk mekanisme apoptosis yaitu melalui mitokondria dan penghantaran sinyal secara langsung melalui adapter protein (Chandrasoma & Taylor, 1995).

Jalur intrinsik terjadi oleh karena adanya permeabilitas mitokondria dan pelepasan molekul pro-apoptosis ke dalam sitoplasma, tanpa memerlukan reseptor kematian. Faktor pertumbuhan dan sinyal lainnya dapat merangsang pembentukan protein antiapoptosis Bcl2, yang berfungsi sebagai regulasi apoptosis. Protein anti apoptosis yang utama adalah : Bcl-2 dan Bcl-x, yang pada keadaan normal terdapat pada membran mitokondria dan sitoplasma. Pada saat sel mengalami stress, Bcl-2 dan Bcl-x menghilang dari membran mitokondria dan digantikan oleh pro-apoptosis protein, seperti Bak, Bax, Bim. Sewaktu kadar Bcl-2, Bcl-x menurun, permeabilitas membran mitokondria meningkat, beberapa protein dapat mengaktifkan cascade caspase. Salah satu protein tersebut adalah cytochrom-c yang diperlukan untuk proses respirasi pada mitokondria. Di dalam cytosol, cytochrom-c berikatan dengan protein Apaf-1 (*apoptosis activating factor-1*) dan mengaktifasi caspase-9. Protein mitokondria lainnya, seperti Apoptosis Inducing Factor (AIF) memasuki sitoplasma dengan berbagai inhibitor apoptosis yang pada keadaan normal untuk menghambat aktivasi caspase (de Bruin & Medema, 2008).

Jalur ekstrinsik diinisiasi oleh pengikatan reseptor kematian pada permukaan sel pada berbagai sel. Reseptor kematian merupakan bagian dari reseptor tumor nekrosis faktor yang terdiri dari cytoplasmic domain, berfungsi untuk mengirim sinyal apoptotic. Reseptor kematian yang diketahui antara lain TNF reseptor tipe 1 yang dihubungkan dengan protein Fas (CD95). Pada saat Fas berikatan dengan ligandnya, membran menuju ligand (FasL). Tiga atau lebih molekul Fas bergabung dan cytoplasmic death domain membentuk binding site untuk adapter protein, FADD (Fas-associated death domain). FADD ini melekat

pada reseptor kematian dan mulai berikatan dengan bentuk inaktif dari caspase 8. Molekul procaspase 8 ini kemudian dibawa keatas dan kemudian pecah menjadi caspase 8 aktif. Enzim ini kemudian mencetuskan cascade aktivasi caspase dan kemudian mengaktifkan procaspase lainnya dan mengaktifkan enzim untuk mediator pada fase eksekusi. Jalur ini dapat dihambatoleh protein FLIP, tidak menyebabkan pecahnya enzim procaspase 8 dan tidak menjadi aktif (de Bruin & Medema, 2008).

Pada proses apoptosis dapat terjadi kegagalan pada jalur signalingnya , yang akan menyebabkan terjadinya kanker. Kegagalan ini lebih sering terjadi pada jalur intrinsik dibanding pada jalur ekstrinsik, karena jalur intrinsik lebih sensitif dan paling sering disebabkan oleh mutasi dari gen p53 . Gen p53 ini merupakan tumor supresor gen yang terakumulasi bila DNA mengalami kerusakan. Fungsi dari p53 ini yaitu mencegah replikasi sel pada sel yang rusak secara genetik melalui penghentian siklus sel pada fase G1 atau interfase, sehingga sel mempunyai waktu untuk *repair* atau perbaikan. Selain itu gen ini juga berfungsi untuk mencetuskan apoptosis bila kerusakan sel cukup luas dan terjadi kegagalan pada repair. Bila terjadi mutasi pada gen p53 dapat mengakibatkan disregulasi gen ini sehingga terjadi kegagalan apoptosis dan sel yang rusak terus mengalami replikasi dan akhirnya terjadi kanker. Faktor lain yang berperan pada tumor genesis adalahkeseimbangan antara proapoptosis dan antiapoptosis dari kelompok Bcl2. Pada sel tumor, mutasi dari gen Bel2 dapat menyebabkan peningkatan ekspresi yang dapat menekan fungsi normal dari protein proapoptosis, BAX dan BAK. Jikaterjadi mutasi pada gen BAX dan BAK dapat menyebabkan penurunan regulasi, sehingga sel kehilangan kemampuan untuk regulasi apoptosis yang dapat menimbulkan kanker (de Bruin & Medema, 2008). Regulasi apoptosis dapat dilihat pada Gambar 2.14.



[sumber: de Bruin & Medema, 2008]

**Gambar 2.14** Regulasi apoptosis

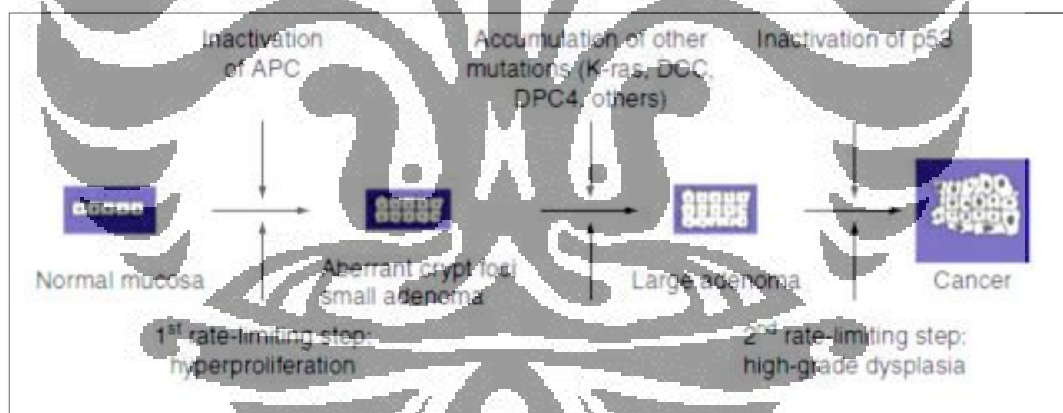
## 2.8 *Colorectal Cancer Premalignant Lesions / Lesi Premaligna CRC*

Lesi premaligna CRC adalah titik fokus lesi yang mendahului perkembangan kanker. Adenoma adalah satu-satunya yang terbukti secara ilmiah memiliki sifat premaligna. Adenoma kolorektal berbentuk polip, bisa flat atau benjolan yang menekan sel epitelnya, dan dapat ditemukan diseluruh usus besar, serta merupakan ciri histologis utama dari displasia. Polip ini bisa tunggal atau ganda, ratusan jumlahnya atau bahkan ribuan, seperti pada pasien dengan familial adenomatous polyposis (FAP); Adenoma jika tidak diobati akan tumbuh dan akhirnya dapat menjadi maligna. Lesi kolorektal yang lain dan mungkin bisa menjadi premaligna adalah hiperplasia polip, *aberrant crypt foci* (ACF), dan inflamasi polip (Khan, Shrier, Gordon, 2001; Roncucci, 2012).

Hiperplasia polip berbentuk bulat, sessile, dan diameter lesinya kurang dari 1 cm. Pemeriksaan histologi menunjukkan selnya memanjang, melebar, secara khusus terlihat seperti *crypt* (kripta), dilapisi oleh satu lapisan epitel kolon, dan biasanya tidak ada ciri dari displasia. Dengan demikian, hiperplasia polip tidak dianggap menjadi premaligna. Namun, variasi dari hiperplasia polip

menunjukkan area displasia dan hiperplasia pada lesi yang sama (disebut sebagai polip campuran), atau pada struktur hiperplasia yang lain menunjukkan tanda – tanda sitologi 30 - 40% displasia yang hadir (disebut sebagai *serrated adenoma*), dianggap dapat menjadi premaligna. Hiperplasia polip berpotensi menjadi maligna melalui jalur mutasi. Beberapa biomolekuler yang dilaporkan dapat merubah hiperplasia polip menjadi maligna antara lain K-ras, mutasi p53, dan *microsatellite instability* (Roncucci, 2012).

*Aberrant Crypt Foci* (ACF) ukurannya lebih kecil dari adenoma (displasia). Secara histologis ACF agak heterogen seperti hipertrofi (hanya melebarkan kripta, tanpa perubahan sel), hiperplasia, dan displasia. ACF dengan displasia dianggap dapat menjadi premaligna. ACF terjadi karena hiperproliferasi epitel dan terjadi perubahan epigenetik berupa *microsatellite instability* (Roncucci, 2012). Perkembangan lesi premaligna dapat dilihat pada Gambar 2.15, terjadi perubahan dari normal sel menjadi ACF, berlanjut ke adenoma (displasia) dan terakhir menjadi kanker kolorektal.



[sumber: Roncucci, 2012]

**Gambar 2.15** *Colorectal Cancer Premaligna Lesion*

Inflamasi polip biasa ditemukan pada pasien dengan penyakit IBD, *ulcerative colitis*, dan penyakit crohn. Inflamasi polip ini mungkin dapat meningkatkan resiko menjadi kanker kolorektal bergantung lamanya penyakit dan luasnya mukosa yang terlibat. Secara umum, inflamasi polip terjadi sebagai hasil dari banyaknya regenerasi mukosa dan reaksi perbaikan setelah ulserasi. Displasia

adalah konsekuensi dari peradangan kronis yang terjadi. Lesi yang terbentuk beresiko tinggi menjadi maligna (Roncucci, 2012).

### 2.8.1 Hiperplasia

Hiperplasia polip diyakini timbul karena gangguan proliferasi dan maturasi dari sel epitel mukosa normal. Proliferasi terjadi di dasar kriptas dan migrasi sel ke atas lambat. Hiperplasia polip bentuknya kecil, mukosa sesil dengan struktur kriptas berlebih. Hiperplasia polip terdapat pada 40% spesimen rektal pada orang yang kurang dari 40 tahun dan 75% pada orang yang lebih tua. Hiperplasia lebih umum pada kolon dengan adenomatous polyps dan pada populasi yang angka kejadian kanker kolorektal tinggi (Rubin & Strayer, 2008).

Hiperplasia polip ditandai dengan adanya mucin yang melimpah dan kekurangan sel goblet bila dibandingkan dengan mukosa kolon normal. *Nuclear atypia*, stratifikasi dan mitosis umumnya tidak tampak pada hiperplasia polip. Namun, pembesaran inti mungkin terjadi pada sebagian kecil hiperplasia polip. Pada dasarnya, hiperplasia polip menunjukkan pemanjangan kriptas, peningkatan jumlah sel goblet, dan ukurannya lebih kecil dari displasia polip. Pada hiperplasia polip menunjukkan adanya mutasi BRAF, mutasi K-ras, dan juga metilasi abnormal DNA (Yang, Farrar, Mack, 2004).

*Serrated polyp* adalah variasi lain dari hiperplasia polip, dikenal dengan "*giant hyperplastic polyps*" karena ukurannya yang lebih besar (>0,5 cm). Bentuk khas dari polip ini adalah bergerigi, dilatasi kriptas dan ireguler, perubahan neoplastik epitel yang jelas ataupun membur, dan mucin yang berlebihan (Lanza, Messerini, Gafa, Risio, 2011; Higuchi & Jass, 2004).

### 2.7.2 Displasia

Displasia adalah kondisi pre-kanker, dimana sel – sel pada lapisan usus atau rektum tampak abnormal namun bukan sel kanker ketika dilihat di bawah mikroskop. Sel – sel ini dapat berubah menjadi kanker kolorektal dari waktu ke waktu, dan biasanya terdapat pada orang yang memiliki penyakit *ulcerative colitis*

atau crohn selama bertahun – tahun. Kedua penyakit tersebut dapat menyebabkan peradangan kronis di usus (ACS, 2014).

Pada sebuah studi tentang colitis terkait displasia dan atau kanker pada tikus yang diberi *dextran sulfate sodium* (DSS) menunjukkan bahwa hispatologi yang terjadi menyerupai yang terjadi pada manusia; inflamasi memiliki peranan penting dalam rangkaian kejadian kanker dengan displasia, kanker yang tumbuh bisa sebagai *flat lesion* atau *dysplasia-associated lesion or mass* (DALM); jalur molekuler awal yang berbeda antara *flat lesion* dan DALM, dengan translokasi inti atau sitoplasma dari  $\beta$ -catenin adalah awal urutan kejadian di DALM; p53 hanya memiliki sedikit peran atau bahkan tidak berperan dalam kejadian kanker dengan displasia (Cooper, Murthy, Kido, Yoshitake, Flanigan, 2000).

Displasia terdiri dari epitel neoplastik tegas yang terbatas di membran basal, tidak ada invasi dari lamina propria (Riddell, Goldman, Ransohoff, et al., 1983; Mescoli, Albertoni, D'incá, Rugge, 2013). Pada dasarnya displasia terjadi dua perubahan yang terjadi secara bersamaan, yaitu struktur yang terganggu dan atypia sitologi. Klasifikasi histologi displasia antara lain: displasia negatif / *negative for dysplasia* (yang berarti mukosa normal atau mukosa dengan perubahan regeneratif); *indefinite for dysplasia*; positif untuk *low-grade dysplasia* (LGD); positif untuk *high-grade dysplasia* (HGD) / kanker invasif (Mescoli, Albertoni, D'incá, Rugge, 2013).

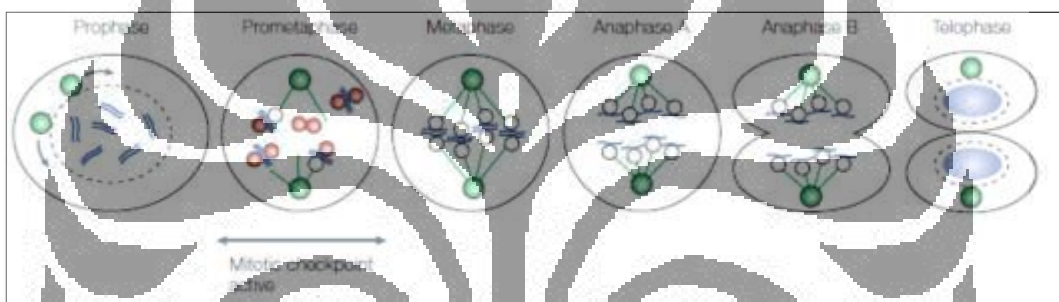
Secara umum kanker kolorektal terjadi dari perubahan mukosa normal menjadi LGD, berlanjut ke HGD dan akhirnya menjadi kanker. Namun hal tersebut tidak selalu terjadi, karena LGD dapat langsung menjadi kanker tanpa melalui HGD. Displasia adalah kombinasi dari kelainan struktur dan sitologi (inti dan sitoplasma). Kelainan struktur yang terjadi termasuk permukaan villiform dan kripta bertunas, bercabang dan berjejal. Kelainan inti termasuk hyperchromasia, pleomorfisme inti (variasi dalam ukuran / bentuk), nukleolus menonjol, rasio inti sitoplasma tinggi, berjejal, stratifikasi, dan mitosis atipikal. Kelainan sitoplasma yang tampak adalah sebagian besar basofilik dengan sedikit atau tanpa mucin sel goblet (Mescoli, Albertoni, D'incá, Rugge, 2013).



## 2.9 Mitosis

Mitosis adalah bagian penting pada siklus sel. Pada kanker terjadi gangguan kronis mitosis sehingga menyebabkan segregasi kromosom yang tidak sama, dikenal dengan fenomena *chromosomal instability*. Mayoritas kanker kolorektal mengalami ketidakstabilan ini (Dalton & Yang, 2007)

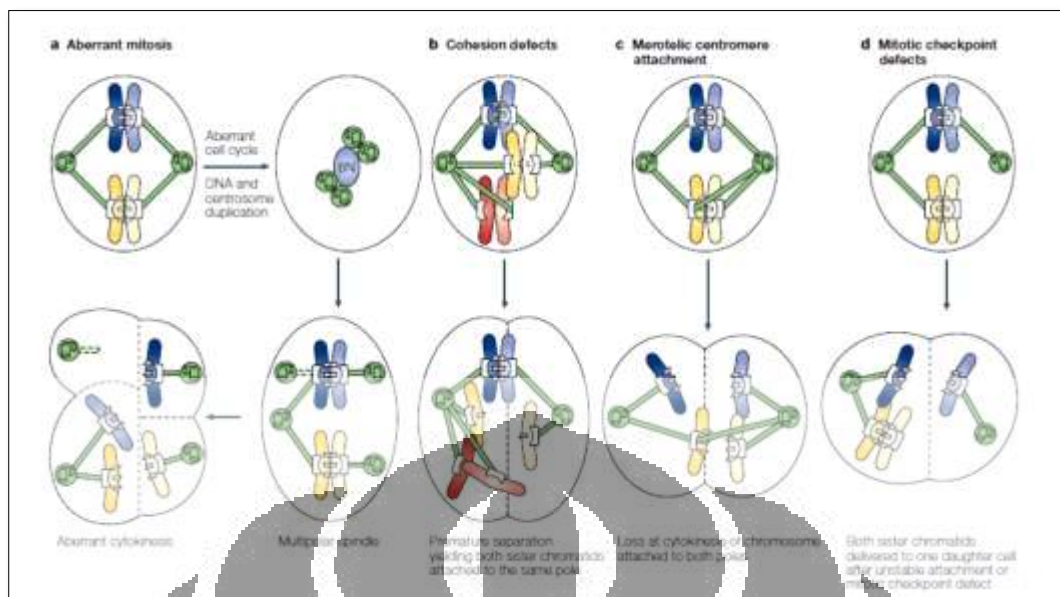
Mitosis adalah proses pembelahan sel dimana sel induk menghasilkan dua sel anak yang identik. Mitosis dibagi menjadi enam fase, yaitu profase, prometafase, metafase, anafase I, anafase II, dan telofase. Proses mitosis checkpoint terjadi di fase prometafase (Kops, Weaver, Cleveland, 2005). Fase mitosis dapat dilihat pada Gambar 2.16.



[sumber: Kops, Weaver, Cleveland, 2005]

**Gambar 2.16** Fase Mitosis

Aneuploid atau abnormal kromosom merupakan ciri umum tumor pada manusia. Aneuploid merupakan akibat dari penyimpangan mitosis yang terjadi. Penyimpangan ini disebabkan oleh spindle multipolar yang merupakan hasil kerusakan sebelumnya di amplifikasi sitokin atau sentromer, bisa disebabkan karena kerusakan penempelan spindle atau kerusakan mitosis *checkpoint* (Kops, Weaver, Cleveland, 2005). Proses menjadi aneuploid dapat dilihat pada Gambar 2.17.



[sumber: Kops, Weaver, Cleveland, 2005]

**Gambar 2.17** Proses menjadi aneuploid

## 2.10 Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan substansi dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Tujuan ekstraksi bahan alam adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut. Metode ekstraksi yang dapat digunakan antara lain dengan menggunakan pelarut (ekstraksi cara dingin dan panas), destilasi uap, ekstraksi berkesinambungan, supkritical karbondioksida, ekstraksi ultrasonic, dan ekstraksi energy listrik (Depkes RI, 2000).

### 2.10.1. Ekstraksi Menggunakan Pelarut

#### 2.10.1.1. Cara Dingin

##### a. Maserasi

Maserasi adalah proses pengestrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperature ruangan (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinu (terus-menerus). Remaserasi berarti dilakuka

pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya (Depkes RI, 2000).

### **b. Perkolasi**

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) pada umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetasan / penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan (Depkes RI, 2000).

## **2.10.1.2. Cara Panas**

### **a. Refluks**

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperature titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relative konstan dengan adanya pendinginan balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat terjadi proses ekstraksi sempurna (Depkes RI, 2000).

### **b. Soxlet**

Soxhlet adalah ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relative konstan dengan adanya pendingin balik (Depkes RI, 2000).

### **c. Digesti**

Digesti adalah maserasi kinetic (dengan pengadukan kontinu) pada temperature yang lebih tinggi dari temperature ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperature 40-50<sup>0</sup>C (Depkes RI, 2000).

### **d. Infus**

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur pemanas air (bejana infus tercelup dalam pemanas air mendidih, temperatur terukur 96-98<sup>0</sup>C) selama waktu tertentu (15-20 menit) (Depkes RI, 2000).

### **e. Dekok**

Dekok adalah infuse pada waktu yang lebih lama ( $\geq 30^{\circ}\text{C}$ ) dan temperatur sampai titik didih air (Depkes RI, 2000).

### **2.10.2. Destilasi Uap**

Destilasi uap adalah ekstraksi senyawa kandungan menguap (minyak atsiri) dari bahan (segar atau simplisia) dengan uap air berdasarkan peristiwa tekanan parsial senyawa kandungan menguap dengan fase uap air dari ketel secara kontinu sampai sempurna dan diakhiri dengan kondensasi fase uap campuran (senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi) menjadi destilat air bersama senyawa kandungan yang memisah sempurna atau memisah sebagian. Destilasi uap, bahan (simplisia) benar-benar tidak tercelup air yang mendidih, namun dilewati uap air sehingga senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi. Destilasi uap dan air, bahan (simplisia) bercampur sempurna atau sebagian dengan air mendidih, senyawa kandungan menguap tetap kontinu ikut terdestilasi (Depkes RI, 2000).

### **2.10.3. Cara Ekstraksi Lainnya**

#### **2.10.3.1. Ekstraksi berkesinambungan**

Proses ekstraksi yang dilakukan berulang kali dengan pelarut yang berbeda atau resirkulasi cairan pelarut dan prosesnya tersusun berurutan beberapa kali. Proses ini dilakukan untuk meningkatkan efisiensi (jumlah pelarut) dan dirancang untuk bahan dalam jumlah besar yang terbagi dalam beberapa bejana ekstraksi (Depkes RI, 2000).

#### **2.10.3.2. Supkritisal karbondioksida**

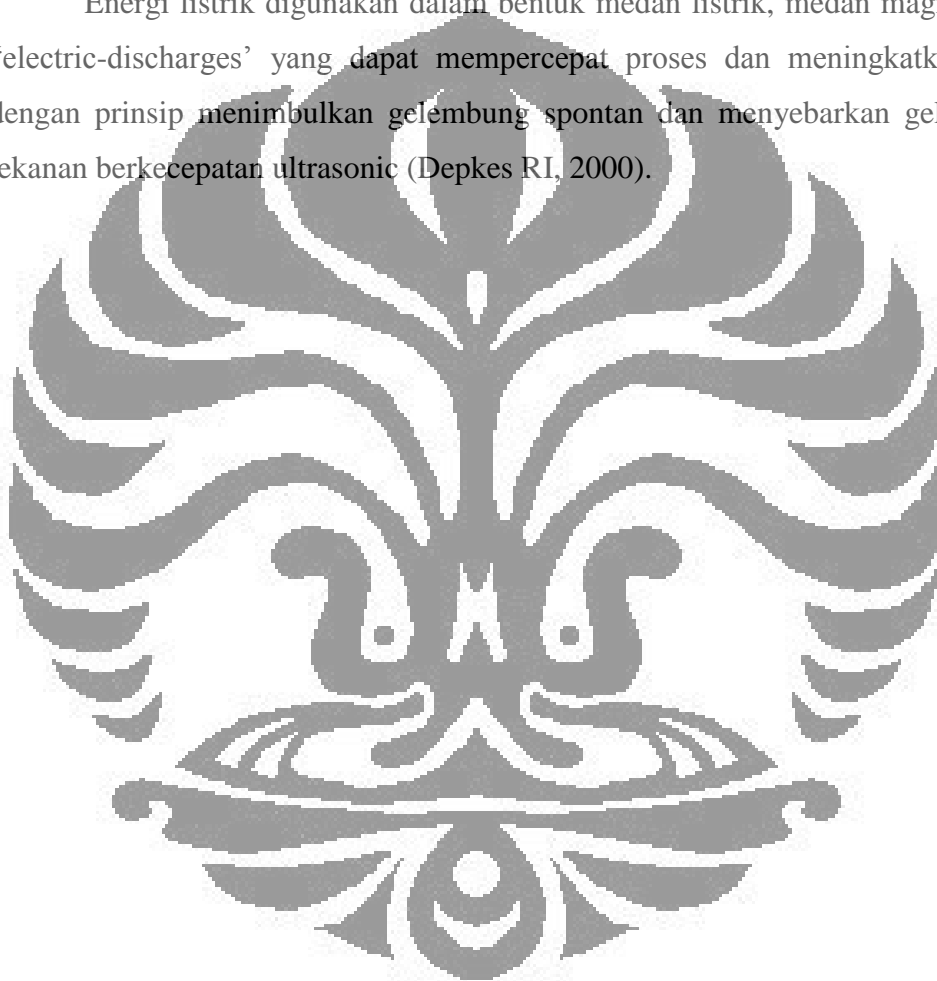
Penggunaan prinsip superkritik untuk ekstraksi serbuk simplisia dan umumnya digunakan gas karbondioksida. Dengan variabel tekanan dan temperature akan diperoleh spesifikasi kondisi polaritas tertentu yang sesuai untuk melarutkan golongan senyawa kandungan tertentu. Penghilangan cairan pelarut dengan mudah dilakukan karena karbondioksida menguap dengan mudah, sehingga hampir langsung diperoleh ekstrak (Depkes RI, 2000).

### 2.10.3.3. Ekstraksi Ultrasonik

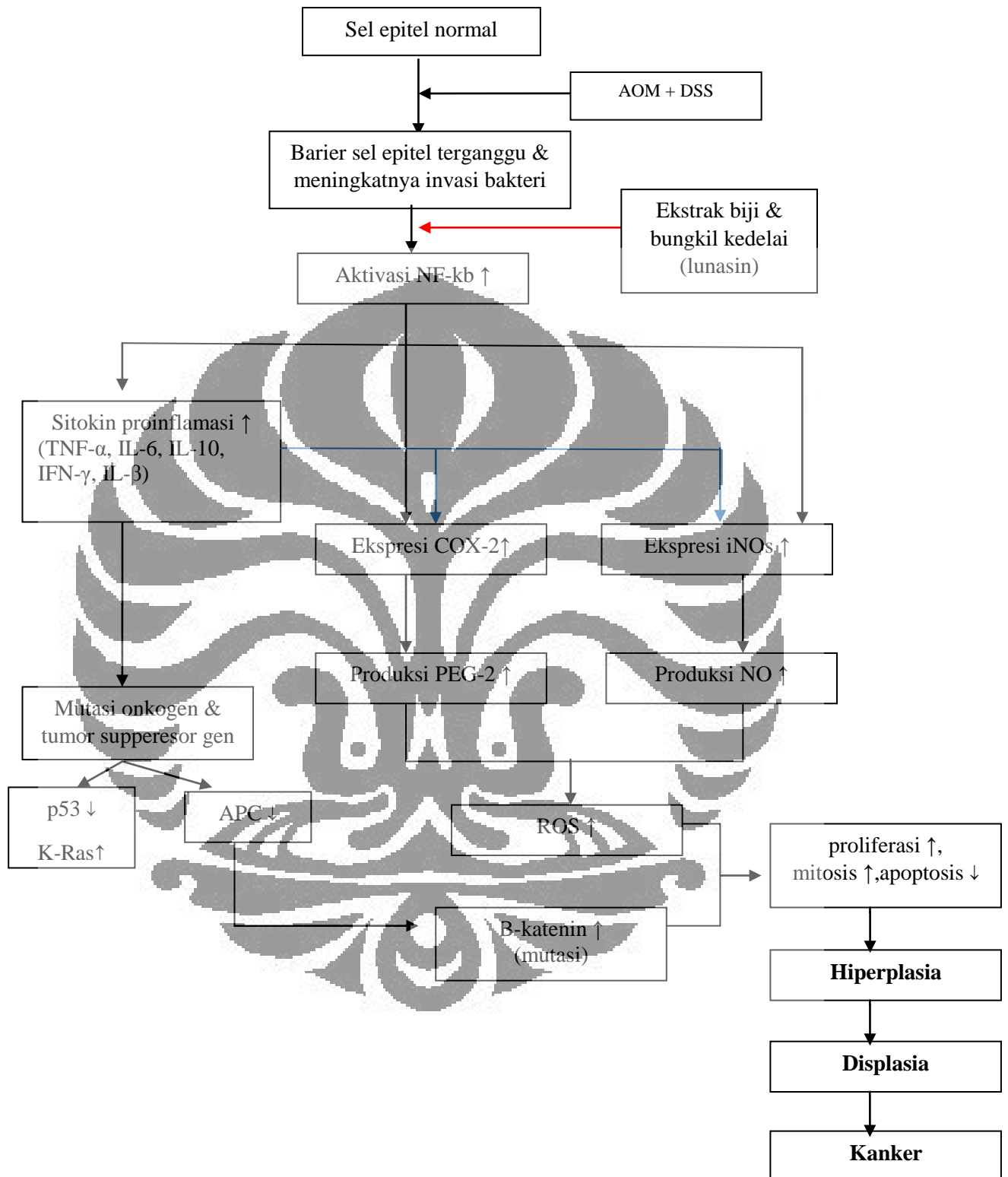
Getaran ultrasosik ( $> 20.000$  Hz) memberikan efek pada proses ekstrak dengan prinsip meningkatkan permeabilitas dinding sel, menimbulkan gelembung spontan (cavitation) sebagai stress dinamik serta menimbulkan fraksi interfase. Hasil ekstraksi tergantung pada frekuensi getaran, kapasitas alat dan lama proses ultrasonikasi (Depkes RI, 2000)

### 2.10.3.4. Ekstraksi energi listrik

Energi listrik digunakan dalam bentuk medan listrik, medan magnet serta “electric-discharges” yang dapat mempercepat proses dan meningkatkan hasil dengan prinsip menimbulkan gelembung spontan dan menyebarkan gelombang tekanan berkecepatan ultrasonic (Depkes RI, 2000).



2.11 Kerangka Konsep



Gambar 2.18 Bagan k erangka konsep

## BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

### 1.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* dengan menggunakan hewan coba mencit Swiss-Webster.

### 1.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Pembuatan ekstrak biji dan bungkil serta penentuan konsentrasi lunasin dilakukan di Pusat Studi Biofarmaka Bogor, pada bulan Februari 2016.

Penelitian secara *in vivo* untuk melihat hambatan karsinogenesis kolon dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia Salemba pada bulan Mei 2016 sampai Juli 2016.

### 1.3 Bahan Penelitian

#### 3.3.1 Simplisia Biji Kedelai

Biji kedelai (*Glycine max* L.) varietas Grobogan didapat dari Balai Penelitian Tanaman Kacang dan Umbi (Balitkabi) Malang pada bagian UPBS (Unit Pengelola Benih Sumber) sebanyak 5 kg. Simplisia kedelai grobogan dapat dilihat pada Gambar 3.1.



**Gambar 3.1** Kedelai Grobogan

### 3.3.2 Bungkil Kedelai

Bungkil kedelai diperoleh dari toko masdhomi, Semarang melalui situs belanja online bukalapak.com. Bungkil kedelai adalah produk hasil ikutan penggilingan biji kedelai setelah ekstraksi minyaknya secara mekanis (*expeller*) atau secara kimia (Solvent). Bungkil kedelai dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2 Bungkil Kedelai

### 3.3.3 Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit Swiss-webster jantan dengan berat rata-rata  $\pm$  20 gram dan berusia 12 minggu yang diperoleh dari Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Balitbankes) Kementerian Kesehatan Republik Indonesia sebanyak 54 ekor.

### 3.3.4 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan untuk ekstraksi adalah NaCl (Merck), KCl (Merck), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck), Etanol 96% (Merck), HCl 37% (Merck), NaOH (Merck), Aqua destilata.

Untuk penentuan konsentrasi lunasin menggunakan HPLC digunakan bahan kimia antara lain: asetonitril (PT. Brataco), asam trifluoroasetat (PT. Brataco), lunasin murni (Sigma Chemical Company) sebagai standar.

54



Untuk induksi karsinogenesis kolon digunakan azoksimetana (Sigma Chemical Company) dan DSS BM 500.000 (Sigma Chemical Company). Untuk preparasi sampel kolon dan pewarnaan histopatologi digunakan bahan kimia antara lain: eter (PT. Brataco), formalin (PT. Brataco), parafin solidum (PT. Brataco), hematoksin (Merck), eosin (Merck), anti-caspase-3-antibody, xylol (Merck), alkohol pro analisa (Merck), litium karbonat, dan akuades.

### 3.3.5 Alat Penelitian

Neraca analitik, blender (Philips), panci maserasi, *magnetic stirrer*, *sentrifuge* (Beckmann J2-12/E *Centrifuge*), sonikator, tabung evedove 2 ml, pH meter, HPLC, *freeze drier*, alat gelas (labu ukur, beker glass, gelas ukur, pipet tetes, batang pengaduk, gelas arloji, corong), gavage, mikroskop cahaya, gelas obyek, kaca penutup, spuit, kamera digital, buku, dan data pencatatan.

## 3.4 Parameter Simplisia

### 3.4.1 Makroskopik

Pemerian : dinilai bentuk, ukuran, ketebalan, tepi, warna, rasa, bau simplisia (Departemen Kesehatan RI, 2000).

### 3.4.2 Penetapan Kadar Air

Lebih kurang 10 gram serbuk simplisia dimasukkan dan ditimbang seksama dalam wadah yang telah ditara. Serbuk tersebut kemudian dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam dan ditimbang. Pengeringan dilanjutkan dan ditimbang pada jarak 1 jam sampai perbedaan antara 2 penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Departemen Kesehatan RI, 2000).

### 3.4.3 Penetapan Kadar Abu

Lebih kurang 2 g sampai 3 g serbuk yang telah digerus dan ditimbang seksama dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara, kemudian diratakan. Serbuk selanjutnya dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, kemudian didinginkan dan ditimbang. Jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, tambahkan air panas kemudian disaring melalui kertas saring

bebas abu. Sisa kertas dan kertas saring selanjutnya dipijarkan dalam krus yang sama. Masukkan filtrat ke dalam krus, diuapkan, dipijarkan hingga bobot tetap dan ditimbang. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Departemen Kesehatan RI, 2000).

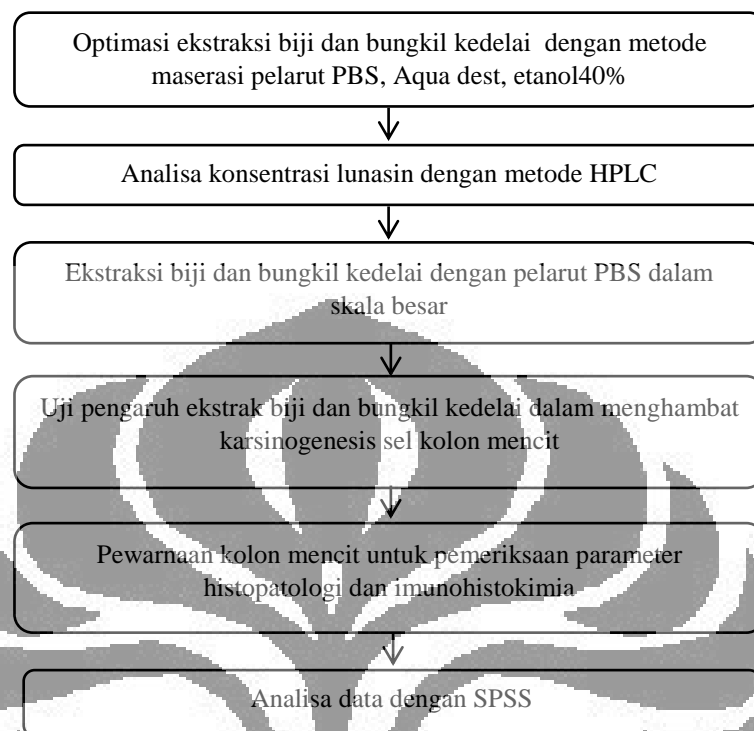
#### **3.4.4 Penetapan Kadar Sari Larut Air**

Lebih kurang 5 g serbuk yang telah dikeringkan di udara ditimbang seksama. Serbuk kemudian dimasukkan ke dalam labu tersumbat dan ditambahkan 100 mL air jenuh kloroform, dikocok berkali kali selama 6 jam pertama dan dibiarkan selama 18 jam. Larutan selanjutnya disaring, diambil 20 mL filtrat untuk diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal beralas datar yang telah dipanaskan 105°C dan ditara, sisa filtrat dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar dihitung dalam % sari larut air (Departemen Kesehatan RI, 2000).

#### **3.4.5 Penetapan Kadar Sari Larut Etanol**

Lebih kurang 5 g serbuk yang telah dikeringkan di udara ditimbang seksama. Serbuk kemudian dimasukkan ke dalam labu tersumbat dan ditambahkan 100 mL etanol 95%, dikocok berkali kali selama 6 jam pertama dan dibiarkan selama 18 jam. Selanjutnya larutan disaring cepat untuk menghindari penguapan etanol, diambil 20 mL filtrat untuk diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal beralas datar yang telah dipanaskan 105°C dan ditara, sisa filtrat dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar dihitung dalam % sari larut etanol (Departemen Kesehatan RI, 2000).

### 3.5 Prosedur Pelaksanaan



Gambar 3.3 Skema Prosedur Pelaksanaan

### 3.6 Pembuatan Ekstraksi Biji dan Bungkil Kedelai

#### 3.6.1 Preparasi Biji dan Bungkil Kedelai

Kedelai yang digunakan adalah varietas Grobogan. Kedelai diperoleh dari Balitkabi sebanyak 5 kg. Sebelum dilakukan ekstraksi, sampel kedelai Grobogan dipress terlebih dahulu, untuk memisahkan minyaknya. Proses pengepresan dilakukan di BALITRO Bogor. Bobot awal kedelai sebelum dipress adalah 3 kg. Proses pengepresannya adalah sebagai berikut 1) Biji kedelai dijemur dengan cara diangin-anginkan untuk mengurangi kelembapan; 2) Biji kedelai digrinder dengan kehalusan 3-4 mm; 3) Hasil grinder kemudian dibungkus dengan kain blacu lalu dipress dengan mesin press pada suhu 120°F, tekanan 100-150 atm. Kapasitas pengepresan adalah 100-200 g. Waktu yang diperlukan untuk mengepres satu blacu sekitar 30 menit.

Hasil pengepresan kedelai diperoleh minyak kedelai dengan kadar minyak lemak 8% dan ampas kedelai (simplicia yang akan diekstraksi) sebesar 1,990 kg dari bobot awal kedelai 3 kg.

Preparasi untuk bungkil kedelai komersil yang akan dijadikan simplisia untuk ekstraksi adalah dilakukan penjemuran dengan diangin-anginkan selama 3 hari untuk mengurangi kelembapannya. Selanjutnya, membuang pengotor (seperti butiran jagung) yang ada pada bungkil komersil secara manual.

### 3.6.2 Optimasi Ekstraksi Biji dan Bungkil Kedelai

Tahap awal ekstraksi biji kedelai dipisahkan minyak dengan ampasnya menggunakan mesin pengepresan. Pada tahap ini akan diperoleh residu (ampas). Untuk memperoleh ekstrak kedelai dan bungkil yang memiliki kandungan lunasin optimal maka dilakukan maserasi dengan berbagai pelarut. Berbagai pelarut yang digunakan, antara lain buffer Aqua dest, phospat buffer saline (PBS), dan etanol 40% (Galbaz et al., 2013; Dia et al., 2009; Seber et al., 2012).

Hasil pengepresan kedelai Grobogan dari Balitro masih berupa lempengan kering. Selanjutnya, lempengan kering tersebut dijadikan serbuk dengan cara penumbukan dan diblender. Hasil dari proses tersebut selanjutnya disebut bungkil Grobogan. Bungkil grobogan diambil dalam jumlah sedikit untuk optimasi ekstraksi. Prosedur untuk optimasi ekstraksi ini antara lain: 1) Menimbang simplisia bungkil grobogan sebanyak 10 gr sebanyak 9 kali karena akan dibuat triplo; 2) Maserasi simplisia tersebut dengan 3 jenis pelarut yaitu buffer fosfat (PBS), aqua dest, dan etanol 40% dengan volume 5x bobot simplisia. Jadi masing-masing pelarut sebanyak 50 ml. 3) Maserasi dilakukan selama 60 menit sambil diaduk. Hasil maserasi disaring dengan kertas saring dan dibantu vakum. Hasil maserasi selanjutnya disebut ekstrak cair; 3) Ekstrak cair yang diperoleh selanjutnya dikeringkan menggunakan *syncore* dengan suhu 60°C selama 10 jam.

Pada proses optimasi ekstraksi ini, diperoleh rendemen yang paling besar adalah ekstrak dengan pelarut PBS (19,68%). Hasil ekstrak kering yang diperoleh disimpan dalam lemari es untuk selanjutnya diuji kandungan lunasinnya dengan metode HPLC.

### 3.6.3 Penentuan Kandungan Lunasin dengan Metode HPLC

Analisa kandungan lunasin masing-masing ekstrak dilakukan dengan metode HPLC merujuk pada penelitian yang dilakukan Dia et al (2009). Tahapannya adalah

sebagai berikut: sebanyak 100 mg ekstrak ditimbang dan dilarutkan dalam 8 mL aquadest, kemudian larutan disonikasi selama 30 menit dan setelahnya ditambahkan aquades hingga sampai volume 10 mL (larutan 10.000 ppm). Larutan selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 menit dan diambil filtratnya. Filtrat disaring dengan saringan millipore 0,22  $\mu\text{m}$  dan diperoleh larutan yang jernih dan tidak berwarna. Larutan tersebut kemudian ditentukan kadar lunasinnya dengan metode HPLC memakai kolom C18 dan detektor UV-Vis, menggunakan fase gerak asetonitril : air dengan perbandingan 5:95, waktu retensi 35 menit, panjang gelombang 295 nm, volume injeksi 20  $\mu\text{L}$  dan kecepatan fase gerak 2 mL/menit. Ekstrak dengan pelarut yang memberikan kadar lunasin terlarut lebih banyak, digunakan untuk uji *in vivo* ke hewan uji.

#### **3.6.4 Pembuatan Ekstrak Biji dan Bungkil Kedelai**

Residu yang diperoleh dari hasil pengepresan dibuat serbuk terlebih dahulu dengan blender. Residu dimaserasi dengan pelarut PBS karena pada optimasi yang telah dilakukan sebelumnya pelarut yang memiliki kandungan lunasin yang tinggi adalah PBS (0,861 mg/g). Bahan yang diperlukan untuk pembuatan ekstrak antara lain PBS 13 liter, NaOH 100 ml, HCL 100 ml, simplisia bungkil grobogan 1.25 kg dan bungkil komersil 1.25 kg. Alat yang dipersiapkan antara lain panci maserasi ukuran besar 2 buah, dirigen 10 L, sebanyak 2 buah, gelas arloji, beker glass, corong, batang pengaduk, spatel, kain blacu. Proses ekstraksi meliputi: 1) Maserasi simplisia bungkil grobogan dan bungkil komersi masing – masing dengan PBS dengan volume 5 kali bobot simplisia (6.25 L) selama 60 menit; 2) Saring dengan kain blacu sebanyak 2 kali penyaringan; 3) Hasil ekstrak cair yang diperoleh di simpan di ruangan dengan suhu dingin untuk selajutnya mengalami proses pengeringan; 4) Hasil ekstrak cair yang diperoleh dikeringkan dengan *rotary vapour* dengan suhu dijaga di bawah 60°C; 5) Ekstrak kering yang diperoleh kemudian disimpan di dalam lemari es untuk selanjutnya diuji kualitatif dan kandungan lunasinnya dengan HPLC.

### 3.7 Parameter Ekstrak

#### 3.7.1 Penetapan Kadar Air

Tujuan penetapan kadar air adalah memberikan batasan minimal atau rentang tentang besarnya kandungan air di dalam bahan. Salah satu metodenya adalah gravimetri. Lebih kurang 10 gram ekstrak dimasukkan dan ditimbang seksama dalam wadah yang telah ditara. Ekstrak tersebut kemudian dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam dan ditimbang. Pengeringan dilanjutkan dan ditimbang pada jarak 1 jam sampai perbedaan antara 2 penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Departemen Kesehatan RI, 2000).

#### 3.7.2 Penetapan Kadar Abu

Tujuan penetapan kadar abu adalah memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak. Lebih kurang 2 g sampai 3 g ekstrak yang telah digerus dan ditimbang seksama dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara, kemudian diratakan. Serbuk selanjutnya dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, kemudian didinginkan dan ditimbang. Jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, tambahkan air panas kemudian disaring melalui kertas saring bebas abu. Sisa kertas dan kertas saring selanjutnya dipijarkan dalam krus yang sama. Masukkan filtrat ke dalam krus, diuapkan, dipijarkan hingga bobot tetap, kemudian timbang. Hitung kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Departemen Kesehatan RI, 2000).

#### 3.7.3 Penetapan Kadar Abu Tak Larut Asam

Abu yang diperoleh dididihkan dengan 25 mL asam klorida encer selama 5 menit. Bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, disaring dengan kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas dan dipijarkan dalam krus hingga bobot tetap. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam % b/b (Departemen Kesehatan RI, 2000).

### **3.7.4 Penetapan Parameter Cemaran Mikroba**

#### **3.7.4.1 Angka Lempeng Total (ALT)**

Disiapkan 5 buah tabung atau lebih yang masing-masing telah diisi dengan 9 mL pengencer PDF (Pepton Dilution Fluid). Dari hasil homogenisasi pada penyiapan contoh dipipet pengenceran 10<sup>-1</sup> sebanyak 1 mL ke dalam tabung yang berisi pengencer PDF pertama hingga diperoleh pengenceran 10<sup>-2</sup> dan dikocok hingga homogeny. Dibuat pengenceran selanjutnya hingga 10<sup>-6</sup> atau sesuai dengan yang diperlukan. Dari setiap pengenceran dipipet 1 mL ke dalam cawan petri dan dibuat duplo. Ke dalam tiap cawan petri dituangkan 15-20 mL media PCA (45±1°). Segera cawan petri digoyang dan diputar sedemikian rupa hingga suspensi tersebar merata. Untuk mengetahui sterilitas media dan pengencer dibuat uji control (blanko). Pada satu cawan hanya diisi 1 mL pengencer dan media agar, dan pada cawan yang lain diisi pengencer dan media. Setelah media memadat, cawan petri diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 24-48 jam dengan posisi terbalik. Jumlah koloni yang tumbuh diamati dan dihitung (Departemen Kesehatan RI, 2000).

#### **3.7.4.2 Uji Nilai Duga Terdekat (*Most Probable Number*/MPN) Koliform**

Disiapkan 5 tabung reaksi masing-masing berisi 9 mL PDF. Dari hasil homogenisasi pada penyiapan contoh dipipet 1 mL pengenceran 10<sup>-1</sup> ke dalam tabung PDF pertama hingga diperoleh suspensi dengan pengenceran 10<sup>-2</sup> dan dikocok sampai homogen. Dibuat pengenceran selanjutnya hingga 10<sup>-6</sup>. Untuk setiap pengenceran disiapkan 3 tabung berisi 9 mL MacConkey Broth (MCB) yang dilengkapi tabung Durham. Ke dalam tiap tabung dari masing-masing seri dimasukkan 1 mL suspensi pengenceran. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Setelah 24 jam dicatat dan diamati adanya gas yang terbentuk di dalam tiap tabung. Kemudian inkubasi dilanjutkan hingga 48 jam dan dicatat tabung-tabung yang menunjukkan gas positif (Departemen Kesehatan RI, 2000).

#### **3.7.4.3 Penetapan Angka Kapang/Khamir**

Disiapkan 3 buah tabung yang masing-masing telah diisi 9 mL Air Suling Agar (ASA). Dari hasil homogenisasi pada penyiapan contoh dipipet 1 mL

pengenceran 10-1 ke dalam tabung ASA pertama hingga diperoleh pengenceran 10-2, dan dikocok sampai homogeny. Dibuat pengenceran selanjutnya hingga 10-4. Dari masing-masing pengenceran dipipet 0,5 mL, dituangkan pada permukaan Potato Dextrose Agar (PDA), segera digoyang sambil diputar agar suspensi tersebar merata dan dibuat duplo. Untuk mengetahui sterilitas media dan pengencer, dilakukan uji blangko. Ke dalam satu cawan petri dituangkan media dan dibiarkan memadat. Ke dalam cawan petri lainnya dituangkan media dan pengencer, kemudian dibiarkan memadat. Seluruh cawan petri diinkubasi pada suhu 20-25°C selama 5-7 hari. Sesudah 5 hari inkubasi, dicatat jumlah koloni jamur yang tumbuh, pengamatan terakhir pada inkubasi 7 hari. Koloni ragi dibedakan karena bentuknya bulat kecil-kecil putih hampir menyerupai bakteri. Lempeng agar yang diamati adalah lempeng dimana terdapat 40-60 koloni kapang/khamir (Departemen Kesehatan RI, 2000).

### 3.7.5 Penetapan Cemar Logam Berat

Pengujian ini dimaksudkan untuk menunjukkan bahwa cemaran logam dengan ion sulfida menghasilkan warna pada kondisi penetapan, tidak melebihi batas logam berat yang dipersyaratkan, dinyatakan dalam % (bobot) timbal dalam zat uji, ditetapkan dengan membandingkan secara visual seperti yang tertera pada perbandingan visual dalam spektrofotometri dan Hamburan Cahaya dengan pembanding larutan baku timbal.

Larutan baku : dipipet 2 mL larutan baku timbal (20 µg Pb) ke dalam tabung pembanding warna 50 mL dan encerkan dengan air hingga 25 mL. pH diatur antara 3,0 dan 4,0 dengan asam asetat 1 N atau amonium hidroksida 6 N menggunakan indikator kertas pH pendek sebagai indikator eksternal, encerkan dengan air hingga 40 mL, lalu dicampur.

Larutan Uji : ke dalam tabung pembanding 50 mL masukkan 25 mL larutan uji, atau larutkan dan encerkan dengan air hingga 25 mL sejumlah zat uji dalam g yang dihitung dengan rumus :

$$\frac{2,0}{1000 L}$$



L adalah batas logam berat dalam persen. pH diatur antara 3,0 dan 4,0 dengan asam asetat 1 N atau ammonium hidroksida 6 N menggunakan kertas indikator pH rentang pendek sebagai indikator eksternal, kemudian diencerkan dengan air hingga 40 mL dan dicampur.

Larutan Monitor : Sebanyak 25 mL larutan yang dibuat sama seperti larutan uji dimasukkan ke dalam tabung pembanding warna 50 mL dan ditambahkan 2,0 mL larutan baku timbal. pH diatur antara 3,0 dan 4,0 dengan asam asetat 1 N atau ammonium hidroksida 6 N menggunakan kertas indikator pH rentang pendek sebagai indikator eksternal, kemudian diencerkan dengan air hingga 40 mL dan dicampur.

Prosedur : Ke dalam tiap tabung dari 3 tabung yang masing-masing berisi larutan baku, larutan uji dan larutan monitor tambahkan 10 mL hidrogen sulfida LP yang dibuat segar, campur, diamkan selama 5 menit. Amati permukaan dari atas pada dasar putih : warna yang terjadi pada larutan uji tidak lebih gelap dari warna yang terjadi pada larutan baku, dan intensitas warna pada larutan monitor sama atau lebih kuat dari larutan baku (Departemen Kesehatan RI, 2000).

### **3.8 Identifikasi Senyawa Fitokimia**

#### **3.8.1 Alkaloid**

Penapisan fitokimia alkaloid dapat dilakukan dengan beberapa pereaksi seperti mayer, dragendorf, dan bouchardat. Caranya  $\pm$  20 mg ekstrak kental dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1 ml HCL 2N dan 9 ml air. Larutan dimasukkan ke dalam beaker glass berisi air panas kemudian dipanaskan di penangas air selama 2 menit kemudian didinginkan. Larutan disaring dan ditampung filtratnya. Filtrat tersebut digunakan sebagai larutan uji (Depkes RI, 1995; Harbone, 1987).

Larutan uji ditetaskan dengan beberapa pereaksi untuk mengidentifikasi kandungan alkaloid, antara lain: a) 1 ml filtrat ditetaskan di atas kaca arloji, ditambahkan 2 tetes pereaksi bouchardat, terbentuk endapan coklat / hitam (positif alkaloid), b) 1 ml filtrat ditetaskan di atas kaca arloji, ditambahkan 2 tetes pereaksi mayer, terbentuk endapan menggumpal putih atau kuning yang larut dalam metanol (positif alkaloid), c) 1 ml filtrat ditetaskan di atas kaca arloji, ditambahkan 2 tetes

pereaksi dragendroff, terbentuk endapan jingga cokelat (positif alkaloid) (Depkes RI, 1995; Harbone, 1987).

### 3.8.2 Tanin / Polifenol

Cara pengujian tanin dengan  $\pm 20$  mg ekstrak kental dilarutkan dalam 15 ml air suling panas dan diaduk. Setelah dingin kemudian disaring, 3 filtrat sebanyak 1 ml masing-masing diberi perlakuan antara lain: a) ditambahkan 3 ml larutan gelatin 10% dan diperhatikan adanya endapan putih, b) ditambahkan 2 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  3% dan diperhatikan terjadinya perubahan warna menjadi hijau violet, c) ditambahkan 3 ml larutan NaCl-gelatin dan diperhatikan adanya endapan putih (Depkes RI, 1995).

### 3.8.3 Saponin

Cara pengujian saponin dengan  $\pm 15$  mg ekstrak kental dilarutkan dalam 10 ml air panas, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 5 detik, lalu didiamkan selama 5 menit akan terbentuk buih yang mantap setinggi 1-10 cm. Jika pada penambahan 1 tetes HCl 2 N buih tidak hilang, berarti positif saponin (Depkes RI, 1995; Harbone, 1987).

### 3.8.4 Flavonoid

Cara pengujian flavonoid ada tiga cara yaitu a) sebanyak  $\pm 50$  mg ekstrak dilarutkan dalam 3 ml etanol 95% kemudian ditambahkan 100 mg serbuk Zn dan 2 ml HCl 2N dan didiamkan selama 1 menit. Kemudian ditambahkan 10 tetes HCL pekat, jika dalam waktu 2-5 menit terjadi warna merah intensif, menunjukkan adanya flavonoid; b) sebanyak  $\pm 50$  mg ekstrak dilarutkan dalam 3 ml etanol 95% kemudian ditambahkan 100 mg serbuk Mg dan 10 tetes HCL pekat. Jika terjadi warna merah jingga sampai ungu menunjukkan adanya flavonoid; c) sebanyak  $\pm 50$  mg ekstrak dilarutkan dalam 3 ml aseton, ditambahkan 50 mg asam oksalat dan 50 mg asam borat, diaduk kemudian didiamkan hingga mengering. Lalu ditambahkan 3 ml dietil eter, diaduk kemudian didiamkan hingga mengering lalu dilihat di bawah sinar UV 366 nm akan berfluoresensi kuning kehijauan (Depkes RI, 1995; Harbone, 1987).

### 3.8.5 Terpenoid

Cara pengujian terpenoid dengan sebanyak  $\pm 100$  mg ekstrak kental diencerkan dengan 3 ml etil asetat, ditambahkan pereaksi Lieberman-Bouchard (campuran asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat (2:1)). Hasil positif ditandai oleh terbentuknya warna merah jingga atau violet biru (Depkes RI, 1995; Harbone, 1987).

## 3.9 Pengujian *In Vivo* Hambatan Karsinogenesis pada Kolon Mencit

### 3.9.1 Populasi dan Sampel

Populasi adalah mencit jantan Swiss Webster berusia 12 minggu dengan bobot rata-rata  $\pm 20$  gram yang diperoleh dari Labkesda. Sampel adalah kolon mencit populasi yang telah diinduksi AOM/DSS kemudian diberi larutan uji per hari selama 4 minggu.

### 3.9.2 Jumlah Sampel

Untuk menentukan jumlah ulangan pada masing-masing kelompok digunakan rumus Federer:  $(t-1)(n-1) \geq 15$ . Pada penelitian ini jumlah kelompok perlakuan adalah 9, maka jumlah ulangan pada masing-masing kelompok adalah sebagai berikut

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

t = jumlah kelompok perlakuan, dalam penelitian ini ada 9 kelompok.

n = jumlah ulangan pada masing-masing kelompok.

$$(9-1)(n-1) \geq 15$$

$$8n-8 \geq 15$$

$$8n \geq 23$$

$$n \geq 2,875$$

Berdasarkan perhitungan rumus di atas diperoleh  $n \geq 2,875$  sehingga jumlah ulangan minimum untuk masing-masing kelompok adalah 3 ekor. Dalam penelitian ini hewan coba yang digunakan akan ditingkatkan menjadi 6 ekor mencit tiap kelompok sehingga ada 54 ekor mencit Swiss-Webster jantan untuk mengantisipasi terjadinya *drop out* karena resiko kematian pada hewan coba tinggi. Hewan coba dibagi dalam 9 kelompok (masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor) dengan pembagian kelompok sebagai berikut: (dilihat pada Tabel 3.1)

**Tabel 3.1** Kelompok Perlakuan

<b>Kode</b>	<b>Kelompok</b>	<b>Perlakuan</b>
<b>(K<sub>norm</sub>)</b>	Kontrol normal	Kontrol tanpa terapi, mencit diinduksi dengan pelarut AOM yaitu NaCl 0,9% b/v secara i.p
<b>(K<sub>neg</sub>)</b>	Kontrol negatif	Mencit diinduksi AOM dan DSS (satu kali injeksi AOM dosis 10 mg/kg BB i.p dan larutan DSS 2% b/v setiap hari selama 1 minggu)
<b>(K<sub>asp</sub>)</b>	Kontrol positif	Mencit diberi AOM + DSS + suspensi asetosal dosis 150 mg/kg BB
<b>EK<sub>1</sub></b>	Ekstrak Biji Kedelai Dosis 1	diberi AOM + DSS + larutan ekstrak biji kedelai 75 mg/20gr BB
<b>EK<sub>2</sub></b>	Ekstrak Biji Kedelai Dosis 2	diberi AOM + DSS + larutan ekstrak biji kedelai 150 mg/20gr BB
<b>EK<sub>3</sub></b>	Ekstrak Biji Kedelai Dosis 3	diberi AOM + DSS + larutan ekstrak biji kedelai 200 mg/20gr BB
<b>EB<sub>1</sub></b>	Ekstrak Bungkil Kedelai Dosis 1	diberi AOM + DSS + larutan ekstrak bungkil kedelai 75 mg/20gr BB
<b>EB<sub>2</sub></b>	Ekstrak Bungkil Kedelai Dosis 2	diberi AOM + DSS + larutan ekstrak bungkil kedelai 150 mg/20gr BB
<b>EB<sub>3</sub></b>	Ekstrak Bungkil Kedelai Dosis 3	diberi AOM + DSS + larutan ekstrak bungkil kedelai 200 mg/20gr BB

### 3.9.3 Etika Penelitian

Sebelum memulai penelitian akan diajukan persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

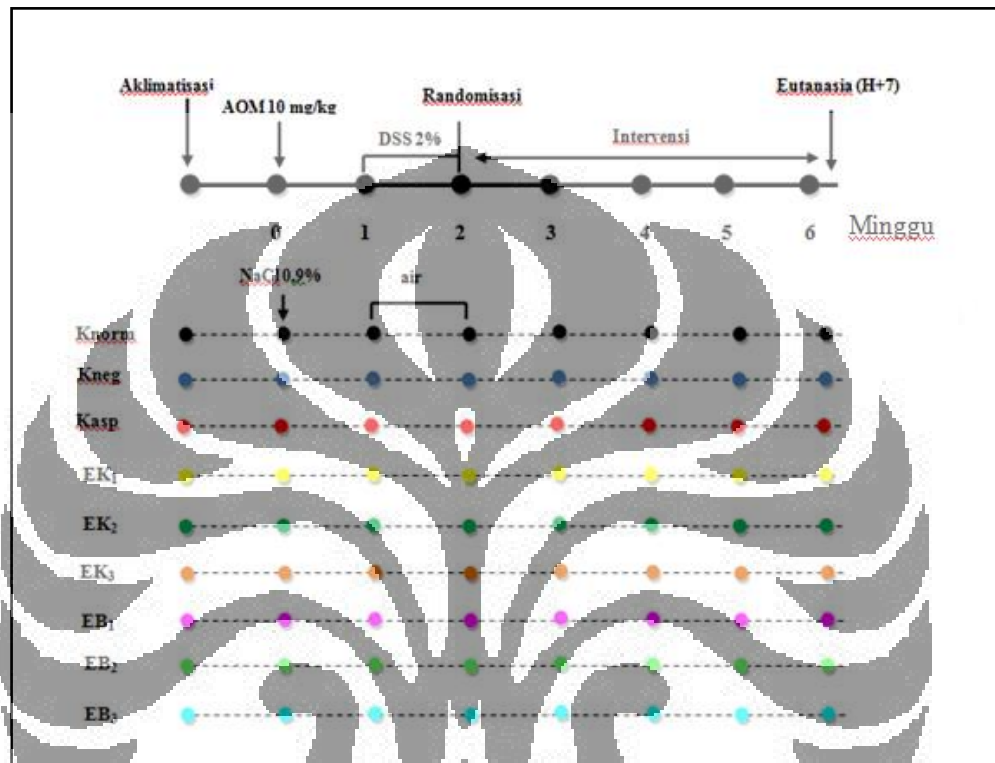
### 3.9.4 Cara Kerja

Mencit Swiss-Webster jantan berumur 12 minggu diberikan perlakuan di Laboratorium Patologi Eksperimental, Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia. Mencit diaklimatisasi terlebih dahulu satu minggu sebelum induksi dengan AOM. Hewan dipelihara dan diperlakukan sesuai *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* dari *Animal Care and Use Committee*. Mencit dipelihara pada kondisi temperatur terkontrol 25°C, kelembaban 55% dengan siklus 12 jam terang/gelap. Seluruh mencit diberi pakan standar dan minum air mineral *ad libitum*.

Komposisi pakan mencit yang digunakan terdiri dari jagung, kacang tanah, kacang hijau, dan kedelai. Semua bahan tersebut digiling, lalu ditambahkan susu SGM, vitamin B Complex, minyak ikan dan garam secukupnya. Selanjutnya ditambah tepung kanji dan air hingga menjadi adonan, kemudian digiling dengan mesin gilingan daging dan dioven pada suhu 70°C selama sehari.

Induksi karsinogenesis kolon dilakukan mengadopsi metode Kusmardi et al (2014): seluruh mencit diinduksi dengan AOM yang dilarutkan dalam 0,9% NaCl dengan dosis 10 mg/kg berat badan secara intra peritoneal di awal sebanyak satu kali (kecuali K<sub>norm</sub> diinduksi hanya dengan pelarut AOM). Satu minggu pasca induksi AOM, mencit diberi pakan standar dan minum yang mengandung DSS 2% setiap hari selama satu minggu. Pasca induksi AOM dan DSS selesai, seluruh hewan coba diacak (kecuali K<sub>norm</sub>) kemudian diletakkan dalam kandang tersendiri yang dijaga sedemikian rupa sehingga tidak saling berinteraksi. Setelah itu, kelompok uji diberikan larutan uji ekstrak biji dan bungkil kedelai dengan dosis 75 mg/20 grBB, 150 mg/20 grBB, dan 200 mg/20 grBB, setiap hari selama 4 minggu. Pada tahap akhir penelitian, mencit tiap kelompok dikorbankan dengan ketamin (sisakan satu mencit kelompok kontrol normal dan negatif untuk dilihat perkembangannya sampai tahap kanker). Kolon mencit diambil kemudian sisa kotoran dibersihkan dari lumen kolon dengan membilas dengan air. Potongan jaringan difiksasi menggunakan buffer formalin dan dilakukan

pewarnaan untuk melihat hambatan karsinogenesis kolon melalui pengamatan histopatologi terhadap parameter displasia, hiperplasia, dan mitosis serta pengamatan imunohistokimia terhadap parameter apoptosis. Alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.4.



Keterangan :  $K_{norm}$  = Kelompok normal;  $K_{neg}$  = Kelompok kontrol negatif (tanpa intervensi larutan uji);  $K_{asp}$  = Kelompok kontrol positif (kontrol dengan aspirin);  $EK_1$  = Kelompok uji ekstrak biji kedelai dosis 1 (75 mg/20grBB);  $EK_2$  = Kelompok uji ekstrak biji kedelai dosis 2 (150 mg/20grBB);  $EK_3$  = Kelompok uji ekstrak biji kedelai dosis 3 (200 mg/20grBB);  $EB_1$  = Kelompok uji ekstrak bungkil kedelai dosis 1 (75 mg/20grBB);  $EB_2$  = Kelompok uji ekstrak biji kedelai dosis 2 (150 mg/20grBB);  $EB_3$  = Kelompok uji ekstrak biji kedelai dosis 1 (200 mg/20grBB).

**Gambar 3.4** Alur penelitian hambatan karsinogenesis kolon mencit

### 3.9.5 Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin

Pewarnaan hematoksilin dan eosin yang digunakan merujuk pada penelitian Kusmardi et al (2014). Potongan jaringan kolon dibuat blok parafin. Blok parafin dibuat irisan setebal 4  $\mu\text{m}$  dan direkatkan pada gelas obyek untuk pewarnaan H&E dengan tahapan sebagai berikut. Sediaan dideparafinisasi dengan memakai xylol I, II, dan III, masing-masing selama 5 menit kemudian sediaan direhidrasi dengan memakai

alkohol absolut, 96%, dan 70% masing-masing selama 5 menit, dan dicuci di air mengalir selama 5 menit kemudian sediaan dimasukkan ke dalam hematoksilin selama 7 menit dan dibilas di air mengalir selama 10 menit. Setelah itu, sediaan dicelupkan ke dalam litium karbonat jenuh sebanyak 2-3 celup atau 1-2 menit direndam dan dibilas dengan air mengalir selama 5 menit. Sediaan dikontrol apakah warna birunya sudah cukup, jika belum dimasukkan kembali ke dalam hematoksilin selama 2 menit lalu dibilas di air mengalir, direndam dalam eosin selama 1-2 menit, didehidrasi dengan alkohol 70%, 80%, 96%, dan absolut masing-masing selama 3 menit selanjutnya *clearing* dengan xylol I, II, dan III, terakhir ditetesi dengan entelan dan ditutup dengan kaca penutup. Sediaan dilihat menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x.

### 3.9.6 Pewarnaan Imunohistokimia caspase-3

Pewarnaan imunohistokimia caspase-3 yang dilakukan merujuk pada penelitian Syahrin (2014). Jaringan pada blok parafin dipotong setebal 3 mikron dan diletakkan pada kaca benda yang telah dilapisi *poly-L-lysine* dan dilakukan preparasi sediaan dengan dilakukan pemanasan di atas *slide warmer* selama 60 menit dengan suhu 56,5 – 60 °C. Tahap selanjutnya adalah deparafinisasi dengan menggunakan xylol sebanyak 3 kali masing – masing selama 5 menit, kemudian dilanjutkan dengan penggunaan alkohol dengan konsentrasi menurun bertahap dimulai dari alkohol absolute konsentrasi 95% dan 80% masing – masing selama 5 menit. Setelah tahap rehidrasi selesai, dilakukan pencucian slide dengan air mengalir selama 5 menit, dilanjutkan dengan pencelupan ke dalam larutan endogen peroksidase 0,5% selama 30 menit, kemudian dibilas ulang dengan air mengalir selama 5 menit.

Setiap potongan jaringan dilakukan *antigen retrieval* selama 10 menit dalam sitrat buffer (pH 6) di dalam microwave, lalu didiamkan dalam suhu ruangan selama 30 menit kemudian dicuci menggunakan phosphate buffer saline (PBS) selama 10 menit, lalu inkubasi dengan blocking agent sniper selama 30 menit. Dilanjutkan inkubasi dengan antibody primer Caspaase-3 dengan pengenceran 100 kali telarut dalam serum dilakukan selama 1 jam dalam suhu ruangan, kemudian sediaan dicuci menggunakan PBS selama 10 menit. Dilanjutkan inkubasi antibodi sekunder Universal Link selama 15 menit, kemudian dicuci menggunakan PBS selama 10 menit diikuti dengan

Trekavidin-HRP selama 15 menit pada suhu ruangan. Langkah selanjutnya adalah pencucian ulang dengan PBS sebanyak 2x masing-masing selama 10 menit. Teteskan kromogen diamino benzydine (DAB) selama 20-30 detik, dilanjutkan dengan air mengalir. Dilakukan pencelupan ke dalam larutan Hematoxilin Lilie Mayer sebagai counterstrain selama 1-2 menit kemudian dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya dilakukan pencelupan dalam litium carbonat selama 1 menit, kemudian cuci dengan air mengalir. Langkah selanjutnya dilakukan dehidrasi dengan etanol dan clearing dengan xylol, terakhir ditutup dengan cairan penutup (aqueous mounting media).

### 3.9.7 Intepretasi Pengamatan Hispatologi

Pengamatan dilakukan pada 10 lapang pandang dengan pembesaran 400 x terhadap jaringan kolon mencit. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah sel yang mengalami mitosis, jumlah fokus displasia dan hiperplasia. Mitosis digambarkan dengan inti sel mengalami pembelahan. Hiperplasia digambarkan inti sel memanjang, agak padat, sel epitel selapis dan tersusun tidak teratur, sel goblet berkurang, dan polaritas masih terjaga. Displasia digambarkan inti sel membesar dan memanjang, lebih padat, pseudostrafikasi, sel goblet sedikit.

### 3.9.8 Intepretasi Hasil Ekspresi Caspase-3

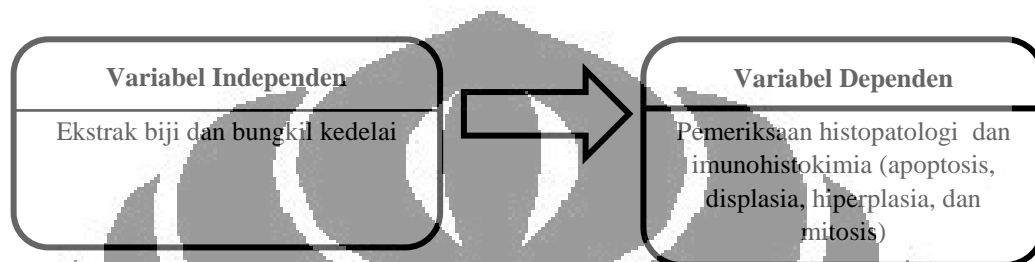
Penilaian hasil pulasan imunohistokimia caspase-3 dilakukan oleh dua orang pengamat, seluruh slide difoto menggunakan mikroskop cahaya dengan kamera. Foto diperoleh dengan pembesaran 400 kali. Setiap preparat diambil fotonya secara acak sebanyak 10 lapang pandang kemudian dipilih 5 foto secara acak dan dihitung jumlah sel total yang positif (berwarna cokelat) dan negatif (berwarna biru) dari kelima foto tersebut. Perhitungan dilakukan dengan bantuan aplikasi *Image J*. Sel yang menunjukkn positif pada inti dan/atau sitoplasma, ditandai dengan titik merah dan sel negatif ditandai dengan titik biru.

Perhitungan rerata jumlah sel dengan ekspresi caspase-3 pada 1000 sel epitel. Misalkan pada mencit yang diinduksi dengan AOM dan DSS, jumlah sel dengan ekspresi caspase-3 positif adalah 475, dan jumlah sel total pada 5 lapang pandang adalah 1250, maka pada setiap 1000 sel epitel, jumlah sel dengan ekspresi caspase-3 positif dapat dihitung dengan cara:  $1000/1250 \times 475 = 380$  sel



### 3.10 Identifikasi Variabel

Variabel Independen pada penelitian ini adalah ekstrak biji dan bungkil kedelai. Variabel Dependen pada penelitian ini adalah pemeriksaan histopatologi dengan parameter displasia, hiperplasia, dan mitosis, serta pemeriksaan imunohistokimia dengan parameter apoptosis. Skema hubungan antar variabel penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.5.



**Gambar 3.5** Skema hubungan antar variabel penelitian

### 3.11 Definisi Operasional

1. Ekstrak biji kedelai adalah ekstraksi biji kedelai grobogan yang sebelumnya telah dihilangkan minyaknya dengan pengepresan dan di maserasi dengan pelarut PBS. Selanjutnya dikuantifikasi konsentrasi lunasannya dengan metode HPLC. Ekstrak biji kedelai grobogan diberikan pada dosis rendah (75 mg/20gr BB), dosis sedang (150 mg/20gr BB), dan dosis tinggi (200 mg/20gr BB) (skala ukur ordinal).
2. Ekstrak bungkil kedelai adalah ekstraksi bungkil kedelai komersil yang telah dihilangkan minyaknya dan di maserasi dengan pelarut PBS. Selanjutnya dikuantifikasi konsentrasi lunasannya dengan metode HPLC. Ekstrak bungkil komersil diberikan pada dosis rendah (75 mg/20gr BB), dosis sedang (150 mg/20gr BB), dan dosis tinggi (200 mg/20gr BB) (skala ukur ordinal).
3. Apoptosis adalah sel yang mengalami apoptosis pada sel epitel kriptal, dinilai dengan mengkuantifikasi jumlah apoptosis per 5 lapang pandang yang diambil secara acak, dan dilihat dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x (skala ukur rasio).

4. Displasia adalah jumlah sel epitel kriptal yang mengalami displasia, dinilai dengan menghitung indeks displasia yaitu jumlah sel yang mengalami displasia per 10 lapang pandang yang diambil secara acak, dan dilihat dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x. Dengan ciri sel sebagai berikut inti sel memanjang dan membesar, agak padat, psedustratifikasi, sel goblet berkurang (skala ukur rasio).
5. Hiperplasia adalah jumlah sel epitel kriptal yang hiperplasia, dinilai berdasarkan pengamatan pada 10 lapang pandang dengan pembesaran 400x terhadap jaringan kolon mencit (skala ukur rasio).
6. Mitosis adalah jumlah sel epitel kriptal yang mengalami mitosis, dinilai dengan menghitung indeks mitosis sel yaitu jumlah sel yang mengalami mitosis per 10 lapang pandang yang diambil secara acak, dan dilihat dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x (skala ukur rasio).

### 3.12 Analisis Data

Analisis data penelitian dilakukan dengan menggunakan uji statistik SPSS versi 20. Perbedaan hasil berbagai pengukuran antara kelompok kontrol dengan kelompok uji, diuji dengan tingkat kemaknaan  $p < 0,05$  (*confidence interval*/CI = 95%).

Pengukuran objektif meliputi kuantifikasi jumlah sel yang mengalami displasia, hiperplasia, mitosis dan inflamasi. Hasil yang didapat berupa data numerik berskala rasio. Apabila distribusi data normal, maka analisis statistik dilakukan uji ANOVA satu arah yang dilanjutkan dengan uji Tukey. Sebelum dilakukan uji tersebut data ditentukan distribusinya dengan uji Kolmogorov-Smirnov dan homogenitas variannya dilakukan dengan uji Levene.

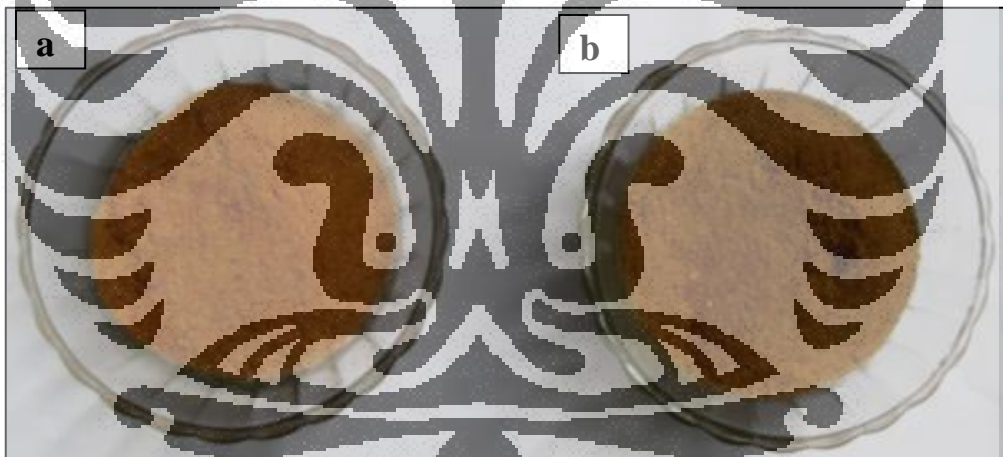
Bila distribusi data yang dihasilkan tidak normal, maka perlu dilakukan transformasi data sesuai monogram Altman tahun 1991 dengan logaritma atau cara lain sebelum dapat dilakukan uji hipotesis. Cara yang lain adalah mengubah variabel kontinyu menjadi variabel ordinal atau nominal, sehingga dapat dilakukan analisis non parametrik (Tumbelaka et al., 2011), yaitu uji Kruskal-Wallis.

## BAB 4

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Ekstraksi

Hasil ekstraksi dari biji dan bungkil kedelai masing-masing sebanyak 1,25 kg dengan pelarut PBS adalah ekstrak kering biji kedelai sebanyak 175 g dengan rendemennya 9,33% dan ekstrak kering bungkil kedelai sebanyak 230 g dengan rendemennya 18,4%. Ekstrak biji kedelai memiliki karakteristik warna coklat kekuningan terang, bau aromatis, dan rasanya asin. Ekstrak bungkil kedelai memiliki karakteristik warna coklat kekuningan gelap, bau aromatis, dan rasanya asin. Ekstrak ini bersifat sangat higroskopis, sehingga harus disimpan dalam wadah tertutup dan terhindar dari cahaya matahari langsung. Hasil ekstrak kering biji kedelai dan bungkil kedelai dapat dilihat pada gambar 4.1



**Gambar 4.1** Hasil ekstrak kering biji kedelai (a) dan bungkil kedelai (b)

#### 4.2 Pengujian Sisa Pelarut

Pengujian sisa pelarut PBS yang terkandung di dalam ekstrak kering biji dan bungkil kedelai dilakukan dengan metode HPLC.

**Tabel 4.1** Sisa pelarut fosfat dalam ekstrak PBS biji dan bungkil kedelai

Parameter	Ekstrak	Hasil	Satuan
Fosfat Terlarut	Biji Kedelai	2,52	% b/b
	Bungkil Kedelai	4,17	% b/b

Pada penelitian ini pelarut yang digunakan adalah *Phospat Buffer Saline* (PBS). Pengujian sisa pelarut fosfat bertujuan untuk memastikan jumlah sisa pelarut fosfat yang masih ada dalam ekstrak. Tabel 4.1 menunjukkan bahwa sisa pelarut fosfat ekstrak biji kedelai lebih rendah bila dibandingkan dengan ekstrak bungkil kedelai. Ekstrak biji kedelai mengandung sisa pelarut fosfat sebanyak 2,52 %b/b artinya terdapat 2,52 mg dalam 100 mg sampel. Sedangkan ekstrak bungkil kedelai mengandung sisa pelarut fosfat sebanyak 4,17 %b/b artinya terdapat 4,17 mg dalam 100 mg sampel. Untuk dosis tertinggi pemberian ekstrak PBS kedelai grobogan dan bungkil komersil di hewan coba adalah 200 mg /kg BB. Jika berat badan mencit  $\pm$  20 g, dapat diasumsikan diperlukan sebanyak 200 mg/kg BB x 0,02 kg = 4 mg (untuk mencit 20 g). Dengan mengambil faktor konversi dari mencit ke manusia sebesar 387,9 (Lawrence & Bacharach, 1964). Dosis untuk manusia adalah 4 mg x 387,9 = 1.551,6 mg (untuk manusia 70 kg). Asumsi sisa pelarut fosfat pada dosis manusia diasumsikan untuk 1.551,6 mg mengandung 64,7 mg fosfat. Berdasarkan toleransi tingkat asupan fosfat untuk manusia adalah 4000 mg / hari (Food and Nutrition Board, 1997). Dapat disimpulkan bahwa kandungan sisa pelarut fosfat dalam ekstrak biji dan bungkil kedelai dalam batas aman untuk dikonsumsi pada manusia.

### 4.3. Parameter Biji Kedelai

Simplisia sebagai produk hasil pertanian atau pengumpulan tumbuhan liar (*wild crop*) tentu saja tidak dapat dijamin selalu ajeg (konstan) kandungan kimianya karena disadari adanya variable bibit, tempat tumbuh, iklim, kondisi (umur dan cara) panen, serta proses pasca panen dan preparasi akhir. Standarisasi simplisia mempunyai pengertian bahwa simplisia yang digunakan untuk obat sebagai bahan baku harus memenuhi persyaratan monografi terbitan resmi Departemen Kesehatan (Materia Medika Indonesia) (Depkes RI, 2000). Tabel 4.2 menunjukkan parameter simplisia biji kedelai varietas grobogan.

**Tabel 4.2** Parameter biji kedelai varietas grobogan

Sampel	Identifikasi & keadaan sampel	Parameter	Hasil	Satuan	Teknik Analisis
Biji Kedelai	Serbuk-Padatan	Kadar Air	8.87	%	Gravimetri
		Kadar Abu	4.89	%	Gravimetri
		Kadar Sari Larut Air	20.48	%	Gravimetri
		Kadar Sari Larut Etanol	13.43	%	Gravimetri

Kadar air pada biji kedelai adalah 8,87 %, jika dibandingkan dengan kadar air pada sertifikat benih dari Balitkabi yang bernilai 8,8 %; nilai tersebut sudah sesuai. Kadar abu biji kedelai adalah 4,89 %; nilai tersebut sesuai dengan standar SNI. Tabel 4.2 menunjukkan bahwa biji kedelai lebih larut dalam air daripada dengan etanol.

### 4.4. Parameter Ekstrak Biji dan Bungkil Kedelai

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI, 2000).

Terpenuhinya standar mutu produk / bahan ekstrak tidak terlepas dari pengendalian proses, artinya bahwa proses yang terstandar dapat menjamin produk terstandar (Depkes RI, 2000). Tabel 4.3 menunjukkan parameter ekstrak PBS untuk biji dan bungkil kedelai.

**Tabel 4.3** Parameter ekstrak biji dan bungkil kedelai

Sampel	Identifikasi & keadaan sampel	Parameter	Hasil	Satuan	Teknik Analisis
Ekstrak PBS Biji	Ekstrak-Padatan	Kadar Air	8.16	%	Gravimetri
		Kadar Abu Total	4.52	%	Gravimetri
		Kadar Abu Tak Larut Asam	0.13	%	Gravimetri
		TPC	negatif	%	Cawan Tuang
		Koliform	negatif	%	Cawan Tuang
		Kapang/Khamir	negatif		Cawan Tuang
		Pb	0.056	ppm	AAS
		Cd	Ttd	ppm	AAS
		As	Ttd	ppm	AAS
		Ekstrak PBS Bungkil	Ekstrak-Padatan	Kadar Air	7.34
Kadar Abu Total	29.01			%	Gravimetri
Kadar Abu Tak Larut Asam	0.08			%	Gravimetri
TPC	negatif			%	Cawan Tuang
Koliform	negatif			%	Cawan Tuang
Kapang/Khamir	negatif				Cawan Tuang
Pb	0.079			ppm	AAS
Cd	Ttd			ppm	AAS
As	Ttd			ppm	AAS

Pengukuran kadar air dilakukan untuk mengetahui kandungan air pada ekstrak biji dan bungkil kedelai dengan metode gravimetri. Tabel 4.3 menunjukkan kadar air pada ekstrak PBS biji dan bungkil kedelai berturut-turut adalah 8,16 % dan 7,34% . Hasil tersebut menunjukkan bahwa kadar air pada

kedua ekstrak masih dalam batas normal, karena batas maksimal kadar air dalam suatu sediaan  $\leq 10\%$  (BPOM RI, 2014).

Pengukuran kadar abu bertujuan untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak. Pengukuran dilakukan dengan memanaskan bahan hingga temperatur tertentu dimana senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap, sehingga tinggal unsur mineral dan anorganik. Pengukuran ini terkait dengan kemurnian dan kontaminasi bahan yang diperiksa (Departemen Kesehatan RI, 2000). Pemeriksaan kadar abu total dan kadar abu tak larut asam pada ekstrak biji dan bungkil kedelai dengan metode gravimetri. Tabel 4.3 menunjukkan kadar abu total dan kadar abu tak larut asam pada ekstrak PBS biji kedelai adalah 4.52% dan 0.13%, sedangkan bungkil kedelai adalah 29.01% dan 0.08%.

Pengujian Angka Lempeng Total (ALT) adalah uji yang menunjukkan pertumbuhan koloni bakteri aerob mesofil setelah cuplikan dinokulasikan pada media lempeng agar dengan cara tuang dan diinkubasi pada suhu yang sesuai. Uji ini bertujuan untuk memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak boleh mengandung mikroba patogen dan tidak mengandung mikroba non patogen melebihi batas yang ditetapkan karena berpengaruh pada stabilitas ekstrak dan bahaya (toksik) bagi kesehatan (Departemen Kesehatan RI, 2000). Pengujian ALT pada ekstrak biji dan bungkil kedelai dengan metode cawan tuang. Tabel 4.3 menunjukkan ALT pada ekstrak PBS biji dan bungkil kedelai adalah negatif, artinya tidak ditemukan adanya koloni yang tumbuh pada media setelah dilakukan inkubasi.

Bakteri koliform adalah bakteri intestinal yang keberadaannya menunjukkan adanya cemaran dalam bahan yang diuji. Adanya bakteri ini berkorelasi positif dengan keberadaan bakteri patogen lain yang berbahaya bagi kesehatan. Pada uji ini dilakukan pengamatan pertumbuhan bakteri koliform setelah cuplikan diinokulasikan pada media cair yang sesuai, dan pengamatan ada tidaknya reaksi fermentasi dan pembentukan gas di dalam tabung Durham. (Departemen Kesehatan RI, 2000). Pengujian koliform pada ekstrak biji dan bungkil kedelai dengan metode cawan tuang. Tabel 4.3 menunjukkan hasil uji koliform pada ekstrak PBS biji dan bungkil kedelai adalah negatif, artinya tidak terbentuk gas dalam tabung Durham.

Uji penetapan angka kapang / khamir bertujuan untuk memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak mengandung cemaran jamur melebihi batas yang ditetapkan karena berpengaruh pada stabilitas ekstrak dan aflatoksin yang berbahaya bagi kesehatan (Departemen Kesehatan RI, 2000). Pengujian kapang / khamir pada ekstrak biji dan bungkil kedelai dengan metode cawan tuang. Tabel 4.3 menunjukkan hasil uji kapang / khamir pada ekstrak PBS biji dan bungkil kedelai adalah negatif, artinya setelah periode inkubasi tidak ditemukan adanya koloni jamur dan atau koloni ragi pada media yang digunakan.

Uji cemaran logam berat bertujuan untuk memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak mengandung logam berat tertentu, dalam hal ini timbal (Pb), cadmium (Cd) dan arsen (As). Tabel 4.3 menunjukkan kandungan timbal (Pb) pada ekstrak biji dan bungkil kedelai berturut-turut adalah 0,056 ppm dan 0,079 ppm. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kadar timbal (Pb) pada kedua ekstrak masih dalam batas normal, karena batas maksimal kadar timbal (Pb) dalam suatu sediaan  $\leq 10$  mg/kg atau mg/L atau ppm (BPOM RI, 2014). Pada uji cadmium (Cd) dan arsen (As) kedua ekstrak bernilai negatif artinya tidak terdeteksi adanya kandungan kedua logam tersebut. Batas maksimum cemaran cadmium (Cd) adalah  $\leq 0,3$  mg/kg atau mg/L atau ppm, sedangkan untuk arsen (As) adalah  $\leq 5$  mg/kg atau mg/L atau ppm (BPOM RI, 2014).

#### **4.5. Kandungan Lunasin dalam Ekstrak Biji dan Bungkil Kedelai**

Lunasin merupakan senyawa aktif yang menjadi bio marker pada penelitian ini. Tabel 4.4 menunjukkan kandungan lunasin pada ekstrak biji dan bungkil kedelai



**Tabel 4.4** Kandungan lunasin pada ekstrak biji dan bungkil kedelai

Sampel	Identifikasi & keadaan sampel	Parameter	Hasil	Satuan	Teknik Analisis
Biji Kedelai	Serbuk-Padatan	Lunasin	0.808	mg/g	HPLC
Bungkil Kedelai	Serbuk-Padatan	Lunasin	0.646	mg/g	HPLC
			0.599	mg/g	HPLC

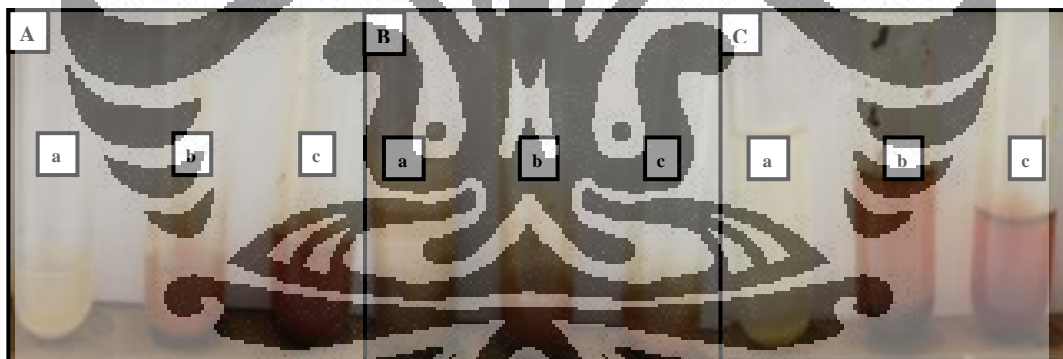
Dari hasil dua kali ulangan menunjukkan bahwa kandungan lunasin pada ekstrak biji kedelai lebih besar nilainya dari kandungan lunasin pada ekstrak bungkil kedelai, berturut-turut nilainya adalah 0.808 mg/g dan 0.838 mg/g. Hal ini terjadi karena biji kedelai varietas grobogan memiliki kandungan protein yang tinggi mencapai 43.9 %. Lunasin sendiri berasal dari turunan asam amino, sehingga jika kandungan protein dalam biji kedelai tinggi, kadar lunasinnya juga tinggi.

#### 4.6 Skrining Fitokimia Ekstrak Biji dan Bungkil Kedelai

Pendekatan skrining fitokimia meliputi analisis kualitatif kandungan kimia dalam tumbuhan atau bagian tumbuhan (akar, batang, daun, bunga, buah, biji), terutama kandungan metabolit sekunder yang bioaktif, yaitu alkaloid, antrakinon, flavonoid, glikosida jantung, kumarin, saponin (steroid dan triterpenoid), tanin (polifenolat), minyak atsiri (terpenoid), iridoid, dan sebagainya. Adapun tujuan utama dari pendekatan skrining fitokimia adalah untuk mensurvei tumbuhan untuk mendapatkan kandungan bioaktif atau kandungan yang berguna untuk pengobatan (Depkes RI, 1995). Skrining fitokimia yang dilakukan pada ekstrak biji dan bungkil kedelai menggunakan uji reaksi kimia (lihat Tabel 4.5). Gambar 4.2 sampai Gambar 4.4 merupakan hasil skrining fitokimia pada ekstrak biji dan bungkil kedelai.

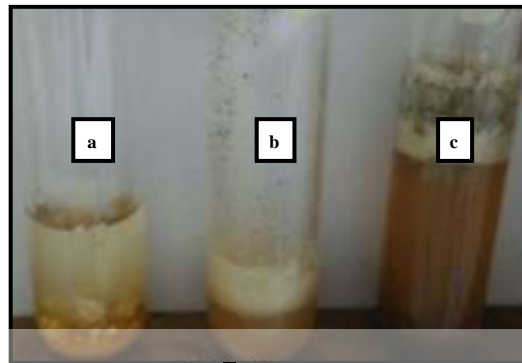
**Tabel 4.5** Hasil skrining fitokimia ekstrak kedelai dan bungkil kedelai

Uji Fitokimia	Pereaksi	Ekstrak kedelai		Ekstrak bungkil	
		Hasil	Kesimpulan	Hasil	Kesimpulan
Alkaloid	Mayer	Tidak terbentuk endapan putih	-	Tidak terbentuk endapan putih	-
	Bouchardard	Tidak terbentuk endapan coklat	-	Tidak terbentuk endapan coklat	-
	Dragendorf	Tidak terbentuk endapan merah	-	Tidak terbentuk endapan merah	-
Flavonoid	Mg + HCl p	Terbentuk warna jingga	+	Terbentuk warna jingga kecoklatan	+
Saponin	Air + HCl	Terbentuk busa stabil	+	Terbentuk busa stabil	+
Steroid/Terpenoid	Liebermann-burchard	Tidak terbentuk warna merah	-	Tidak terbentuk warna merah	-
Polifenol/Tanin	FeCl <sub>3</sub>	Terbentuk warna hijau	+	Terbentuk warna hijau kehitaman	+



Keterangan: Hasil uji skrining fitokimia alkaloid ekstrak kedelai (A), ekstrak bungkil kedelai komersil (B) vs standar ekstrak piperin (C) dengan pereaksi meyer (a), dragendorf (b), dan bouchardard (c).

**Gambar 4.2** Hasil skrining fitokimia alkaloid



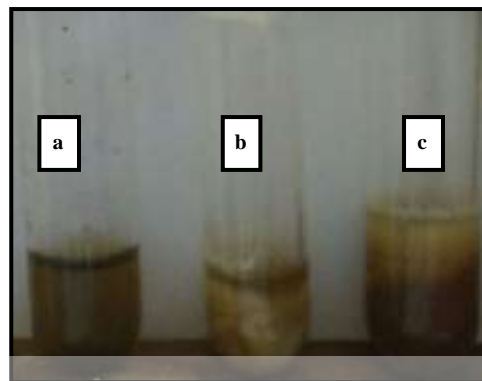
Keterangan: Hasil uji skrining fitokimia flavonoid ekstrak kedelai (a), ekstrak bungkil kedelai komersil (b) vs standar ekstrak psidii folium (c) dengan pereaksi logam Mg + HCl P

**Gambar 4.3** Hasil skrining fitokimia flavonoid



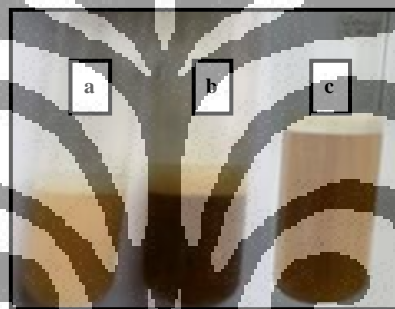
Keterangan: Hasil uji skrining fitokimia steroid/terpenoid ekstrak kedelai (a), ekstrak bungkil kedelai komersil (b) vs standar ekstrak pare (c) dengan pereaksi liebermann-burchard.

**Gambar 4.4** Hasil skrining fitokimia steroid/terpenoid



Keterangan: Hasil uji skrining fitokimia polifenol standar ekstrak daun jambu biji (a), ekstrak kedelai (b) vs ekstrak bungkil kedelai komersil (c) dengan pereaksi  $\text{FeCl}_3$

**Gambar 4.5** Hasil skrining fitokimia polifenol/tanin



Keterangan: Hasil uji skrining fitokimia saponin ekstrak kedelai (a), ekstrak bungkil kedelai komersil (b) vs standar ekstrak pare (c) dikocok kuat dengan pereaksi air + HCl.

**Gambar 4.6** Hasil skrining fitokimia saponin

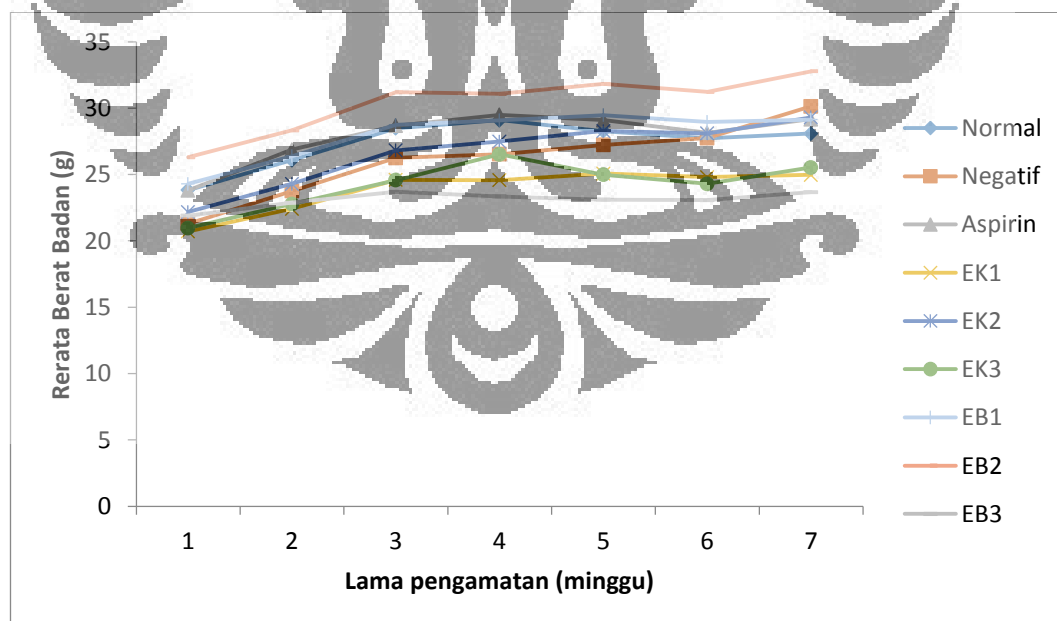
Tabel 4.5 menunjukkan hasil bahwa ekstrak PBS biji dan bungkil kedelai menunjukkan adanya senyawa flavonoid, saponin, dan tanin. Penelitian Okwu dan Orji (2007), kandungan fitokimia pada kedelai antara lain flavonoid (3.84 mg/100g), saponin (0.17 mg/ 100g) dan tanin (0.46 mg/ 100g).

Flavonoid merupakan salah satu senyawa yang ditemukan di biji kedelai, dengan golongan lainnya meliputi flavanol, flavanon, flavon, dan antosianin. Selain sebagai penangkal radikal bebas, flavonoid memiliki beberapa fungsi biologi lain seperti vasodilator, anti-karsinogenik, anti-inflamasi, anti-bakteri, stimulant imun, anti-alergi, anti-virus, dan efek estrogenik, serta menjadi inhibitor

fosfolipase A2, siklooksigenase, lipoxigenase, glutathione reduktase dan xanthine oxidase (Kandaswami & Middleton, 1998; Middleton & Kandaswami, 1992; Waladkhani & Clemens, 2001; Okwu & Omodamiro, 2005). Bukti epidemiologi dan eksperimental menunjukkan bahwa konsumsi kedelai dikaitkan dengan penurunan resiko kanker. Efek anti kanker dari kedelai dimungkinkan karena kandungan isoflavonnya yang tinggi (Iwe, 2003). Kandungan isoflavon pada kedelai, selain dapat menjaga kesehatan, juga dapat mencegah penyakit kronis tertentu seperti penyakit kardiovaskuler, kanker, diabetes, penyakit autoimun, arthritis, dan aritmia (Shahidi, 2002).

#### 4.7 Efek Pemberian Ekstrak Biji dan Bungkil Kedelai Terhadap Berat Badan Mencit yang Diinduksi AOM dan DSS

Efek pemberian ekstrak biji dan bungkil kedelai terhadap berat badan mencit tercantum pada Gambar 4.7. Dari gambar tersebut terlihat berat badan mencit pada semua kelompok perlakuan mengalami peningkatan berat badan, yang berarti bahwa pemberian ekstrak biji dan bungkil kedelai menyebabkan peningkatan berat badan mencit.



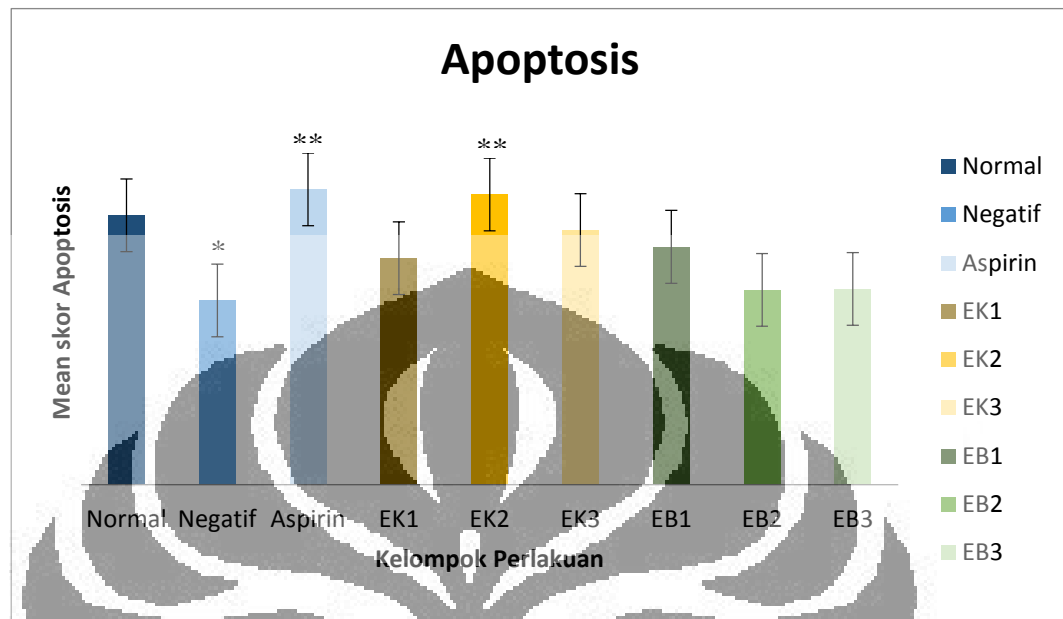
Gambar 4.7 Rerata Berat Badan Mencit

Biji kedelai mengandung 40% protein dan sekitar 20% lemak, sedangkan bungkil kedelai mengandung protein lebih tinggi sekitar 40 - 49%. Protein yang terkandung pada kedelai antara lain berupa arginin, sistin, histidin, isoleusin, leusin, lisin, metionin, fenilalanin, theonin, triptofan, dan valin (Poultry Feeding Standarts, 2005).

Kedelai mengandung isoflavon, senyawa yang memiliki aktivitas biokimia termasuk sebagai pengobatan untuk penyakit kronis. Studi pada manusia dan hewan telah menunjukkan bahwa konsumsi kedelai atau produk kedelai dapat terlindung dari penyakit jantung, kanker, obesitas, dan diabetes (Bhathena & Velasquez, 2002). Kemampuan isoflavon untuk mencegah penyakit ini tergantung pada penyerapan, metabolisme, dan distribusinya pada jaringan target serta bioavailabilitasnya. Dalam sebuah penelitian diet kedelai yang mengandung isoflavon dapat meningkatkan berat badan dan presentase lemak, serta meningkatkan konsentrasi serum IGF-1 dan interleukin-6 (Li, Li, Yan, Yuan, Zhang, et al. 2011)

Ekstrak biji dan bungkil kedelai yang diberikan pada kelompok perlakuan mengandung lunasin. Kandungan lunasin pada ekstrak biji kedelai (EK) (0,338 mg/g) lebih tinggi daripada kandungan lunasin di ekstrak bungkil (EB) (0,646 mg/g). Lunasin merupakan 43 peptida asam amino yang mengandung karboksil dengan akhiran 9 residu aspartat (D), pola adhesi sel arginin-glisin-aspartat (RGD), dan heliks yang diprediksi dengan struktur yang homolog pada wilayah konservasi kromatin binding protein (Galvez, Chen, Macasieb, Lumen, 2001). Pada beberapa penelitian, lunasin menunjukkan efek antioksidan, anti-inflamasi, antikanker, dan mengatur biosintesis kolesterol dalam tubuh (Lule, Garg, Pophaly, Hitesh, & Tomar, 2015). Dengan demikian, data ini menunjukkan bahwa terdapat peran ekstrak biji dan bungkil kedelai dalam meningkatkan berat badan mencit yang mengalami rangsangan untuk proses karsinogenesis.

#### 4.8 Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji dan Bungkil Kedelai Terhadap Terjadinya Apoptosis



Keterangan: \* $p < 0.05$  dibandingkan kelompok normal, \*\* $p < 0.05$  dibandingkan kelompok negatif

**Gambar 4.8** Grafik rerata skor apoptosis pada sel epitel kriptal kelompok perlakuan ( $p = 0.001$ )

Hasil uji anova yang digunakan untuk melihat adanya perbedaan jumlah apoptosis antar kelompok menunjukkan hasil berbeda bermakna dengan nilai  $p$  adalah 0.001. Gambar 4.8 menunjukkan bahwa terjadi peningkatan skor apoptosis pada kelompok yang diberi ekstrak biji kedelai (EK) dengan nilai peningkatan terbaik ditunjukkan oleh EK<sub>2</sub> (150 mg/ 20gr BB). Uji lebih lanjut dengan *multiple comparison* Turkey menunjukkan terjadi perbedaan bermakna antara aspirin dengan kontrol negatif ( $p=0.006$ ) dan EK<sub>2</sub> (150 mg/ 20gr BB) dengan kontrol negatif ( $p=0.009$ ). Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak biji kedelai dosis 150 mg memiliki kemampuan yang hampir sama dengan kontrol positifnya (aspirin) dalam peningkatan skor apoptosis.



Keterangan: Ekstrak biji dan bungkil kedelai meningkatkan ekspresi caspase-3 yang merupakan indikator terjadinya apoptosis. Kuantifikasi rerata nilai apoptosis menggunakan aplikasi Image J. Indeks apoptosis ditunjukkan dengan mean  $\pm$  SD,  $p < 0,05$ ; a (normal), b (negatif), c (aspirin), d (EK1 75mg/20 grBB), e (EK2 150mg/20 grBB), f (EK3 200mg/20 grBB), g (EB1 75mg/20 grBB), h (EB2 150mg/20 grBB), i (EB3 200mg/20 grBB)

**Gambar 4.9** Gambaran imunohistokimia caspase-3 (pembesaran 400x)

Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah aspirin. Gambar 4.8 menunjukkan aspirin dapat meningkatkan apoptosis ( $p < 0.05$ ). Aspirin yang digunakan dalam jangka panjang dengan dosis rendah telah terbukti pada beberapa studi kasus, studi kohort, dan uji kontrol acak dalam menghambat kejadian kanker kolorektal. Mekanisme kemoprevensi dari aspirin melalui penghambatan siklooksigenase (COX) atau mekanisme independen COX misalnya jalur PIK3CA, terapi yang diinduksi penuaan / kematian sel kanker (Ranger, 2016).



Ekstrak biji dan bungkil kedelai dalam penelitian ini mengandung lunasin. Aluko (2012) menyatakan lunasin telah terbukti memiliki efek antikanker yang kuat melalui penghambatan asetilasi histon dan efek antiinflamasi melalui supresi NF-kB. Lunasin selektif membunuh sel-sel yang berubah dengan mengganggu dinamika asetilasi-deasetilasi histon saat transformasi terjadi. Protein Rb supresor tumor berinteraksi dengan promotor E2F dan HDAC menjaga histon inti dalam keadaan deasetilasi. Inaktivasi Rb oleh onkoprotein E1A memisahkan kompleks Rb-HDAC dan membuat histon inti mengalami asetilasi oleh *histone acetyltransferase* (HATs). Lunasin dapat bersaing dengan HATs untuk berikatan dengan deasetilasi histon inti dalam menghentikan transkripsi dan membuat sel apoptosis. Ketika terjadi perubahan sel menjadi abnormal yang membuat supresor tumor p53 dilemahkan, lunasin mengambil alih sebagai supresor tumor pengganti dan selektif membunuh sel yang berubah (Hernández-Ledesma & de Lumen, 2008).

Lunasin telah menunjukkan sitotoksik pada empat *cell line* kanker usus besar manusia KM12L4, RKO, HCT-116, dan HT 29 dengan nilai IC50 berturut-turut 13.0  $\mu$ M, 21.6  $\mu$ M, 26.3  $\mu$ M dan 61.7  $\mu$ M (Dia & de Mejia, 2011). Nilai tersebut menunjukkan bahwa lunasin paling poten membunuh sel kanker usus besar KM12L4 yang bermetastasis dibandingkan *cell line* yang lain. Selain itu, lunasin mampu menyebabkan efek sitotoksik pada resistensi oxaliplatin di beberapa kanker usus besar (Dia & de Mejia, 2011). Studi tentang mekanisme peptida ini mengungkapkan bahwa lunasin dapat menahan fase G2/M siklus sel dan menginduksi apoptosis jalur mitokondria. Tertahannya siklus sel disebabkan seiring bertambahnya ekspresi protein p21 pada sel kanker usus besar HT 29, sedangkan ekspresi protein p21 dan p27 diatur oleh lunasin dalam pengobatan sel kanker usus besar KM12L4 (Dia & de Mejia, 2011; Dia & de Mejia, 2010).

Selain itu lunasin menurunkan ratio Bcl2 dengan Bax melalui peningkatan ekspresi Bax pro-apoptosis dan penurunan ekspresi Bcl2 anti-apoptosis, juga peningkatan aktivitas caspase-3 (Dia & de Mejia, 2010). Hal tersebut dikaitkan dengan peningkatan ekspresi pro-apoptosis dari klusterin yang berefek positif peningkatan ekspresi p21 di inti sel. Lunasin mengakibatkan translokasi Bax ke dalam membrane mitokondria yang mengakibatkan pelepasan sitokrom c dan

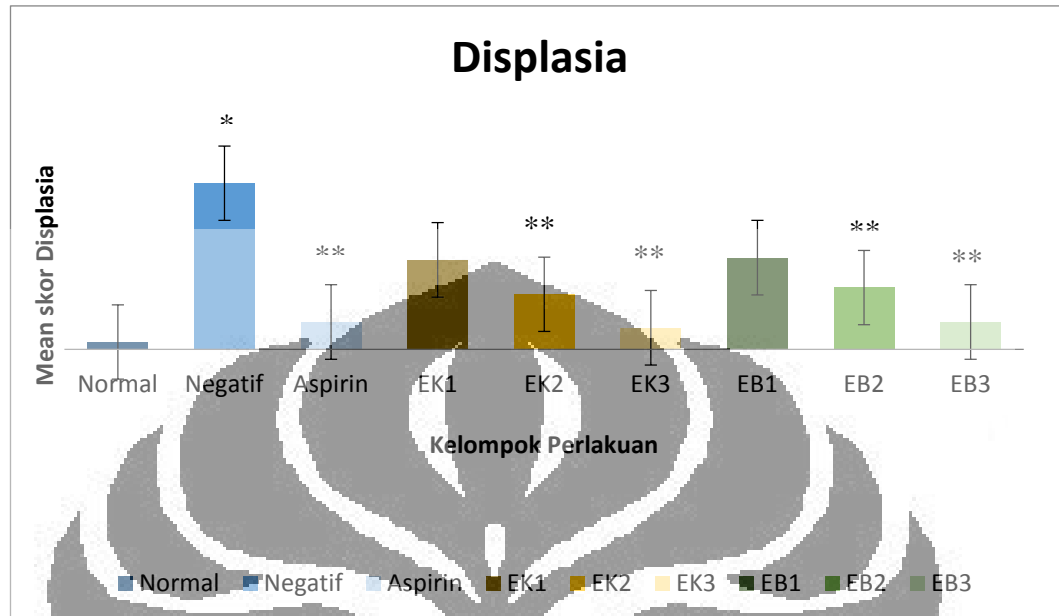
peningkatan ekspresi sitosol sitokrom c dalam sel KM12L4. Hal tersebut menunjukkan bahwa lunasin memicu peningkatan aktivitas caspase-9 dan caspase-3 di kedua sel HT-29 dan KM12L4 (Dia & de Mejia, 2010).

Hasil skrining fitokimia pada ekstrak biji dan bungkil kedelai pada penelitian ini menunjukkan positif flavonoid. Isoflavon merupakan komponen dari flavonoid dipercaya memiliki efek antikanker. Konsumsi isoflavon terutama kedelai dan produknya pada populasi orang Asia dalam studi control secara bermakna dikaitkan dengan penurunan risiko kanker kolorektal (Yu, Jing, Li, Zhao, dan Wang, 2016). Penelitian *in vitro*, isoflavon telah terbukti memiliki sifat anti kanker seperti penghambat fosforilasi protein tirosin, induksi apoptosis, antiangiogenesis, dan penghambat topoisomerisasi DNA. Penelitian *in vivo*, kedelai dan isoflavon secara konsisten menunjukkan hambatan dalam pembentukan *aberrant crypt foci* (Toyomura dan Kono, 2002).

Epidemiologi dan studi pada hewan telah menunjukkan bahwa konsumsi kedelai mengurangi timbulnya tumor tertentu, termasuk usus besar dan rectum. Tiga aglikon utama isoflavon yang berperan dalam mekanisme tersebut adalah genistein, daidzen dan glycitein. Konsumsi isoflavon meningkatkan ekspresi estrogen reseptor  $\beta$  (ER- $\beta$ ), namun menurunkan ekspresi estrogen reseptor  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) pada kolon tikus betina (Yu, Jing, Li, Zhao, dan Wang, 2016).

Genistein, salah satu isoflavon yang dominan pada kedelai telah terbukti dapat menghambat pertumbuhan sel kanker melalui modulasi gen yang terkait kontrol homeostasis dari siklus sel dan apoptosis. Genistein menghambat aktivasi *nuclear transcription factor*, NF- $\kappa$ B dan jalur signal Akt, keduanya menjaga keseimbangan antara sel yang hidup dan kematian sel terprogram (apoptosis). Genistein memiliki antioksidan yang dikenal dengan fitoestrogen, yang memiliki target estrogen dan androgen dimediasi jalur signal pada proses karsinogenesis. Selain itu, genistein merupakan inhibitor yang ampuh untuk angiogenesis dan metastasis. Genistein, baik secara *in vivo* dan *in vitro* menunjukkan hasil yang menjajikan untuk kemoprevensi dan pengobatan kanker (Sarkar & Li, 2002).

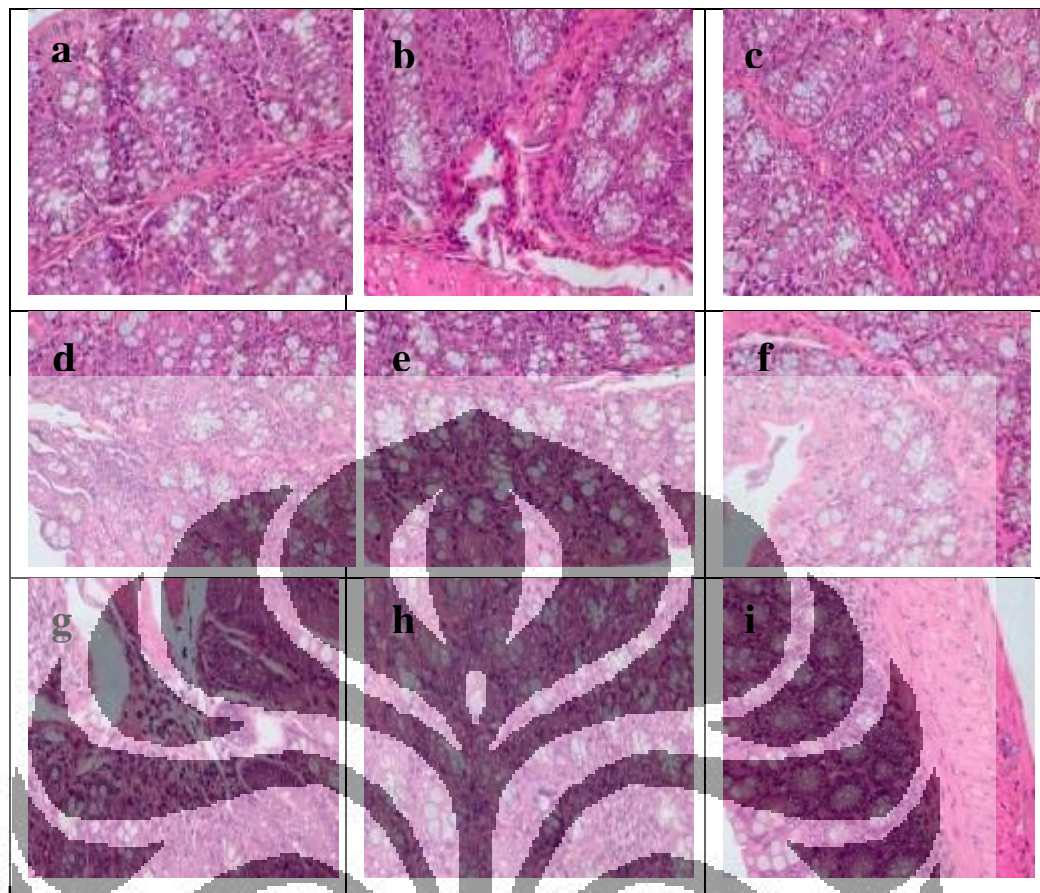
#### 4.9 Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji dan Bungkil Kedelai Terhadap Terjadinya Displasia



Keterangan: \* $p < 0.05$  dibandingkan kelompok normal, \*\* $p < 0.05$  dibandingkan kelompok negatif

**Gambar 4.10** Grafik rerata skor displasia pada sel epitel kriptal kelompok perlakuan ( $p = 0.024$ )

Dari hasil anova menunjukkan berbeda bermakna antara pemberian ekstrak biji dan bungkil kedelai terhadap angka kejadian displasia ( $p = 0.024$ ). Gambar 4.10 menunjukkan bahwa pemberian ekstrak biji dan bungkil kedelai dapat menurunkan skor displasia dengan nilai LSD berturut-turut: EK2 ( $p=0.013$ ); EK3 ( $p=0.002$ ), EB2 ( $p=0.018$ ), dan EB3 ( $p=0.003$ ). Sedangkan untuk kontrol positifnya (aspirin) juga berbeda bermakna dengan kontrol negatifnya ( $p=0.003$ ). Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak biji dan bungkil kedelai dosis 200 mg memiliki kemampuan yang sebanding dengan aspirin dalam menurunkan skor displasia.



Keterangan: Ekstrak biji dan bungkil kedelai menurunkan displasia. Indeks displasia ditunjukkan dengan mean  $\pm$  SD,  $p < 0,05$ ; a (normal), b (negatif), c (aspirin), d (EK1 75mg/20 grBB), e (EK2 150mg/20 grBB), f (EK3 200mg/20 grBB), g (EB1 75mg/20 grBB), h (EB2 150mg/20 grBB), i (EB3 200mg/20 grBB)

**Gambar 4.11** Gambaran HE displasia (pembesaran 400x)

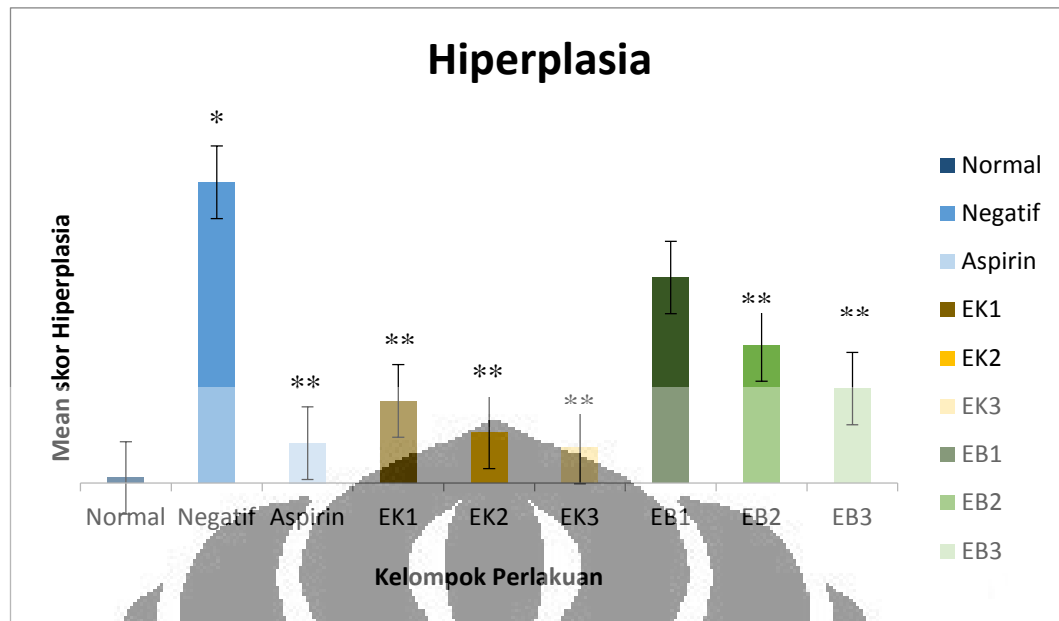
Sebuah studi tentang efek diet suplementasi dengan konsentrat protein kedelai yang mengandung isoflavon atau *soy protein concentrate* (SPC) pada peradangan usus dan karsinogenesis pada mencit jantan CF-1 yang dilakukan selama 10 minggu dan 20 minggu. Pada pra perlakuan, mencit diinduksi azoxymethane (10 mg/ kg BB). Satu minggu setelahnya, mencit diberi *dextran sodium sulfate* (DSS; 1,5% w/v) sebagai minuman mencit selama satu minggu untuk menginduksi peradangan usus yang spesifik. Pada hari ke 3 dan 7, serta minggu ke 7 dan 20 setelah pemberian DSS, mencit dikorbankan dan ususnya diperiksa sebagai penanda adanya inflamasi dan karsinogenesis. Seluruh sampel

**Universitas Indonesia**

dinilai indeks inflamasinya yang meliputi area inflamasi, tingkat keparahan, ulserasi, hiperplasia, dan displasia. Dari data dua gabungan studi tersebut menunjukkan rerata polip berkurang signifikan pada mencit yang diberi SPC pada minggu ke 7 untuk keseluruhan studi berturut-turut  $p < 0,001$  dan  $p < 0,01$ . Hiperplasia dan displasia, area inflamasi serta indeks inflamasi berkurang signifikan pada kelompok SPC dibandingkan dengan kelompok kontrol pada minggu 7 dengan nilainya berturut-turut adalah  $p < 0,10$ ,  $p < 0,10$  dan  $p < 0,05$ . Pada 20 minggu, mencit di kelompok kontrol dan SPC menunjukkan tumor kolon. Kecendrungan dalam mengurangi keparahan tumor yang diberi diet SPC diamati, namun tidak memberikan efek yang signifikan secara statistik (Brownschindle, 2011)

#### **4.10 Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji dan Bungkil Kedelai Terhadap Terjadinya Hiperplasia**

Hiperplasia merupakan tahap awal perubahan sel menjadi kanker. Hiperplasia ditandai dengan peningkatan pertumbuhan sel yang memiliki kemampuan proliferasi tinggi. Biasanya hiperplasia dikaitkan dengan peningkatan proliferasi dan kecepatan mitosis. Dengan meningkatnya jumlah sel yang mengalami hiperplasia, menunjukkan bahwa proliferasi berjalan lebih dari biasanya. Beberapa penelitian mengaitkan bahwa hiperplasia merupakan awal terjadinya displasia. Walaupun tidak selamanya hiperplasia akan menghasilkan displasia (Kusmardi, Priosoeryanto, Harlina, Cornain, 2014). Dari hasil anova menunjukkan berbeda bermakna antara pemberian ekstrak biji dan bungkil kedelai terhadap angka kejadian hiperplasia ( $p = 0,000$ ).

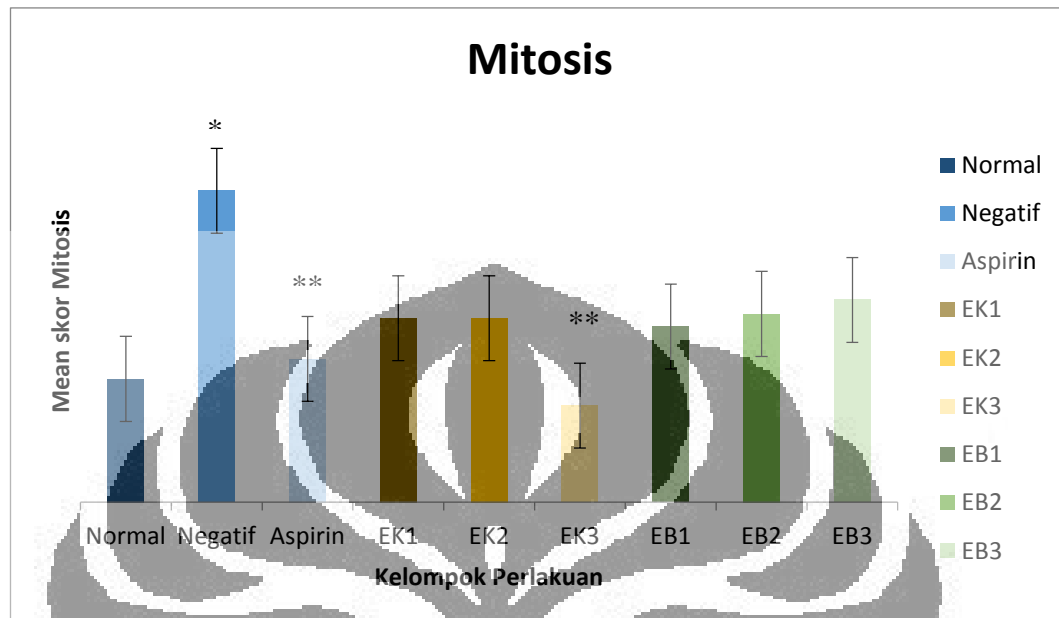


Keterangan: \* $p < 0.05$  dibandingkan kelompok normal, \*\* $p < 0.05$  dibandingkan kelompok negatif

**Gambar 4.12** Grafik rerata skor hiperplasia pada sel epitel kriptal kelompok perlakuan ( $p = 0,000$ )

Gambar 4.12 menunjukkan terjadinya penurunan skor hiperplasia pada kelompok yang diberi ekstrak biji dan bungkil kedelai, dengan *multiple comparison* Turkey nilai penurunan hiperplasiannya berturut-turut EK1 ( $p=0.001$ ), EK2 ( $p=0.000$ ), EK3 ( $p=0.000$ ), EB2 ( $p=0.020$ ), dan EB3 ( $p=0.002$ ). Hasil tersebut menunjukkan untuk ketiga dosis ekstrak biji kedelai menunjukkan penurunan skor hiperplasia yang baik. Untuk ekstrak bungkil kedelai yang memiliki penurunan skor hiperplasia yang baik terdapat pada dosis 150 mg dan 200 mg, untuk dosis 75 mg juga terjadi penurunan skor hiperplasia namun belum terlalu cukup bermakna secara statistik. Kontrol positif (aspirin) menunjukkan berbeda bermakna dengan kontrol negatifnya ( $p=0.000$ ). Hasil tersebut menunjukkan ekstrak biji dan bungkil kedelai pada EK1, EK2, EK3, EB2, dan EB3 memiliki kemampuan yang sebanding dengan aspirin dalam menurunkan skor hiperplasia. Parameter displasia pada penelitian ini juga mengalami penurunan dengan pemberian ekstrak biji dan bungkil kedelai. Displasia merupakan tahap lebih lanjut setelah hiperplasia. Sehingga jika hiperplasia terjadi penurunan, maka displasia juga akan menurun.

#### 4.11 Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji dan Bungkil Kedelai Terhadap Terjadinya Mitosis



Keterangan: \* $p < 0.05$  dibandingkan kelompok normal, \*\* $p < 0.05$  dibandingkan kelompok negatif

**Gambar 4.13** Grafik rerata skor mitosis pada sel epitel kriptal kelompok perlakuan ( $p = 0,008$ )

Dari hasil anova menunjukkan berbeda bermakna antara pemberian ekstrak biji dan bungkil kedelai terhadap angka kejadian mitosis ( $p = 0,008$ ). Gambar 4.13 menunjukkan terjadi penurunan skor mitosis pada kelompok yang diberi ekstrak biji kedelai (EK) dengan nilai penurunan terbaik ditunjukkan oleh EK<sub>3</sub> (200 mg /20gr BB). Uji lebih lanjut dengan *multiple comparison* Turkey menunjukkan terjadi perbedaan bermakna antara EK<sub>3</sub> (200 mg/ 20gr BB) dengan kontrol negatif ( $p=0.003$ ). Untuk ekstrak bungkil kedelai juga dapat menurunkan skor mitosis, namun kurang berbeda bermakna secara statistik. Sedangkan untuk kontrol positifnya (aspirin) juga berbeda bermakna dengan kontrol negatif ( $p=0.024$ ). Hasil tersebut menunjukkan ekstrak biji kedelai dosis 200 mg memiliki kemampuan menurunkan skor mitosis lebih baik dari aspirin. Pada penelitian ini skor mitosis mengalami penurunan, hal tersebut sejalan dengan parameter penelitian lain dalam penelitian ini yaitu dengan peningkatan apoptosis, penurunan hiperplasia dan displasia.

## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

- a. Ekstrak biji kedelai dapat menghambat karsinogenesis kolon ditinjau dari meningkatnya apoptosis pada EK<sub>2</sub> (p=0.009), berkurangnya displasia pada EK<sub>3</sub> (p=0.002), berkurangnya hiperplasia pada EK<sub>3</sub> (p=0.000), dan berkurangnya mitosis pada EK<sub>3</sub> (p=0.003).
- b. Ekstrak bungkil kedelai dapat menghambat karsinogenesis kolon ditinjau dari meningkatnya apoptosis pada EB<sub>1</sub> (p=0.436), berkurangnya displasia pada EB<sub>3</sub> (p=0.003), berkurangnya hiperplasia pada EB<sub>3</sub> (p=0.002), dan berkurangnya mitosis pada EB<sub>1</sub> (p=0.173).

#### 5.2 Saran

Pada penelitian ini semua parameter menunjukkan perbedaan bermakna secara statistik. Namun perlu dikaji lebih lanjut apakah senyawa aktif yang bekerja dalam penelitian ini adalah lunasin. Untuk itu diperlukan proses pemurnian lebih lanjut ekstrak, agar diperoleh kandungan lunasin di dalam ekstrak lebih banyak. Untuk ekstrak yang lebih direkomendasikan untuk kemoprentif kanker kolon adalah ekstrak dari biji kedelai.



### Daftar Pustaka

- Abdullah, M., Sudoyo, A.W., Utomo, A.R., Fauzi, A., dan Rani, A.A. (2012). Molecular profile of colorectal cancer in Indonesia: is there another pathway. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 5(2), 71-78.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Rafi, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008). *Cancer in molecular biology of the cell*. 5<sup>th</sup> Ed. New York: Garland Science, Taylor & Francis group.
- Alfred, M.C., & Bruce, D.F. (1997). *Cancer of the colon : Cancer, principles & practice of oncology*. 5<sup>th</sup> Ed. USA: Lippincott-Raben.
- Allen, J.L. (1995). Molecular biology of colorectal cancer: a Clinician's view. *Perspect Colon Rectal Surgery*, 8, 181-202.
- Aluko, R.E. (2012). *Functional foods and nutraceuticals*. New York: Springer.
- American Cancer Society. (2011). *Colorectal cancer facts & figures: 2011-2013*. Atlanta: American Cancer Society Inc.
- American Cancer Society. (2014). *Colorectal cancer*. Atlanta: American Cancer Society Inc.
- Anderson, J.W., Smith, B.M., & Washnock, C.S. (1999). Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70(3), 464S-474S, ISSN 0002-9165.
- Arjoso, S., Sudoyo, A.W., & Satria, Y. (2008). *Informasi kesehatan dasar tentang kanker: Pedoman bagi penyuluh kanker*. Edisi 2. Jakarta: Yayasan Kanker Indonesia dan Program for Appropriate Technology in Health.
- Atmakusuma D. (2010). Falsafah dan prinsip dasar pengobatan kanker secara medik dengan obat antikanker. Dalam: Aman RA, Gondhowiardjo S, Rachman A, Suriadiredja ASD, Syahrudin E, et al, Editor. *Basis Science of Oncology Ilmu Onkologi Dasar*. Edisi 1. Jakarta: Perhimpunan Onkologi Indonesia, 413-22.
- Balitkabi. (2016). Deskripsi varietas unggul kedelai: 1918-2016. Diunggah dari [http://balitkabi.litbang.pertanian.go.id/images/stories/uploads/publikasi/juknis/2016\\_deskripsi/kedelai.pdf](http://balitkabi.litbang.pertanian.go.id/images/stories/uploads/publikasi/juknis/2016_deskripsi/kedelai.pdf)
- Bedeir, A., & Krasinskas, A.M. (2011). Molecular diagnostics of colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med*, Vol. 135.

- Beck, D.E., Roberts, P., Rombeau, J.L., Stamos, M.J., & Wexner, S.D. (2009). *The ASCRS manual of colon and rectal surgery*. New York: Springer Science.
- Berg, M., Danielsen, S. A., Ahlquist, T., Merok, M. A., Agesen, T. H., Vatn, M. H., *et al.* (2010). DNA sequence profiles of the colorectal cancer criticalgene set KRAS-BRAF-PIK3CA-PTEN-TP53 related to age at disease onset. *PLoS ONE*, 5 (11), e13978.
- Bhathena, S.J., Velasquez, M.T. (2002). Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 1191–1201.
- Bilinski, C., Burleson, J., Forouhar, F. (2012). Inflammation associated with neoplastic colonic polyps. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 42(3), 226-270.
- Bodmer, W.F. (2006). Cancer genetics: Colorectal cancer as a model. *J HumGenet*, 51(5), 391-396.
- BPOM RI. (2014). *Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 12 Tahun 2014 Tentang Persyaratan Mutu Obat Tradisional*. Jakarta: BPOM RI.
- Brownschidle, A.M. (2011). *The effect of soy protein on colon carcinogenesis in vitro and in vivo*. Thesis in Food Science, The Pennsylvania State University.
- Byrns, M.C., & Peening, T.M. (2011). *Environmental Toxicology: Carcinogens and Heavy Metals*. In: Brunton L, Chabner B, Bjorn K, Editors. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12th Edition. New York: McGraw Hill.
- Chandrasoma, P., & Taylor, C.R. (1995). Cell Degeneration & Necrosis. In: *Concise Pathology*. 3<sup>rd</sup> ed. McGraw-Hill, 4-5.
- Chen, J., & Huang, X.F. (2009). The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications. *Cancer Biology Ther*, 8,1313-7.
- Cho, K.R., Oliner, J.D., Simons, J.W., Hedrick, L., Fearon, E.R., Preisinger, A.C., *et al.* (1994). *The DCC Gene: Structural analysis and mutations in*

- colorectalcarcinomas. Genomics. 19 (3): 525-533. Di dalam Pignatelli M, Banu N & Melegh Z. (2008). The molecular pathology of sporadic and hereditary colorectal cancer. Di dalam Jankowski J, Sampliner R, Kerr D, dan Fong Y (Editor). (2008). Gastrointestinal oncology: A critical multidisciplinary team approach (Chapter 12, pp: 305-306, 308, 310-311, 313). Blackwell Publishing, ISBN: 978-1-4051-2783-7.*
- Chung, Y.F., Eu, K.W., Machin, D., Ho, J.M., Nyam, D.C., Leong, A.F., et al. (1998). Young age is not a poor prognostic marker in colorectal cancer. *Br J Surg*, 85, 1255-9.
- Compton, C.C. (2005). The staging of colorectal cancer: 2004 and Beyond. *Ca Cancer Journal of Clinicians*. 54(6), 295-308.
- Cooper, H.S., Murthy, S., Kido, K., Yoshitake, H., Flanigan, A. (2000). Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology,  $\beta$ -catenin and p53 expression and the role of inflammation. *Carcinogenesis*, 21(4), 757-768.
- Coward, L., Barnes, N., Setchell, K., & Barnes, S. (1993). Genistein, daidzein, and their betaglycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean food from American and Asian diets. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 41 (11), 1961-1967, ISSN 0021-8561.
- Dalton, W.B., & Yang, V.W. (2007). Mitotic origins of chromosomal instability in colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*, 3(2), 59-64.
- De Bruin, E.C., & Medema, J.P. (2008). Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer fevelopment and treatment response. *Cancer Treatment Reviews*, 34, 737-749.
- de Mejia, E.G., Vasconez, M., de Lumen, B.O., & Nelson, R. (2004). Lunasin concentration in different soybean genotypes, commercial soy protein, and isoflavone products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (19), 5882-5887, ISSN 0021-8561.
- de Mejia, E.G., & Dia, V.P. (2009). Lunasin and lunasin-like peptides inhibit inflammation through suppression of NF-kB pathway in the macrophage. *Peptides*, 30(12), 2388-2398, ISSN 0196-9781.

- De Moura, J.M.L.N., Hernandez-Ledesma, B., de Almeida, N.M., Hsieh, C.C., de Lumen, B.O., Johnson, L.A. (2011). Lunasin and Bowman-Birk protease inhibitor concentrations of protein extracts from enzyme-assisted aqueous extraction of soybeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 6940-6946.
- de Lumen, B.O. (2005). Lunasin: A cancer preventive soy peptide. *Nutrition Reviews*, 63(1), 16-21, ISSN 0029-6643.
- Departemen Kesehatan RI. (1995). *Materia Medika Indonesia. Jilid VI*. Jakarta: Depkes RI.
- Departemen Kesehatan RI. (1995). *Laporan Tahunan Kanker*: Direktorat Jendral Pelayanan Medik dan Perhimpunan Patologi Anatomi Indonesia. Jakarta: Depkes RI.
- Departemen Kesehatan RI. (2000). *Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat*. Cetakan Pertama. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Dia, V.P., Torres, S., de Lumen, B.O., Erdman, J.W., & de Mejia, E.G. (2009). Presence of lunasin in plasma of men after soy protein consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1260-1266, ISSN 0021-8561.
- Dia, V.P., Wang, W., Oh, V.L., de Lumen, B.O., & de Mejia, E.G. (2009). Isolation, purification and characterisation of lunasin from defatted soybean flour and in vitro evaluation of its anti-inflammatory activity. *Food Chemistry*, 114(1), 108-115, ISSN 0308-8146.
- Dia, V.P., & de Mejia, E.G. (2010). Lunasin promotes apoptosis in human colon cancer cells by mitochondrial pathway activation and induction of nuclear clusterin expression. *Cancer Letters*, 295(1), 44-53, ISSN 0304-3835.
- Dia, V.P., & de Mejia, E.G. (2011). Lunasin induces apoptosis and modifies the expression of genes associated with extracellular matrix and cell adhesion in human metastatic colon cancer cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55(4), 623-634, ISSN 1613-4133.

- Dia, V.P., & de Mejia, E.G. (2011). Lunasin potentiates the effect of oxaliplatin preventing outgrowth of colon cancer metastasis, binds to  $\alpha 5\beta 1$  integrin and suppresses FAK/ERK/NF- $\kappa$ B signaling. *Cancer Letters*, 313:167–80.
- Dia, V.P., & de Mejia, E.G. (2013). Potential of lunasin orally-administered in comparison to intraperitoneal injection to inhibit colon cancer metastasis in vivo. *Journal of Cancer Therapy*, 4, 34-43.
- Dwarakanath, B.S., Verma, A., Bhatt, A.N., Parmar, V.S., & Raj, H.G. (2008). Targeting protein acetylation for improving cancer therapy. *Indian Journal of Medicinal Research*, 128(1), 13-21, ISSN 0971-5916.
- Erdman Jr, J., Jadger, T., Lampe, J., Setchell, K.D.R., & Messina, M. (2004). Not all soy products are created equal: caution needed in interpretation of research results. *The Journal of Nutrition*, 134(5), (May 2004), S1229–S1233, ISSN 0022-3166.
- Ettarh, R., Cullen, A, Calamai, A. (2010). NSAIDs and cell proliferation in colorectal cancer. *Pharmaceuticals*, 3, 2007-2021.
- Fearon, E.R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759–767.
- Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D.M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*; in press.
- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. (1997). Phosphorus. Dietary Reference Intakes: Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. Washington D.C.: National Academy Press:146-189. ([National Academy Press](#))
- Fournier, D.B., Erdman, J.W.Jr., & Gordon, G.B. (1998). Soy, its components, and cancer prevention: a review of the in vitro, animal, and human data. *Cancer Epidemiological Biomarkers Preview*, 7(11), 1055–1065, ISSN 1055-9965.
- Galiatsatos, P., & Foulkes, W.D. (2006). Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol*, 101, 385 – 398.

- Galvez, A.F., Revilla, M.J.R., & de Lumen, B.O. (1997). A novel methionine-rich protein from soybean cotyledon: cloning and characterization of cDNA (accession No.AF005030). Plant Register #PGR97-103. *Plant Physiology*, 114, 1567-1569.
- Gong, L., Thorn, C.F., Bertagnolli, M.M., Grosser, T., Altman, R.B., Klein T.E. (2012). Celecoxib pathways: pharmacokinetic and pharmacodynamics. *Pharmacogenetics and genomics*, 22(4), 310-8.
- Goepel, J.R. (1996). Responses to cellular injury. In : Underwood JCE. *General and systematic pathology*. 2<sup>nd</sup> ed. New York-London-Madrid: Churchill livingstone, 117-119.
- Hamilton, S.R., Vogelstein, B., Kudo, S., Riboli, E., Nakamura, S., Hainaut, P., et al. (2000). Carcinoma of the colon and rectum. In *World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics. Tumours of the digestive system*. Lyon: IARC press, pp 105.
- Harbone, J.B. (1987). *Metode fitokimia, Penuntun cara mengekstraksi tumbuhan*. (Padmawinata, K: penerjemah). Bandung: Penerbit ITB.
- Hernández-Ledesma, B., & de Lumen, B.O. (2008). Lunasin: A novel cancer preventive seed peptide. *Perspectives in Medical Chemistry*, 2, 75-80.
- Hernández-Ledesma, B., Hsieh, C.C., & de Lumen, B.O. (2009). Anti-inflammatory and antioxidant properties of peptide lunasin in RAW 264.7 macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(3), 803-808, ISSN 0006-291X.
- Hernández-Ledesma, B., Hsieh, C.C., Dia, V., de Mejia, E.G., and de Lumen, B.O. (2011). Lunasin, a cancer preventive seed peptide. In *Soybean and health*. Edited Prof Hany El-Shemy. Croatia: Intech.
- Hernández-Ledesma, B., & de Lumen, B.O. (2012). Lunasin. In *Encyclopedia of Cancer*, (vol 3, pp 2084-2085). New York: Springer Berlin Heidelberg.
- Higuchi, T., & Jass, J.R. (2004). My approach to serrated polyps of the colorectum. *J Clin Pathol*, 57, 682-686.
- Hornick, J.L., & Odze, R.D., (2009). Polyps of the large intestine. In *Surgical pathology of the GI tract, liver, biliary tract, and pancreas*. Philadelphia: Saunders, pp 481-533

- IARC. (2012). *Globocan 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012*. September 12, 2015. [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx?cancer=colorectal](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=colorectal)
- Iwe, M.O.(2003). *The science and technology of soybeans*. 1<sup>st</sup> Edn., Chemistry, Processing and Utilization. Enugu, Nigeria: Rejoint Communication Services Ltd.
- Jacoby, R.F., Seibert, K., Cole, C.E., Kelloff, G., Lubet, R.A. (2000). The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent preventive and therapeutic agent in the min mouse model of adenomatous polyposis. *Cancer Res*, 60, 5040–5044.
- Jeong, H.J., Lam, Y., & de Lumen, B.O. (2002). Barley lunasin suppresses ras-induced colony formation and inhibits core histone acetylation in mammalian cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5903-5908, ISSN 0021-8561.
- Jeong, H.J., Jeong, J.B., Kim, D.S., & de Lumen, B.O. (2007). Inhibition of core histone acetylation by the cancer preventive peptide lunasin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5(3), 632-637. ISSN 0021-8561.
- Jeong, H.J., Jeong, J.B., Kim, D.S., Park, J.H., Lee, J.B., Kweon, D.H., Chung, G.Y., Seo, E.W., & de Lumen, B.O. (2007). The cancer preventive peptide lunasin from wheat inhibits core histone acetylation. *Cancer Letters*, 255(1), 42-48, ISSN 0304-3835.
- Jeong, J.B., Jeong, H.J., Park, J.H., Lee, S.H., Lee, J.R., Lee, H.K., Chung, G.Y., Choi, J.D., & deLumen, B.O. (2007). Cancer-preventive peptide lunasin from *Solanum nigrum* L. Lunasin, a Cancer Preventive Seed Peptide inhibits acetylation of core histones H3 and H4 and phosphorylation of retinoblastoma protein (Rb). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26), 10707-10713, ISSN 0021-8561.
- Jeong, H.J., Lee, J.R., Jeong, J.B., Park, J.H., Cheong, Y.K., & de Lumen, B.O. (2009). The Cancer Preventive Seed Peptide Lunasin From Rye Is Bioavailable and Bioactive. *Nutrition and Cancer*, 61(5), 680-686, ISSN 0163-5581.

- Jeong, H.J., Jeong, J.B., Hsieh, C.C., Hernández-Ledesma, B., & de Lumen, B.O. (2010). Lunasin Is Prevalent in Barley and Is Bioavailable and Bioactive in In Vivo and In Vitro Studies. *Nutrition and Cancer*, 62(8), 1113-1119, ISSN 0163-5581.
- Johns Hopkins. (2015). Colorectal Cancer. September 29, 2015. [http://www.hopkinscoloncancercenter.org/CMS/CMS\\_Page.aspx?CurrentUDV=59&CMS\\_Page\\_ID=B6ACAEF5-52D3-4CC1-88CC-CEB21F5ABBCD](http://www.hopkinscoloncancercenter.org/CMS/CMS_Page.aspx?CurrentUDV=59&CMS_Page_ID=B6ACAEF5-52D3-4CC1-88CC-CEB21F5ABBCD)
- Jass JR. (2007). Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*, 50, 113-130.
- Kandaswami, C. and Middleton, E. (1998). Free radical scavenging and antioxidant activity of plants flavonoids. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 129, 351-366.
- Kinzler KW, Vogelstein B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87, 159-170.
- Khan, A., Shrier, I., & Gordon, P.H. (2001). The change histologic paradigm of colorectal polyps. *Surg Endosc*, 16, 436-440.
- Kodner, I.J., & Robert, D.F. (1999). *Colon, rectum, and anus : Principles of surgery*. 7th Ed. Vol 2. New York: McGraw-Hill.
- Kokki, I., Papan, A., Campbell, H., & Theodoratou, E. (2013). Estimating the incidence of colorectal cancer in South East Asia. *Croat Med J*, 54, 532-40. Doi:10.3325/cmj.2013.54.532
- Koornstra, J.J., de Jong, S., Hollema, H., de Vries, E.G.E., Kleibeuker, J.H. (2003). Change in apoptosis during the development of colorectal cancer: a systematic review of the literature. *Critical Review in Oncology / Hematology*, 45, 37-53.
- Kops, G.J., Weaver, B.A., Cleveland, D.W. (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer*, 5(10): 773-85.
- Kresno, S.B. (2010). Peran Epigenetik Pada Perkembangan Kanker. *Indon J Cancer*, 1(4), 29-36.
- Kurashina, K., Yamashita, Y., Ueno, T., Koinuma, K., Ohashi, J., Horie, H., *et al.* (2008). Chromosome copy number analysis in screening for prognosis-



- related genomic regions in colorectal carcinoma. *Cancer Sci*, 99 (9), 1835–1840.
- Kusmardi, Priosoeryanto, B.P., Harlina, E., Cornain, S. (2014). Aktivitas minyak ikan dalam menghambat preneoplasia kolon mencit yang diinduksi azoksimetan dan dextran sodium sulfat. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 2(2), 154-161.
- Lam-Himlin, D., Bhajee, F., Arnold, C. (2015). Classification and diagnosis of colorectal dysplasia in inflammatory bowel disease. *Diagnostic Hispathology*, 21(7), 283-289.
- Lanas, A., & Ferrandez, A. (2009). NSAIDs and the colon. *Curr. Opin. Gastroenterol*, 25, 44–49.
- Lanza, G., Messerini, L., Gafa, R., Risio, M. (2011). Colorectal tumor: The histology report. *Digestive and Liver Disease*, 43S, S344-S355.
- Lea, I. A., Jackson, M. A., & Dunnick, J. K. (2009). Genetic pathways to colorectal cancer. *Mutat Res*, 670 (1-2): 96–98.
- Lee, P.Y., Fletcher, W.S., Sullivan, E.S., & Vetto, J.T. (1994). Colorectal cancer in young patients: characteristics and outcome. *Am Surg*, 60, 607-12.
- Li, F.N., Li, L.L., Yang, H.S., Yuan, X.X., Zhang, B., et al. (2011). Regulation of soy isoflavones on weight gain and fat percentage: evaluation in a Chinese Guangxi minipig model. *Animal*, 5(12): 1903-1908.
- Lim, T. K. (2012). *Edible medical and non medical plants*. Volume 2, Fruits. New York: Springer.
- Lule, V.K., Garg, S., Pophaly, S.D., Hitesh, and Tomar, S.K. (2015). Potential health benefits of lunasin: A multifaced soy-derived bioactive peptide. *Journal of Food Science*, 80(3): 85-94.
- Markowitz, S.D., & Bertagnolli, M.M. (2009). Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*, 361, 2449-2460.
- Mescoli, C., Albertoni, L., D'incá, R., Rugge, M. (2013). Dysplasia in inflammatory bowel diseases. *Digestive and Liver Disease*, 45, 186-194.
- Messina, M., & Flickinger, B. (2002). Hypothesized anticancer effects of soy: evidence points to isoflavones as the primary anticarcinogens. *Pharmaceutical Biology*, 40, S6–S23, ISSN 1388-0209.

- Messina, M., McCaskill-Stevens, W., & Lampe, J.W. (2006). Addressing the soy and breast cancer relationship: review, commentary, and workshop proceedings. *Journal of National Cancer Institute*, 98(18), 1275–1284, ISSN 0027-8874.
- Middleton, E., and Kandaswami, C. (1992). Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem. Pharmacol.*, 43, 1167-1179.
- Narayan, S., & Roy, D. (2003). Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol Cancer*, 12(2), 41.
- NCBI. (2016). Aspirin. Diunggah dari <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/aspirin#section=Top>
- Okwu, D.E. and Omodamiro, O.D. (2005). Effects of hexane extract and phytochemical content of *Xylopiya aethiopica* and *Ocimum gratissimum* on the uterus of guinea pig. *Bio-Research*, 3, 40-44.
- Okwu, D.E., & Orji, B.O. (2007). Phytochemical composition and nutritional quality of *Glycine max* and *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *American Journal of Food Technology*, 2(6), 512-520.
- Oliveira, P.A., Colaço, A., Chaves, R., Pinto, H.G., Cruz, L.F., Lopes, C. (2007). Chemical carcinogenesis. *An Acad Bras Ciênc*, 79(4), 593-616.
- Parramore, J.B., Wei, J.P., Yeh, K.A. (1998). Colorectal cancer in patients under forty: presentation and outcome. *Am Surg*, 64, 563-67.
- Patrono, C., Rodriguez, L.A.G., Landolfi, R., Baigent, C. (2005). Low-Dose Aspirin for the Prevention of Atherothrombosis. *N Eng J Med*, 353 (22), 73-83.
- Peršec, M., & Cerar, A. (2012). Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model: Traps and Tricks. *J Biomed Biotech*, 1-13.
- Polakis, P. (2007). The many ways of wnt in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev*, 17, 45-51.
- Poultry Feeding Standarts. (2005). The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition. *Polish Academy of Sciences*, ISBN 83-917097-7-9.

- Pritchard, C.C., & Grady, W.M. (2011). Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut*, 60, 116-129. doi:10.1136/gut.2009.206250.
- Rajagopalan, H., Bardelli, A., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., & Velculescu, V. E. (2002). RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature*, 418, 934.
- Ranger, G.S. (2016). The role of aspirin in colorectal cancer chemoprevention. *Critical Review in Oncology/Hematology*, 104, 87-90.
- Rao, C.V., Steele, V.E., Swamy, M.V., Patlolla, J.M., Guruswamy, S., Kopolovich, L. (2009). Inhibition of azoxymethane-induced colorectal cancer by CP-31398, a TP53 modulator, alone or in combination with low doses of celecoxib in male F344 rats. *Cancer Res*, 69, 8175–8182.
- Rayaprolu, S.J., Hettiarachchy, N.S., Chen, P., Kannan, A., & Mauromostakos, A. (2013). Peptides derived from high oleic acid soybean meals inhibit colon, liver and lung cancer cell growth. *Food Research International*, 50 (1), 282-288.
- Riddell, R.H., Goldman, H., Ransohoff, D.F., et al. (1983). Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. *Hum Pathol*, 14, 931-68.
- Robertis, M.D., Massi, E., Poeta, M.L., Carroti, S., Sergio, M., Cecchetelli, L., et al. (2011). The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *J Carcinog*, 1-37
- Roncucci, L. (2012). Colorectal cancer premalignant lesions. In *Encyclopedia of Cancer*, (vol 3, pp 934-938). New York: Springer Berlin Heidelberg.
- Robert, S., Sandler, R.S., Halabi, S., Baron, J.A., Budinger, S., Paskett, E., et al. (2003). A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N Engl J Med*, 384, 883-90.
- Roock, W. D., Vriendt, V. D., Normanno, N., Ciardiello, F., & Tejpar, S. (2011). KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: Implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol*, 12(6), 594-603.

- Rosenberg, D.W., Giardina, C., Tanaka, T. (2009). Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 30(2), 183-196.
- Rothwell, P.M., Wilson, M., Elwin, C.E., Norrving, B., Algra, A. (2010). Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *The Lancet*, 376 (9754), 1741-50.
- Rubin, R., & Strayer, D.S. (2008). *Rubin's pathology: Clinicopathologic foundations of medicine*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Rustgi, A.K. (2007). The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev*, 21, 2525-2538.
- Sarkar, F.H., & Li, Y. (2002). Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer Metastasis Rev*, 21(3-4): 265-80.
- Seber, L.E., Barnett, B.W., McConnell, E.J., Hume, S.D., Cai, J., Boles, K., et al. (2012). Scalable purification and characterization of the anticancer lunasin peptide from soybean. *Plos one*, 7(4), 1-13.
- Segditsas, S., & Tomlinson, I. (2006). Colorectal cancer and genetic alterations in the wnt pathway. *Oncogene*, 25, 7531-7537.
- Shahidi, F. (2002). Research address bioactive compounds. *Food Technol.*, 56, 23-28.
- Shureiqi, I., Jiang, W., Zuo, X., Wu, Y., Stimmel, J.B., Leesnitzer, L.M., et al. (2003). The 15-lipoxygenase-1 product 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid down-regulates PPAR- $\delta$  to induce apoptosis in colorectal cancer cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 100, 9968-9973.
- Stark, L.A., Reid, K., Sansom, O.J., Din, F.V., Guichard, S., Mayer, I., et al. (2007). Aspirin activates the NF- $\kappa$ B signalling pathway and induces apoptosis in intestinal neoplasia in two in vivo models of human colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 28(5), 968-76.
- Suzuki, R., Konho, H., Sugie, S., Tanaka, T. (2005). Dose-dependent promoting effect of dextran sodium sulfate on mouse colon carcinogenesis initiated with azoxymethane. *Histol Histopathol*, 20, 483-492.

- Suzuki, R., Miyamoto, S., Yasui, Y., Sugie, S., Tanaka, T. (2007). Global gene expression analysis of the mouse colonic mucosa treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate. *BMC Cancer*, 7, 84-7.
- Syahrin, R.A. (2014). *Perbedaan imunoekspresi caspase-3 antara diffuse large B-cell lymphoma subtype germinal center B-cell-like dan no-germinal center B-cell-like*. Tesis. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia.
- Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, Sato Y, Niitsu Y. (2006). Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J Gastroenterol*. 41(3), 185–192.
- Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S., and Mori, H. (2003). A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci*, 94, 965-973.
- Tanaka, T. (2009). Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *Journal of Carcinogenesis*, 8(5), DOI: 10.4103/1477-3163.49014.
- Tanaka, T. (2011). Development of inflammation-associated colorectal cancer model and its application for research on carcinogenesis and chemoprevention. *International Journal of Inflammation*, 2012, 1-16. DOI: 10.1155/2012/658786.
- Theodoratou, E., Farrington, S.M., Tenesa, A., McNeill, G., Cetnarskyj, R., Korakakis, E., et al. (2014). Associations between dietary and lifestyle risk factors and colorectal cancer in the Scottish population. *Eur J Cancer Prev*, 23, 8-17. Medline:23820601 doi:10.1097/CEJ.0b013e3283639fb8
- Thibodeau, S.N., Bren, G., & Schaid, D. (1993). Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*, 260, 816-819.
- Tjarta, A. (1973). *Neoplasma in patologi*. Jakarta: Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Tortora, G.J., & Derrickson, B. (2009). *Principles of anatomy and physiology*. 12<sup>th</sup> edition. USA: John Wiley & Sons Inc.

- Toyomura, K., & Kono, S. (2002). Soybean, soy food, isoflavones and risk of colorectal cancer: a review of experimental and epidemiological data. *Asian Pasific J Cancer Prev*, 3, 125-132.
- Triantafillidis, J.K., Nasioulas, G., & Kosmidis, P.A. (2009). Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: Epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer Research*, 29, 2727-2738.
- Turkiewicz, D., Fletcher, W.S., Sullivan, E.S., & Vetto, J.T. (1994). Colorectal cancer in young patients: characteristics and outcome. *Am Surg*, 60, 607-12.
- Vilar, E., & Gruber, S.B. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer: the stable evidence. *Nat. Rev. Clin. Oncol*, 7, 153-162. DOI:10.1016/S1470-2045(10)70209-6.
- Yamamoto, S., Midorikawa, Y., Morikawa, T., Nishimura, Y., Sakamoto, H., Ishikawa, S., *et al.* (2010). Identification of chromosomal aberrations of metastatic potential in colorectal carcinoma. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 49(5), 487-496.
- Yan, Y., Kolachala, V., Dalmaso, G., Nguyen, H., Laroui, H. Temporal and Spatial Analysis of Clinical and Molecular Parameters in Dextran Sodium Sulfate Induced Colitis. *PLoS ONE*, 7(3), 1-10.
- Yang, S., Farraye, F.A., Mack, C. (2004). BRAF dan KRAS mutation in hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colorectum: relationship to histology and CpG island methylation status. *Am J Surg Pathol*, 28(11), 1452-1459.
- Yin, S.Y., Wei, W.C., Jian, F.Y., & Yang, N.S. (2013). Therapeutic application of herbal medicines for cancer patients. Evidence-based complementary and alternative medicine.
- Yu, Y., Jing, X., Li, H., Zhao, X., and Wang, D. (2016). Soy isoflavone consumption and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Report*, 6(25939): 1-9. DOI: 10.1038/srep25939
- Wahyuningsih, M.S.H. (2010). *Potensi pengembangan obat bahan alam indonesia untuk penyakit kanker: Tantangan dan harapan*. Pidato

pengukuhan jabatan guru besar Fakultas Kedokteran UGM tanggal 3 Agustus 2010. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.

- Waladkhani, A.R., and Clemens, M.R. (2001). *Effects of Dietary Phytochemicals on Cancer Development*. In: *Vegetables, Fruits and Herbs in Health Promotions*. Watson, R.R. (Ed.). Boca Rotan: CRC Press, pp: 3-14.
- Wang, H., & Murphy, P. (1994). Isoflavone content in commercial soybean foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(8), 1666-1673, ISSN 0021-8561.
- Williams, C.S., Watson, A.J., Sheng, H., Helou, R., Shao, J., DuBois, R.N. (2000). Celecoxib prevents tumor growth *in vivo* without toxicity to normal gut: Lack of correlation between *in vitro* and *invivo* models. *Cancer Res*, 60, 6045–6051.
- Wong, Y.N., Chang, W.C., Clapper, M., Engstrom, P.E. (2007). Chemoprevention of colorectal cancer. In *Colorectal cancer evidence-based chemotherapy strategies*. Totowa: Humana Press Inc, pp 33-29.
- Wood, L.D., Parsons, D.W., Jones, S., Lin, J., Sjoblom, T., Leary, R. J., *et al.* (2007). The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science*, 318, 1108-1113.
- WHO. (2015). Cancer. September 09, 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>

## LAMPIRAN 1. Perhitungan Dosis

Perhitungan dosis ekstrak yang digunakan adalah:

Dosis rendah setara dengan 20 mg Lunasin

Dosis sedang setara dengan 40 mg Lunasin

Dosis tinggi setara dengan 80 mg Lunasin

Perhitungan dosis menggunakan asumsi 0,5 mg per gram biji kedelai.

Bobot mencit = 20 g

Perhitungannya adalah sebagai berikut:

$$- \text{Dosis rendah setara lunasin} = \frac{20}{1000} \times 20 \text{ mg} = 0,4 \text{ mg per mencit}$$

$$\text{Kebutuhan untuk satu kelompok} = \frac{0,4}{0,5} \times 1 \text{ g kedelai} = 0,8 \text{ gram kedelai}$$

Rendemen ekstrak PBS 9,287% dari biji kedelai =

$$\frac{9,287}{100} \times 0,8 \text{ g} = 0,074 \text{ g ekstrak/mencit}$$

Dosis rendah = 75 mg

$$- \text{Dosis sedang setara lunasin} = \frac{20}{1000} \times 40 \text{ mg} = 0,8 \text{ mg per mencit}$$

$$\text{Kebutuhan untuk satu kelompok} = \frac{0,8}{0,5} \times 1 \text{ g kedelai} = 1,6 \text{ gram kedelai}$$

Rendemen ekstrak PBS 9,287% dari biji kedelai =

$$\frac{9,287}{100} \times 1,6 \text{ g} = 0,149 \text{ g ekstrak/mencit}$$

Dosis sedang = 150 mg

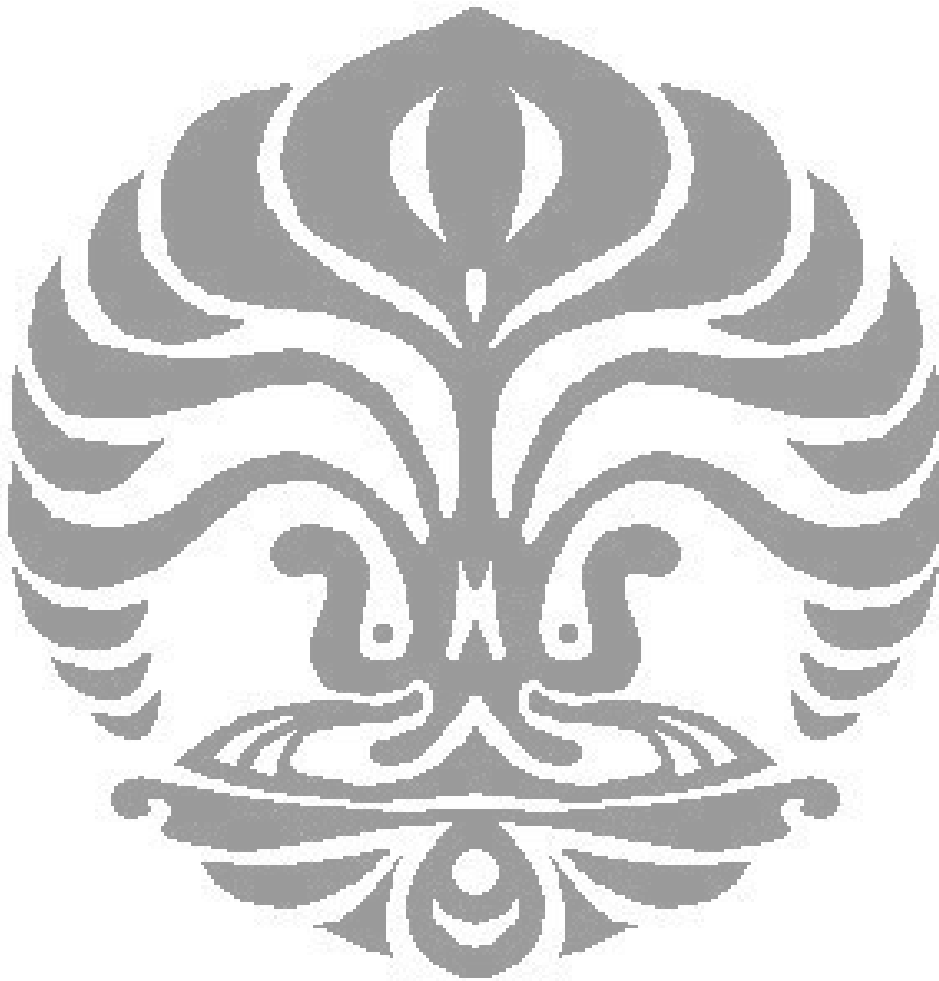
$$- \text{Dosis tinggi setara lunasin} = \frac{20}{1000} \times 80 \text{ mg} = 1,6 \text{ mg per mencit}$$

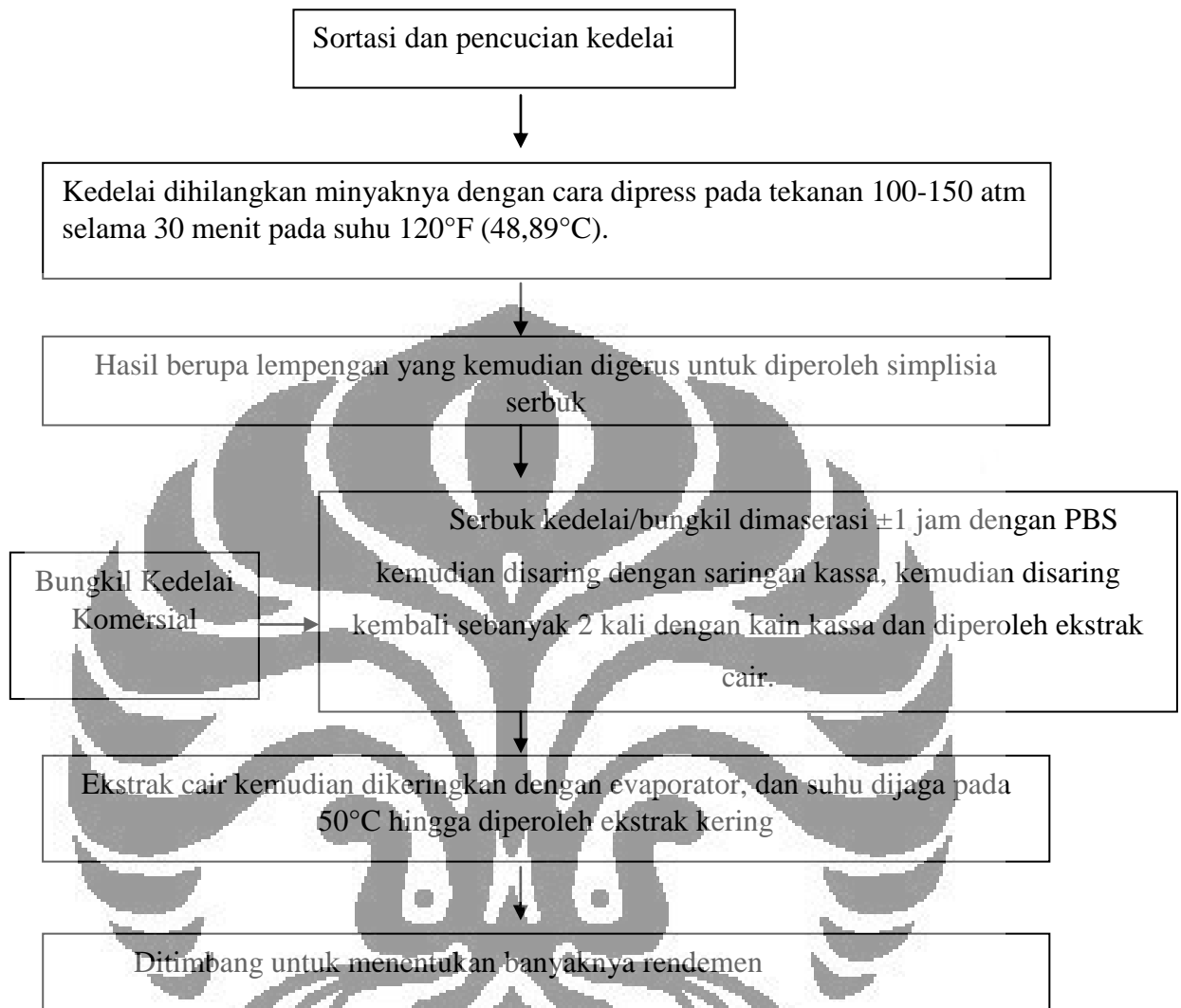


Rendemen ekstrak PBS 9,287% dari biji kedelai =

$$\frac{9,287}{100} \times 3,2 \text{ g} = 0,297 \text{ g ekstrak/mencit}$$

Dosis tinggi = 300 mg



**Lampiran 2. Cara pembuatan ekstrak biji dan bungkil kedelai komersial**

## Lampiran 3. Sertifikat Kedelai

UNIT PENGELOLAAN BENIH SUMBER (UPBS) BALAI PENELITIAN TANAMAN ANEKA KACANG DAN UMBI Jl. Raya Kendalpayak Kotak Pos 66 Malang 65101, Jawa Timur. Telp. 0341-801468. Fax. 0341-801496. Email : <a href="mailto:balikabi@litbang.deptan.go.id">balikabi@litbang.deptan.go.id</a>		 BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN TANAMAN PANGAN BALAI PENELITIAN TANAMAN ANEKA KACANG DAN UMBI	
<b>BENIH BINA BERSERTIFIKAT</b>  <b>LSSM-01-B-R</b>		<b>BENIH DASAR KEDELAI</b>	
		Nomor : 0184/KD.BD.Ng.15/12.15-LA Nama Varietas : GROBOGAN Daya Tumbuh : 88,5 % Kadar Air : 8,8 % Benih Murni : 99,9 % Benih Varietas Lain : 0,00 % Kotoran : 0,10 %	
		Tgl. Selesai pengujian : 08-10-2015 Berat: 5 kg Tgl. Akhir berlakunya label : 08-04-2016 Ket: Benih memenuhi syarat Kementerian Genetik berdasarkan pengujian di pertanian	
No Seri. 0184		Mengetahui, Wakil Direktur UPBS  Dr. Ir. M. Muchlish Adie, MS Nip. 19570531 197901 1 001	

## Lampiran 4. Keterangan lolos kaji etik



UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS KEDOKTERAN

Jl. Salemba Raya No.6, Jakarta 10430  
PO.Box 1958  
T. 02.21.3812477, 31930371, 31930373,  
3922977, 3927360, 3153296,  
F. 02.21.3812477, 31930372, 3157200.  
E. humas@fk.ui.ac.id, etik@fk.ui.ac.id  
fkui.ac.id

Nomor: 181 /UN2.F1/ETIK/2016

### KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK

#### ETHICAL APPROVAL

Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak dasar dan keselamatan subjek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:

*The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the research protocol entitled:*

**"Hambatan Karsinogenesis Ekstrak Kaya Lunasin Biji dan Bungkil Kedelai terhadap KOLON Mancit yang Diinduksi AOM/DSS: Tinjauan terhadap Parameter Histopatologi dan Imunohistokimia"**

***Peneliti Utama*** : Dr. Kusnardi, M.S  
***Principal Investigator***

***Nama Institusi*** : Patologi Anatomi FKU/RSCM  
***Name of the Institution***

dan telah menyetujui protokol tersebut di atas.

*And approved the above-mentioned protocol.*



**Prof. Dr. dr. Rianto Seriabudy, SpFK**

*\*Ethical approval berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan.*

*\*\*Peneliti berkesetiaan*

1. Menjaga kerahasiaan identitas subjek penelitian
2. Memastikan semua penelitian apabila
  - a. Setelah masa berkesetiaan berakhir lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini *ethical clearance* harus diperpanjang
  - b. Penelitian berhenti di tengah jalan
3. Melaporkan kejadian serious adverse event (serious adverse event)
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subjek sebelum penelitian lolos kaji etik dari *ethical clearance*

Semua prosedur persetujuan dilakukan sesuai dengan standar ICH-GCP.

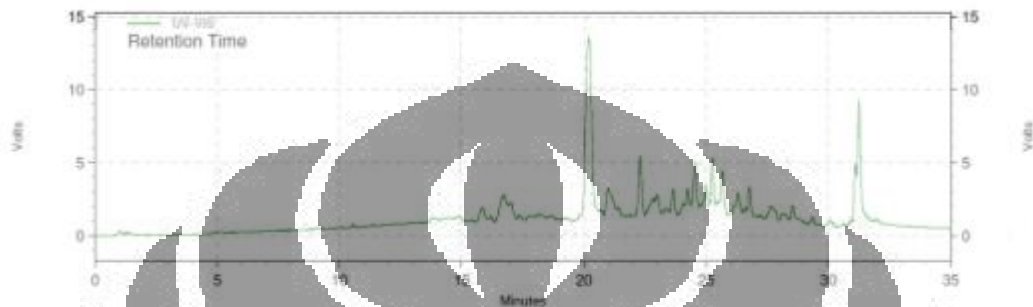
*All procedures of Ethical Approval are performed in accordance with ICH-GCP standard procedure.*

## Lampiran 5. Grafik hasil HPLC standar lunasin

Page 1 of

### Area % Report

Data File: C:\EZStart\Projects\Default\Data\LUNASIN\15 03 16STD LUNASIN 50 ppm.dat  
 Method: C:\EZStart\Projects\Default\Method\LUNASIN\5-95 acn air. 35 menit.met  
 Acquired: 3/15/2016 1:37:15 PM  
 Printed: 4/14/2016 10:38:28 AM



### UV-VIS Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
14.460	46022	1.64	1605	0.68
15.853	48099	1.71	3576	1.52
16.710	134398	4.78	7292	3.11
17.033	53906	1.92	5177	2.20
18.153	43204	1.54	2027	0.86
20.210	782830	27.87	48274	20.56
20.997	131416	4.68	7547	3.21
22.300	154776	5.51	16484	7.02
22.827	63712	2.27	4750	2.02
22.987	61180	2.18	5730	2.44
23.643	57335	2.04	7130	3.04
24.247	57432	2.04	6240	2.66
24.547	122183	4.35	13236	5.64
24.977	55116	1.96	6025	2.57
25.250	89429	3.18	13011	5.54
25.660	77240	2.75	10018	4.27
26.303	91061	3.24	6466	2.75
26.777	70685	2.52	8443	3.60
27.660	71183	2.53	3825	1.63
28.543	61021	2.17	4511	1.92
31.103	107519	3.83	16877	7.19
31.250	371216	13.22	34408	14.65
31.970	58075	2.07	2162	0.92
Totals	2808988	100.00	234814	100.00

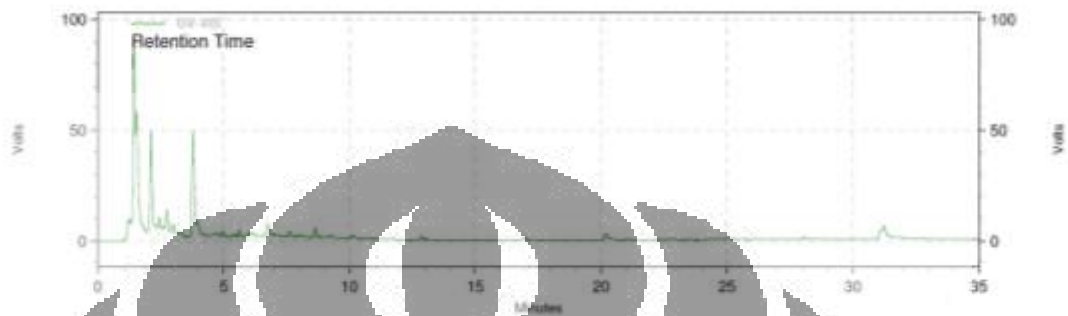
Keterangan : peak lunasin muncul pada menit ke 20.210 dengan luas kurva 782.830

## Lampiran 6. Grafik hasil HPLC ekstrak kedelai

Page 1 of 2

### Area % Report

Data File: C:\EZStart\Projects\Default\Data\LUNASIN\12-04-16\grobogan I.dat  
 Method: C:\EZStart\Projects\Default\Method\LUNASIN\5-95.acn.air.35.menit.met  
 Acquired: 4/12/2016 12:32:08 PM  
 Printed: 4/14/2016 11:42:12 AM



Keterangan : Sampel ekstrak kedelai grobogan ulangan 1, peak lunasin adalah pada menit ke 20.193 luas area kurva 136.187

Page 1 of 3

### Area % Report

Data File: C:\EZStart\Projects\Default\Data\LUNASIN\12-04-16\grobogan II.dat  
 Method: C:\EZStart\Projects\Default\Method\LUNASIN\5-95.acn.air.35.menit.met  
 Acquired: 4/12/2016 11:50:31 AM  
 Printed: 4/14/2016 11:47:59 AM



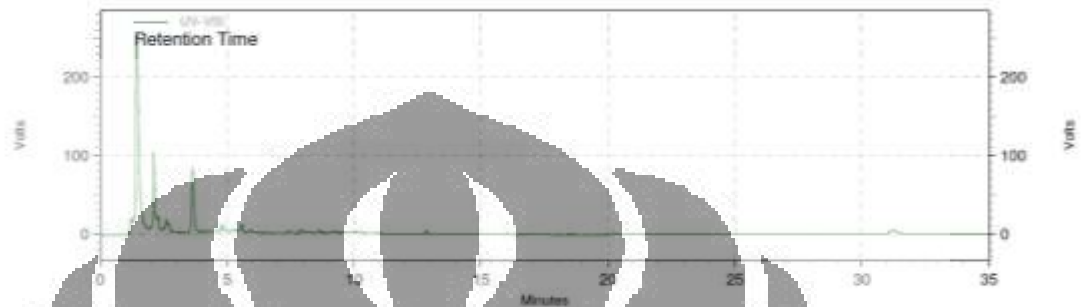
Keterangan : Sampel ekstrak kedelai grobogan ulangan 2, peak lunasin adalah pada menit ke 20.950 luas area kurva 126.684

## Lampiran 7. Grafik hasil HPLC ekstrak bungkil kedelai

Page 1 of 2

### Area % Report

Data File: C:\EZStart\Projects\Default\Data\LUNASIN\12 04 16\komersil I.dat  
 Method: C:\EZStart\Projects\Default\Method\LUNASIN\5-95 acn air, 35 menit.met  
 Acquired: 4/12/2016 3:24:44 PM  
 Printed: 4/14/2016 11:49:00 AM



Keterangan : Sampel Ekstrak bungkil ulangan 2, peak lunasin adalah pada menit ke 20.243 dengan luas area kurva 104.159

Page 1 of 2


### Area % Report

Data File: G:\EZStart\Projects\Default\Data\LUNASIN\12 04 16\komersil II.dat  
 Method: C:\EZStart\Projects\Default\Method\LUNASIN\5-95 acn air, 35 menit.met  
 Acquired: 4/12/2016 2:02:23 PM  
 Printed: 4/14/2016 11:53:16 AM



Keterangan : Sampel ekstrak bungkil ulangan 2, peak lunasin adalah pada menit ke 20.223 dengan luas area kurva 157.947

## Lampiran 8. Grafik pengukuran sisa fosfat dalam ekstrak kedelai



**PEMERINTAH PROVINSI DAERAH KHUSUS IBUKOTA JAKARTA**  
**DINAS KESEHATAN**  
**LABORATORIUM KESEHATAN DAERAH**  
 Jl. Rawasari Selatan No. 2 Jakarta 10510, E-mail : dkkiabs@gmail.com  
 Telp. (021) 4247408, 4247432, 4247404, 42889512, Fax. : (021) 4247364, 42873697

F. 100/LDJ/2003

---

### HASIL PEMERIKSAAN KIMIA

**PENGAMBILAN SAMPEL**

Tanggal : -  
 Oleh : Ibu Wilasih  
 Jenis Sampel : Ekstrak kedelai Komersial  
 Merk : -  
 Tempat : -

**PENERIMAAN DI LABORATORIUM**

Tanggal : 12 April 2015  
 No. Sampel : -  
 No. Laboratorium : 0390  
 Jenis Pemeriksaan : Kimia

---

**DIKIRIM OLEH**

Nama / Instansi : Ibu Wilasih  
 Alamat : Fakultas Farmasi Kampus UI Depok  
 Pengambilan sampel di luar / atas tanggung jawab LABKESDA


### HASIL LABORATORIUM

NO	PARAMETER	SATUAN	HASIL	KADAR MAKSIMUM YANG DIPERBOLEHKAN	METODE
1	Fosfat terlarut	% b/b	4.17	-	Std Met. APH/4110C/22/2010

**KESIMPULAN :**  
 Kadar Fosfat terlarut yang terdapat pada ekstrak kedelai komersial adalah 4.17 % b/b


Laporan ini dilindungi oleh undang-undang. Diperbolehkan hanya persetujuan tertulis dari Labkesda.  
 This report shall not be reproduced without the written approval from Labkesda.  
 Rev. 02/01/2006 Januari 2006

Jakarta, 31 Mei 2016  
 SIE LABORATORIUM KESMAS

  
 Hasfiah Fattah, SSI  
 NIP. 1976031820060442016



## Lampiran 9. Grafik pengukuran sisa fosfat dalam ekstrak bungkil



**PEMERINTAH PROVINSI DAERAH KHUSUS IBUKOTA JAKARTA**  
**DINAS KESEHATAN**  
**LABORATORIUM KESEHATAN DAERAH**  
 Jl. Rawasari Selatan No. 2 Jakarta 10510, E-mail : dkkilabs@gmail.com  
 Telp. (021) 4247408, 4247432, 4247404, 42889512, Fax. : (021) 4247364, 42873697

F. 100/LDJ/2003

---

### HASIL PEMERIKSAAN KIMIA

<b>PENGAMBILAN SAMPEL</b> Tanggal : - Oleh : Ibu Wijasih Jenis Sampel : Ekstrak kedelai Komersial Merk : - Tempat : -	<b>PENERIMAAN DI LABORATORIUM</b> Tanggal : 12 April 2015 No. Sampel : - No. Laboratorium : 0390 Jenis Pemeriksaan : Kimia
--	--

---


**DIKIRIM OLEH**  
 Nama / Instansi : Ibu Wijasih  
 Alamat : Fakultas Farmasi Kampus UI Depok  
 Pengambilan sampel di luar / atas tanggung jawab LABKESDA

### HASIL LABORATORIUM

No	PARAMETER	SATUAN	HASIL	KADAR MAKSIMUM YANG DIPERBOLEHKAN	METODE
1	Fosfat terlarut	% b/b	4.17	-	Std Met. APHA #110C/22/2010

**KESIMPULAN :**  
 Kadar Fosfat terlarut yang terdapat pada ekstrak kedelai komersial adalah 4.17 % b/b

Laporan ini dilindungi oleh undang-undang dan tidak boleh disebarluaskan tanpa persetujuan tertulis dari Labkesda  
 This report shall not be reproduced without the written approval from Labkesda  
 Rev. No. 01/ Januari 2006

Jakarta, 31 Mei 2016  
**SE. LABORATORIUM KESMAS**  
  
 Hasfiah Fattah, SSI  
 NIP. 1976031820060442016

### Lampiran 10 Uji Statistik Apoptosis

Descriptives			
	Kelompok	Statistic	Std. Error
	Mean	740.1567	57.53761
	95% Confidence Interval for Lower Bound	492.5923	
	Mean Upper Bound	987.7210	
	5% Trimmed Mean	.	
	Median	713.4400	
	Variance	9931.729	
normal	Std. Deviation	99.65806	
	Minimum	656.58	
	Maximum	850.45	
	Range	193.87	
	Interquartile Range	.	
	Skewness	1.120	1.225
	Kurtosis	.	
	Mean	505.8733	4.38221
	95% Confidence Interval for Lower Bound	487.0182	
caspase	Mean Upper Bound	524.7285	
	5% Trimmed Mean	.	
	Median	502.7900	
	Variance	57.611	
negatif	Std. Deviation	7.59021	
	Minimum	500.31	
	Maximum	514.52	
	Range	14.21	
	Interquartile Range	.	
	Skewness	1.526	1.225
	Kurtosis	.	
	Mean	811.3833	59.43218
	95% Confidence Interval for Lower Bound	555.6673	
aspirin	Mean Upper Bound	1067.0994	
	5% Trimmed Mean	.	
	Median	806.8600	

Universitas Indonesia

	Variance		10596.554	
	Std. Deviation		102.93956	
	Minimum		710.78	
	Maximum		916.51	
	Range		205.73	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		.197	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		622.0033	23.11649
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	522.5411	
		Upper Bound	721.4656	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		625.9200	
	Variance		1603.116	
EK1	Std. Deviation		40.03893	
	Minimum		580.15	
	Maximum		659.94	
	Range		79.79	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		-.436	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		797.0567	32.01373
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	659.3127	
		Upper Bound	934.8006	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		817.8800	
	Variance		3074.638	
EK2	Std. Deviation		55.44942	
	Minimum		734.21	
	Maximum		839.08	
	Range		104.87	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		-1.452	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		699.1967	42.02504
EK3	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	518.3775	
		Upper Bound	880.0158	

	5% Trimmed Mean		
	Median	663.9500	
	Variance	5298.312	
	Std. Deviation	72.78950	
	Minimum	650.74	
	Maximum	782.90	
	Range	132.16	
	Interquartile Range		
	Skewness	1.668	1.225
	Kurtosis		
	Mean	653.4300	65.17787
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	372.9922
		Upper Bound	933.8678
	5% Trimmed Mean		
	Median	630.7200	
	Variance	12744.465	
EB1	Std. Deviation	112.89139	
	Minimum	553.62	
	Maximum	775.95	
	Range	222.33	
	Interquartile Range		
	Skewness	.869	1.225
	Kurtosis		
	Mean	535.2100	46.50510
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	335.1147
		Upper Bound	735.3053
	5% Trimmed Mean		
	Median	523.3800	
	Variance	6488.173	
EB2	Std. Deviation	80.54919	
	Minimum	461.23	
	Maximum	621.02	
	Range	159.79	
	Interquartile Range		
	Skewness	.647	1.225
	Kurtosis		
EB3	Mean	537.4700	58.05678

95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	287.6718	
	Upper Bound	787.2682	
5% Trimmed Mean		.	
Median		585.9200	
Variance		10111.770	
Std. Deviation		100.55730	
Minimum		421.86	
Maximum		604.63	
Range		182.77	
Interquartile Range		.	
Skewness		-1.665	1.225
Kurtosis		.	.

### Descriptives

Caspase

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					normal	3		
negatif	3	505.8733	7.59021	4.38221	487.0182	524.7285	500.31	514.52
aspirin	3	811.3833	102.93956	59.43218	555.6673	1067.0994	710.78	916.51
EK1	3	622.0033	40.03893	23.11649	522.5411	721.4656	580.15	659.94
EK2	3	797.0567	55.44942	32.01373	659.3127	934.8006	734.21	839.08
EK3	3	699.4967	72.78950	42.02504	518.3775	880.0158	650.74	782.90
EB1	3	653.4300	112.89139	65.17787	372.9922	933.8678	553.62	775.95
EB2	3	535.2100	80.54919	46.50510	335.1147	735.3053	461.23	621.02
EB3	3	537.4700	100.55730	58.05678	287.6718	787.2682	421.86	604.63
Total	27	655.7533	129.46618	24.91578	604.5382	706.9684	421.86	916.51

### ANOVA

caspase

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	315986.075	8	39498.259	5.934	.001
Within Groups	119812.737	18	6656.263		
Total	435798.812	26			

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: caspase

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
normal	negatif	234.28333*	66.61463	.049	.8749	467.6918
	aspirin	-71.22667	66.61463	.972	-304.6351	162.1818
	EK1	118.15333	66.61463	.697	-115.2551	351.5618
	EK2	-56.90000	66.61463	.993	-290.3085	176.5085
	EK3	40.96000	66.61463	.999	-192.4485	274.3685
	EB1	86.72667	66.61463	.918	-146.6818	320.1351
	EB2	204.94667	66.61463	.112	-28.4618	438.3551
	EB3	202.68667	66.61463	.119	-30.7218	436.0951
	normal	-234.28333*	66.61463	.049	-467.6918	-.8749
negatif	aspirin	305.51000*	66.61463	.006	-538.9185	-72.1015
	EK1	-116.13000	66.61463	.715	-349.5385	117.2785
	EK2	-291.18333*	66.61463	.009	-524.5918	-57.7749
	EK3	-193.32333	66.61463	.153	-426.7318	40.0851
	EB1	-147.55667	66.61463	.436	-380.9651	85.8518
	EB2	-29.33667	66.61463	1.000	-262.7451	204.0718
	EB3	-31.59667	66.61463	1.000	-265.0051	201.8118
	normal	71.22667	66.61463	.972	-162.1818	304.6351
	negatif	305.51000*	66.61463	.006	72.1015	538.9185
aspirin	EK1	189.38000	66.61463	.169	-44.0285	422.7885
	EK2	14.32667	66.61463	1.000	-219.0818	247.7351
	EK3	112.18667	66.61463	.748	-121.2218	345.5951
	EB1	157.95333	66.61463	.354	-75.4551	391.3618
	EB2	276.17333*	66.61463	.014	42.7649	509.5818
	EB3	273.91333*	66.61463	.015	40.5049	507.3218
	normal	-118.15333	66.61463	.697	-351.5618	115.2551
	negatif	116.13000	66.61463	.715	-117.2785	349.5385
	aspirin	-189.38000	66.61463	.169	-422.7885	44.0285
EK1	EK2	-175.05333	66.61463	.241	-408.4618	58.3551
	EK3	-77.19333	66.61463	.956	-310.6018	156.2151
	EB1	-31.42667	66.61463	1.000	-264.8351	201.9818
	EB2	86.79333	66.61463	.918	-146.6151	320.2018
	EB3	84.53333	66.61463	.928	-148.8751	317.9418
	normal	56.90000	66.61463	.993	-176.5085	290.3085
EK2	negatif	291.18333*	66.61463	.009	57.7749	524.5918

Universitas Indonesia

	aspirin	-14.32667	66.61463	1.000	-247.7351	219.0818
	EK1	175.05333	66.61463	.241	-58.3551	408.4618
	EK3	97.86000	66.61463	.855	-135.5485	331.2685
	EB1	143.62667	66.61463	.470	-89.7818	377.0351
	EB2	261.84667*	66.61463	.021	28.4382	495.2551
	EB3	259.58667*	66.61463	.023	26.1782	492.9951
	normal	-40.96000	66.61463	.999	-274.3685	192.4485
	negatif	193.32333	66.61463	.153	-40.0851	426.7318
	aspirin	-112.18667	66.61463	.748	-345.5951	121.2218
EK3	EK1	77.19333	66.61463	.956	-156.2151	310.6018
	EK2	-97.86000	66.61463	.855	-331.2685	135.5485
	EB1	45.76667	66.61463	.998	-187.6418	279.1751
	EB2	163.98667	66.61463	.311	-69.4218	397.3951
	EB3	161.72667	66.61463	.327	-71.6818	395.1351
	normal	-86.72667	66.61463	.918	-320.1351	146.6818
	negatif	147.55667	66.61463	.436	-85.8518	380.9651
	aspirin	-157.95333	66.61463	.354	-391.3618	75.4551
	EK1	31.42667	66.61463	1.000	-201.9818	264.8351
	EK2	-143.62667	66.61463	.470	-377.0351	89.7818
	EK3	-45.76667	66.61463	.998	-279.1751	187.6418
	EB2	118.22000	66.61463	.697	-115.1885	351.6285
EB3	115.96000	66.61463	.716	-117.4485	349.3685	
	normal	-204.94667	66.61463	.112	-438.3551	28.4618
	negatif	29.33667	66.61463	1.000	-204.0718	262.7451
	aspirin	-276.17333	66.61463	.014	-509.5818	-42.7649
EB1	EK1	-86.79333	66.61463	.918	-320.2018	146.6151
	EK2	-261.84667	66.61463	.021	-495.2551	-28.4382
	EK3	-163.98667	66.61463	.311	-397.3951	69.4218
	EB1	-118.22000	66.61463	.697	-351.6285	115.1885
	EB3	-2.26000	66.61463	1.000	-235.6685	231.1485
	normal	-202.68667	66.61463	.119	-436.0951	30.7218
	negatif	31.59667	66.61463	1.000	-201.8118	265.0051
	aspirin	-273.91333*	66.61463	.015	-507.3218	-40.5049
EB2	EK1	-84.53333	66.61463	.928	-317.9418	148.8751
	EK2	-259.58667*	66.61463	.023	-492.9951	-26.1782
	EK3	-161.72667	66.61463	.327	-395.1351	71.6818
	EB1	-115.96000	66.61463	.716	-349.3685	117.4485
	EB2	2.26000	66.61463	1.000	-231.1485	235.6685
	EB3					

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

## Lampiran 11 Uji Statistik Displasia

Descriptives			
	kelompok	Statistic	Std. Error
		Mean	.1000
		95% Confidence Interval for Lower Bound	-.3303
		Mean Upper Bound	.5303
		5% Trimmed Mean	.
		Median	.0000
		Variance	.030
	normal	Std. Deviation	.17321
		Minimum	.00
		Maximum	.30
		Range	.30
		Interquartile Range	.
		Skewness	1.732
		Kurtosis	.
		Mean	2.2333
		95% Confidence Interval for Lower Bound	-.2549
		Mean Upper Bound	4.7216
	displasia	5% Trimmed Mean	.
		Median	2.3000
		Variance	1.003
	negatif	Std. Deviation	1.00167
		Minimum	1.20
		Maximum	3.20
		Range	2.00
		Interquartile Range	.
		Skewness	-.298
		Kurtosis	.
		Mean	.3667
		95% Confidence Interval for Lower Bound	.2232
		Mean Upper Bound	.5101
	aspirin	5% Trimmed Mean	.
		Median	.4000
		Variance	.003
		Std. Deviation	.05774



	Minimum		.30	
	Maximum		.40	
	Range		.10	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		-1.732	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		1.2000	.32146
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-.1831	
		Upper Bound	2.5831	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		1.1000	
	Variance		.310	
EK1	Std. Deviation		.55678	
	Minimum		.70	
	Maximum		1.80	
	Range		1.10	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		.782	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		.7433	.16697
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-.0249	
		Upper Bound	1.4617	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		.8000	
	Variance		.084	
EK2	Std. Deviation		.28919	
	Minimum		.43	
	Maximum		1.00	
	Range		.57	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		-.848	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		.2933	.09684
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-.1233	
EK3		Upper Bound	.7100	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		.3800	

	Variance		.028	
	Std. Deviation		.16773	
	Minimum		.10	
	Maximum		.40	
	Range		.30	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		-1.704	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		1.2333	.83533
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-2.3608	
		Upper Bound	4.8275	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		.5000	
	Variance		2.093	
EB1	Std. Deviation		1.44684	
	Minimum		.30	
	Maximum		2.90	
	Range		2.60	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		1.695	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		.8333	.26667
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-.3140	
		Upper Bound	1.9807	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		1.1000	
	Variance		.213	
EB2	Std. Deviation		.46188	
	Minimum		.30	
	Maximum		1.10	
	Range		.80	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		-1.732	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		.3667	.21858
EB3	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-.5738	
		Upper Bound	1.3071	

5% Trimmed Mean	.	
Median	.2000	
Variance	.143	
Std. Deviation	.37859	
Minimum	.10	
Maximum	.80	
Range	.70	
Interquartile Range	.	
Skewness	1.597	1.225
Kurtosis	.	.

### Descriptives

Displasia

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Normal	3	.1000	.17321	.10000	-.3303	.5303	.00	.30
Negative	3	2.2333	1.00167	.57831	-.2549	4.7216	1.20	3.20
Aspirin	3	.3667	.05774	.03333	.2232	.5101	.30	.40
grobogan1	3	1.2000	.55678	.32146	-.1831	2.5831	.70	1.80
grobogan2	3	.7433	.28919	.16697	.0249	1.4617	.43	1.00
grobogan3	3	.2933	.16773	.09684	-.1233	.7100	.10	.40
komersil1	3	1.2333	1.44684	.83533	-2.3608	4.8275	.30	2.90
komersil2	3	.8333	.46188	.26667	-.3140	1.9807	.30	1.10
komersil3	3	.3667	.37859	.21858	-.5738	1.3071	.10	.80
Total	27	.8189	.84110	.16187	.4862	1.1516	.00	3.20

### ANOVA

Displasia

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.577	8	1.322	3.044	.024
Within Groups	7.817	18	.434		
Total	18.394	26			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: displasia

	(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	normal	negatif	-2.13333 <sup>*</sup>	.53806	.001	-3.2638	-1.0029
		aspirin	-.26667	.53806	.626	-1.3971	.8638
		grobogan1	-1.10000	.53806	.056	-2.2304	.0304
		grobogan2	-.64333	.53806	.247	-1.7738	.4871
		grobogan3	-.19333	.53806	.724	-1.3238	.9371
		komersil1	-1.13333 <sup>*</sup>	.53806	.049	-2.2638	-.0029
		komersil2	-.73333	.53806	.190	-1.8638	.3971
		komersil3	-.26667	.53806	.626	-1.3971	.8638
		normal	2.13333 <sup>*</sup>	.53806	.001	1.0029	3.2638
		aspirin	1.86667 <sup>*</sup>	.53806	.003	.7362	2.9971
	negatif	grobogan1	1.03333	.53806	.071	-.0971	2.1638
		grobogan2	1.49000 <sup>*</sup>	.53806	.013	.3596	2.6204
		grobogan3	1.94000 <sup>*</sup>	.53806	.002	.8096	3.0704
		komersil1	1.00000	.53806	.080	-.1304	2.1304
		komersil2	1.40000 <sup>*</sup>	.53806	.018	.2696	2.5304
		komersil3	1.86667 <sup>*</sup>	.53806	.003	.7362	2.9971
		normal	.26667	.53806	.626	-.8638	1.3971
		negatif	-1.86667 <sup>*</sup>	.53806	.003	-2.9971	-.7362
		grobogan1	-.83333	.53806	.139	-1.9638	.2971
		grobogan2	-.37667	.53806	.493	-1.5071	.7538
	aspirin	grobogan3	.07333	.53806	.893	-1.0571	1.2038
		komersil1	-.86667	.53806	.125	-1.9971	.2638
		komersil2	-.46667	.53806	.397	-1.5971	.6638
		komersil3	.00000	.53806	1.000	-1.1304	1.1304
		normal	1.10000	.53806	.056	-.0304	2.2304
		negatif	-1.03333	.53806	.071	-2.1638	.0971
		aspirin	-.83333	.53806	.139	-.2971	1.9638
		grobogan1	.45667	.53806	.407	-.6738	1.5871
		grobogan2	.90667	.53806	.109	-.2238	2.0371
		komersil1	-.03333	.53806	.951	-1.1638	1.0971
grobogan1	komersil2	.36667	.53806	.504	-.7638	1.4971	
	komersil3	.83333	.53806	.139	-.2971	1.9638	
	normal	.64333	.53806	.247	-.4871	1.7738	
	negatif	-1.49000 <sup>*</sup>	.53806	.013	-2.6204	-.3596	
	aspirin	.37667	.53806	.493	-.7538	1.5071	
	grobogan1	-.45667	.53806	.407	-1.5871	.6738	

	grobogan3	.45000	.53806	.414	-.6804	1.5804	
	komersil1	-.49000	.53806	.375	-1.6204	.6404	
	komersil2	-.09000	.53806	.869	-1.2204	1.0404	
	komersil3	.37667	.53806	.493	-.7538	1.5071	
	normal	.19333	.53806	.724	-.9371	1.3238	
	negatif	-1.94000*	.53806	.002	-3.0704	-.8096	
	aspirin	-.07333	.53806	.893	-1.2038	1.0571	
grobogan3	grobogan1	-.90667	.53806	.109	-2.0371	.2238	
	grobogan2	-.45000	.53806	.414	-1.5804	.6804	
	komersil1	-.94000	.53806	.098	-2.0704	.1904	
	komersil2	-.54000	.53806	.329	-1.6704	.5904	
	komersil3	-.07333	.53806	.893	-1.2038	1.0571	
	normal	1.13333	.53806	.049	.0029	2.2638	
	negatif	-1.00000	.53806	.080	-2.1304	.1304	
	aspirin	.86667	.53806	.125	-.2638	1.9971	
	komersil1	grobogan1	.03333	.53806	.951	-1.0971	1.1638
		grobogan2	.49000	.53806	.375	-.6404	1.6204
grobogan3		.94000	.53806	.098	-.1904	2.0704	
komersil2		.40000	.53806	.467	-.7304	1.5304	
komersil3		.86667	.53806	.125	-.2638	1.9971	
normal		.73333	.53806	.190	-.3971	1.8638	
negatif		-1.40000*	.53806	.018	-2.5304	-.2696	
aspirin		.46667	.53806	.397	-.6638	1.5971	
komersil2		grobogan1	-.36667	.53806	.504	-1.4971	.7638
		grobogan2	.09000	.53806	.869	-1.0404	1.2204
	grobogan3	.54000	.53806	.329	-.5904	1.6704	
	komersil1	-.40000	.53806	.467	-1.5304	.7304	
	komersil3	.46667	.53806	.397	-.6638	1.5971	
	normal	.26667	.53806	.626	-.8638	1.3971	
	negatif	-1.86667*	.53806	.003	-2.9971	-.7362	
	aspirin	.00000	.53806	1.000	-1.1304	1.1304	
	komersil3	grobogan1	-.83333	.53806	.139	-1.9638	.2971
		grobogan2	-.37667	.53806	.493	-1.5071	.7538
grobogan3		.07333	.53806	.893	-1.0571	1.2038	
komersil1		-.86667	.53806	.125	-1.9971	.2638	
komersil2		-.46667	.53806	.397	-1.5971	.6638	

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

### Lampiran 11 Uji Statistik Mitosis

Descriptives			
	Kelompok	Statistic	Std. Error
		Mean	.51962
		95% Confidence Interval for Mean	
		Lower Bound	.6643
		Upper Bound	5.1357
		5% Trimmed Mean	.
		Median	2.9000
		Variance	1.810
	normal	Std. Deviation	.90000
		Minimum	2.00
		Maximum	3.80
		Range	1.80
		Interquartile Range	.
		Skewness	.000
		Kurtosis	1.225
		Mean	.63333
		95% Confidence Interval for Mean	
		Lower Bound	4.6083
		Upper Bound	10.0583
		5% Trimmed Mean	.
		Median	7.7000
		Variance	1.203
	negatif	Std. Deviation	1.09697
		Minimum	6.10
		Maximum	8.20
		Range	2.10
		Interquartile Range	.
		Skewness	-1.336
		Kurtosis	1.225
		Mean	1.14649
		95% Confidence Interval for Mean	
		Lower Bound	-1.5663
		Upper Bound	8.2996
		5% Trimmed Mean	.

Universitas Indonesia

	Median		3.8000	
	Variance		3.943	
	Std. Deviation		1.98578	
	Minimum		1.20	
	Maximum		5.10	
	Range		3.90	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		-.935	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		4.3333	.87623
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.5632	
		Upper Bound	8.1034	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		4.6000	
	Variance		2.308	
EK1	Std. Deviation		1.51767	
	Minimum		2.70	
	Maximum		5.70	
	Range		3.00	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		-.766	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		4.3333	.13333
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	3.7596	
		Upper Bound	4.9070	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		4.2000	
	Variance		.053	
EK2	Std. Deviation		.23094	
	Minimum		4.20	
	Maximum		4.60	
	Range		.40	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		1.732	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		2.2667	.15191
EK3	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.6130	

	Mean	Upper Bound	2.9203	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		2.1300	
	Variance		.069	
	Std. Deviation		.26312	
	Minimum		2.10	
	Maximum		2.57	
	Range		.47	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		1.707	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		4.1333	.84525
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	.4965	
	Mean	Upper Bound	7.7701	
	5% Trimmed Mean			
	Median		3.9000	
	Variance		2.143	
EB1	Std. Deviation		1.46401	
	Minimum		2.80	
	Maximum		5.70	
	Range		2.90	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		.699	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		4.4333	.24037
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	3.3991	
	Mean	Upper Bound	5.4676	
	5% Trimmed Mean			
	Median		4.3000	
	Variance		.173	
EB2	Std. Deviation		.41633	
	Minimum		4.10	
	Maximum		4.90	
	Range		.80	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		1.293	1.225
	Kurtosis		.	.



	Mean	4.7667	1.07445
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound .1437	Upper Bound 9.3897
	5% Trimmed Mean		
	Median	5.0000	
	Variance	3.463	
EB3	Std. Deviation	1.86100	
	Minimum	2.80	
	Maximum	6.50	
	Range	3.70	
	Interquartile Range		
	Skewness	-.555	1.225
	Kurtosis		

### Descriptives

mitosis	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					normal	3		
negatif	3	7.3333	1.09697	.63333	4.6083	10.0583	6.10	8.20
aspirin	3	3.3667	1.98578	1.14649	-1.5663	8.2996	1.20	5.10
EK1	3	4.3333	1.51767	.87623	.5632	8.1034	2.70	5.70
EK2	3	4.3333	.23094	.13333	3.7596	4.9070	4.20	4.60
EK3	3	2.2667	.26312	.15191	1.6130	2.9203	2.10	2.57
EB1	3	4.1333	1.46401	.84525	.4965	7.7701	2.80	5.70
EB2	3	4.4333	.41633	.24037	3.3991	5.4676	4.10	4.90
EB3	3	4.7667	1.86100	1.07445	.1437	9.3897	2.80	6.50
Total	27	4.2074	1.72527	.33203	3.5249	4.8899	1.20	8.20

### ANOVA

mitosis	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	49.065	8	6.133	3.897	.008
Within Groups	28.325	18	1.574		
Total	77.390	26			

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: mitosis

Tukey HSD

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
normal	negatif	-4.43333*	1.02425	.009	-8.0221	-.8445
	aspirin	-.46667	1.02425	1.000	-4.0555	3.1221
	EK1	-1.43333	1.02425	.884	-5.0221	2.1555
	EK2	-1.43333	1.02425	.884	-5.0221	2.1555
	EK3	.63333	1.02425	.999	-2.9555	4.2221
	EB1	-1.23333	1.02425	.945	-4.8221	2.3555
	EB2	-1.53333	1.02425	.843	-5.1221	2.0555
	EB3	-1.86667	1.02425	.669	-5.4555	1.7221
	normal	4.43333*	1.02425	.009	.8445	8.0221
negatif	aspirin	3.96667	1.02425	.024	1.3779	7.5555
	EK1	3.00000	1.02425	.146	-.5888	6.5888
	EK2	3.00000	1.02425	.146	-.5888	6.5888
	EK3	5.06667*	1.02425	.003	1.4779	8.6555
	EB1	3.20000	1.02425	.103	-.3888	6.7888
	EB2	2.90000	1.02425	.173	-.6888	6.4888
	EB3	2.56667	1.02425	.291	-1.0221	6.1555
	normal	.46667	1.02425	1.000	-3.1221	4.0555
	negatif	-3.96667	1.02425	.024	-7.5555	-.3779
aspirin	EK1	-.96667	1.02425	.987	-4.5555	2.6221
	EK2	-.96667	1.02425	.987	-4.5555	2.6221
	EK3	1.10000	1.02425	.971	-2.4888	4.6888
	EB1	-.76667	1.02425	.997	-4.3555	2.8221
	EB2	-1.06667	1.02425	.976	-4.6555	2.5221
	EB3	-1.40000	1.02425	.896	-4.9888	2.1888
	normal	1.43333	1.02425	.884	-2.1555	5.0221
	negatif	-3.00000	1.02425	.146	-6.5888	-.5888
	aspirin	.96667	1.02425	.987	-2.6221	4.5555
EK1	EK2	.00000	1.02425	1.000	-3.5888	3.5888
	EK3	2.06667	1.02425	.551	-1.5221	5.6555
	EB1	.20000	1.02425	1.000	-3.3888	3.7888
	EB2	-.10000	1.02425	1.000	-3.6888	3.4888
	EB3	-.43333	1.02425	1.000	-4.0221	3.1555
	EK2	normal	1.43333	1.02425	.884	-2.1555

Universitas Indonesia

	negatif	-3.00000	1.02425	.146	-6.5888	.5888
	aspirin	.96667	1.02425	.987	-2.6221	4.5555
	EK1	.00000	1.02425	1.000	-3.5888	3.5888
	EK3	2.06667	1.02425	.551	-1.5221	5.6555
	EB1	.20000	1.02425	1.000	-3.3888	3.7888
	EB2	-.10000	1.02425	1.000	-3.6888	3.4888
	EB3	-.43333	1.02425	1.000	-4.0221	3.1555
	normal	-.63333	1.02425	.999	-4.2221	2.9555
	negatif	-5.06667*	1.02425	.003	-8.6555	-1.4779
	aspirin	-1.10000	1.02425	.971	-4.6888	2.4888
EK3	EK1	-2.06667	1.02425	.551	-5.6555	1.5221
	EK2	-2.06667	1.02425	.551	-5.6555	1.5221
	EB1	-1.86667	1.02425	.669	-5.4555	1.7221
	EB2	-2.16667	1.02425	.493	-5.7555	1.4221
	EB3	-2.50000	1.02425	.321	-6.0888	1.0888
	normal	1.23333	1.02425	.945	-2.3555	4.8221
	negatif	-3.20000	1.02425	.103	-6.7888	.3888
	aspirin	.76667	1.02425	.997	-2.8221	4.3555
EB1	EK1	-.20000	1.02425	1.000	-3.7888	3.3888
	EK2	-.20000	1.02425	1.000	-3.7888	3.3888
	EK3	1.86667	1.02425	.669	-1.7221	5.4555
	EB2	-.30000	1.02425	1.000	-3.8888	3.2888
	EB3	-.63333	1.02425	.999	-4.2221	2.9555
	normal	1.53333	1.02425	.843	-2.0555	5.1221
	negatif	-2.90000	1.02425	.173	-6.4888	.6888
	aspirin	1.06667	1.02425	.976	-2.5221	4.6555
EB2	EK1	.10000	1.02425	1.000	-3.4888	3.6888
	EK2	.10000	1.02425	1.000	-3.4888	3.6888
	EK3	2.16667	1.02425	.493	-1.4221	5.7555
	EB1	.30000	1.02425	1.000	-3.2888	3.8888
	EB3	-.33333	1.02425	1.000	-3.9221	3.2555
	normal	1.86667	1.02425	.669	-1.7221	5.4555
	negatif	-2.56667	1.02425	.291	-6.1555	1.0221
	aspirin	1.40000	1.02425	.896	-2.1888	4.9888
EB3	EK1	.43333	1.02425	1.000	-3.1555	4.0221
	EK2	.43333	1.02425	1.000	-3.1555	4.0221
	EK3	2.50000	1.02425	.321	-1.0888	6.0888
	EB1	.63333	1.02425	.999	-2.9555	4.2221
	EB2	.33333	1.02425	1.000	-3.2555	3.9221

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

## Lampiran 12 Uji Statistik Hiperplasia

Descriptives			
	Kelompok	Statistic	Std. Error
		Mean	.0667
		95% Confidence Interval for Lower Bound	-.2202
		Mean Upper Bound	.3535
		5% Trimmed Mean	.
		Median	.0000
		Variance	.013
	normal	Std. Deviation	.11547
		Minimum	.00
		Maximum	.20
		Range	.20
		Interquartile Range	.
		Skewness	1.732
		Kurtosis	.
		Mean	4.1367
		95% Confidence Interval for Lower Bound	3.7597
		Mean Upper Bound	4.5137
	hiperplasia	5% Trimmed Mean	.
		Median	4.1100
		Variance	.023
	negatif	Std. Deviation	.15177
		Minimum	4.00
		Maximum	4.30
		Range	.30
		Interquartile Range	.
		Skewness	.766
		Kurtosis	.
		Mean	.5467
		95% Confidence Interval for Lower Bound	-.0006
		Mean Upper Bound	1.0939
	aspirin	5% Trimmed Mean	.
		Median	.4400
		Variance	.049
		Std. Deviation	.22030

	Minimum		.40	
	Maximum		.80	
	Range		.40	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		1.668	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		1.1333	.94045
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	-2.9131	
	Mean	Upper Bound	5.1798	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		.4000	
	Variance		2.653	
EK1	Std. Deviation		1.62891	
	Minimum		.00	
	Maximum		3.00	
	Range		3.00	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		1.615	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		.7000	.20817
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	-.1957	
	Mean	Upper Bound	1.5957	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		.8000	
	Variance		.130	
EK2	Std. Deviation		.36056	
	Minimum		.30	
	Maximum		1.00	
	Range		.70	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		-1.152	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		.4900	.10693
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	.0299	
EK3	Mean	Upper Bound	.9501	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		.5000	

	Variance		.034	
	Std. Deviation		.18520	
	Minimum		.30	
	Maximum		.67	
	Range		.37	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		-.242	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		2.8333	.53645
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.5252	
		Upper Bound	5.1415	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		3.1000	
	Variance		.863	
EB1	Std. Deviation		.92916	
	Minimum		1.80	
	Maximum		3.60	
	Range		1.80	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		-1.185	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		1.9000	.15275
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.2428	
		Upper Bound	2.5572	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		1.8000	
	Variance		.070	
EB2	Std. Deviation		.26458	
	Minimum		1.70	
	Maximum		2.20	
	Range		.50	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		1.458	1.225
	Kurtosis		.	.
	Mean		1.3000	.40000
EB3	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-.4211	
		Upper Bound	3.0211	

5% Trimmed Mean	.	
Median	.9000	
Variance	.480	
Std. Deviation	.69282	
Minimum	.90	
Maximum	2.10	
Range	1.20	
Interquartile Range	.	
Skewness	1.732	1.225
Kurtosis	.	

### Descriptives

#### Hyperplasia

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
normal	3	.0667	.11547	.06667	-.2202	.3535	.00	.20
negatif	3	4.1367	.15177	.08762	3.7597	4.5137	4.00	4.30
aspirin	3	.5467	.22030	.12719	-.0006	1.0939	.40	.80
EK1	3	1.1333	1.62891	.94045	-2.9131	5.1798	.00	3.00
EK2	3	.7000	.36056	.20817	-.1957	1.5957	.30	1.00
EK3	3	.4900	.18520	.10693	.0299	.9501	.30	.67
EB1	3	2.8333	.92916	.53645	.5252	5.1415	1.80	3.60
EB2	3	1.9000	.26458	.15275	1.2428	2.5572	1.70	2.20
EB3	3	1.3000	.69282	.40000	-.4211	3.0211	.90	2.10
Total	27	1.4563	1.38179	.26593	-.9097	2.0029	.00	4.30

### ANOVA

#### Hyperplasia

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	41.011	8	5.126	10.690	.000
Within Groups	8.632	18	.480		
Total	49.643	26			

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: hiperplasia

Tukey HSD

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
normal	negatif	-4.07000 <sup>*</sup>	.56541	.000	-6.0511	-2.0889
	aspirin	-.48000	.56541	.993	-2.4611	1.5011
	EK1	-1.06667	.56541	.630	-3.0478	.9145
	EK2	-.63333	.56541	.963	-2.6145	1.3478
	EK3	-.42333	.56541	.997	-2.4045	1.5578
	EB1	-2.76667 <sup>*</sup>	.56541	.003	-4.7478	-.7855
	EB2	-1.83333	.56541	.083	-3.8145	.1478
	EB3	-1.23333	.56541	.455	-3.2145	.7478
	normal	4.07000 <sup>*</sup>	.56541	.000	2.0889	6.0511
negatif	aspirin	3.59000 <sup>*</sup>	.56541	.000	1.6089	5.5711
	EK1	3.00333 <sup>*</sup>	.56541	.001	1.0222	4.9845
	EK2	3.43667 <sup>*</sup>	.56541	.000	1.4555	5.4178
	EK3	3.64667 <sup>*</sup>	.56541	.000	1.6655	5.6278
	EB1	1.30333	.56541	.388	-.6778	3.2845
	EB2	2.23667 <sup>*</sup>	.56541	.020	.2555	4.2178
	EB3	2.83667 <sup>*</sup>	.56541	.002	.8555	4.8178
	normal	.48000	.56541	.993	-1.5011	2.4611
	negatif	-3.59000 <sup>*</sup>	.56541	.000	-5.5711	-1.6089
aspirin	EK1	-.58667	.56541	.976	-2.5678	1.3945
	EK2	-.15333	.56541	1.000	-2.1345	1.8278
	EK3	.05667	.56541	1.000	-1.9245	2.0378
	EB1	-2.28667	.56541	.017	-4.2678	-.3055
	EB2	-1.35333	.56541	.343	-3.3345	.6278
	EB3	-.75333	.56541	.908	-2.7345	1.2278
	normal	1.06667	.56541	.630	-.9145	3.0478
	negatif	-3.00333 <sup>*</sup>	.56541	.001	-4.9845	-1.0222
	aspirin	.58667	.56541	.976	-1.3945	2.5678
EK1	EK2	.43333	.56541	.997	-1.5478	2.4145
	EK3	.64333	.56541	.960	-1.3378	2.6245
	EB1	-1.70000	.56541	.127	-3.6811	-.2811
	EB2	-.76667	.56541	.900	-2.7478	1.2145
	EB3	-.16667	.56541	1.000	-2.1478	1.8145
	normal	.63333	.56541	.963	-1.3478	2.6145
EK2	negatif	-3.43667 <sup>*</sup>	.56541	.000	-5.4178	-1.4555
	aspirin	.15333	.56541	1.000	-1.8278	2.1345

Universitas Indonesia



	EK1	-.43333	.56541	.997	-2.4145	1.5478
	EK3	.21000	.56541	1.000	-1.7711	2.1911
	EB1	-2.13333*	.56541	.029	-4.1145	-.1522
	EB2	-1.20000	.56541	.489	-3.1811	.7811
	EB3	-.60000	.56541	.973	-2.5811	1.3811
	normal	.42333	.56541	.997	-1.5578	2.4045
	negatif	-3.64667*	.56541	.000	-5.6278	-1.6655
	aspirin	-.05667	.56541	1.000	-2.0378	1.9245
EK3	EK1	-.64333	.56541	.960	-2.6245	1.3378
	EK2	-.21000	.56541	1.000	-2.1911	1.7711
	EB1	-2.34333*	.56541	.014	-4.3245	-.3622
	EB2	-1.41000	.56541	.297	-3.3911	.5711
	EB3	-.81000	.56541	.871	-2.7911	1.1711
	normal	2.76667*	.56541	.003	.7855	4.7478
	negatif	-1.30333	.56541	.388	-3.2845	.6778
	aspirin	2.28667*	.56541	.017	.3055	4.2678
EB1	EK1	1.70000	.56541	.127	-.2811	3.6811
	EK2	2.13333*	.56541	.029	.1522	4.1145
	EK3	2.34333*	.56541	.014	.3622	4.3245
	EB2	.93333	.56541	.766	-1.0478	2.9145
	EB3	1.53333	.56541	.211	-.4478	3.5145
	normal	1.83333	.56541	.083	-.1478	3.8145
	negatif	-2.23667*	.56541	.020	-4.2178	-.2555
	aspirin	1.35333	.56541	.343	-.6278	3.3345
EB2	EK1	.76667	.56541	.900	-1.2145	2.7478
	EK2	1.20000	.56541	.489	-.7811	3.1811
	EK3	1.41000	.56541	.297	-.5711	3.3911
	EB1	-.93333	.56541	.766	-2.9145	1.0478
	EB3	.60000	.56541	.973	-1.3811	2.5811
	normal	1.23333	.56541	.455	-.7478	3.2145
	negatif	-2.83667*	.56541	.002	-4.8178	-.8555
	aspirin	.75333	.56541	.908	-1.2278	2.7345
EB3	EK1	.16667	.56541	1.000	-1.8145	2.1478
	EK2	.60000	.56541	.973	-1.3811	2.5811
	EK3	.81000	.56541	.871	-1.1711	2.7911
	EB1	-1.53333	.56541	.211	-3.5145	.4478
	EB2	-.60000	.56541	.973	-2.5811	1.3811

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