

**AKTIVITAS SPESIFIK ENZIM *MANGANESE SUPEROXIDE*
DISMUTASE (MnSOD) DAN HUBUNGANNYA DENGAN STRES
OKSIDATIF PADA KARSINOGENESIS PAYUDARA TIKUS YANG
DIINDUKSI DENGAN *DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene)***

TESIS

KHAIRUN NIDA, S.Si.,Apt.

NPM: 0706170740



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
JAKARTA
JUNI 2010**

PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Khairun Nida

NPM : 0706170740

Tanda tangan:



Tanggal : 14 Juni 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :

Nama : Khairun Nida

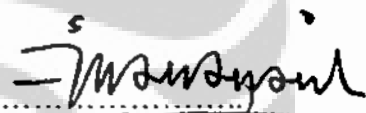
NPM : 070670740

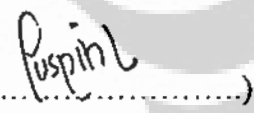
Program Studi : Biokimia dan Biologi Molekuler

Judul tesis : Aktivitas Spesifik Enzim *Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD)* dan hubungannya dengan stres oksidatif pada karsinogenesis payudara tikus yang diinduksi dengan *DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene)*.

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister pada program studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI:

Pembimbing I: Dr.rer physiol.dr. Septelia Inawati Wanandi (.....)

Pembimbing II: Dra. Puspita Eka Wuyung, MS. (.....)

Penguji I : Dr. Ani Retno Prijanti MS. (.....)

Penguji II : Prof.dr. Frans D Sujatna, SpFK,PhD (.....)

Penguji III : Dra. Ria Qodariah MS (.....)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 14 Juni 2010

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik

(Dr.rer physiol.dr. )
(Dr.rer physiol.dr. Septelia Inawati Wanandi)

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT karena atas berkat rahmat dan rahimNya saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Ilmu Biomedik pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Saya menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikannya.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. rer. physiol.dr. Septelia Inawati Wanandi, selaku dosen pembimbing I, sekaligus sebagai Ketua Program Studi Ilmu Biomedik FKUL. Terima kasih dan penghargaan atas segala bimbingan, curahan waktu, tenaga dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini serta kesempatan yang diberikan kepada saya untuk terlibat dalam penelitian beliau. Demikian juga kepada Dra. Puspita Eka Wuyung, MS., selaku dosen pembimbing II yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing saya selama ini serta almarhum dr. Rino Pattiatia Sp.PA. yang telah membantu analisis histopatologik jaringan payudara.

Tak lupa penulis ucapkan terima kasih kepada Ketua Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler FKUL, DR. dr. Sri Widya A. Jusman, MS., yang telah mengizinkan penulis memakai fasilitas departemen selama penelitian. Terima kasih juga kepada dr. Ani Retno Prijanti, MS selaku ketua kekhususan Biokimia dan Biologi Molekuler beserta seluruh staf pengajar dan teman-teman di departemen, dr.Reni, dr. Dewi, dr. Novi, Pak Ondi, Pak Yatin, Pak Usman, Mbak Erna, Nia dan Dewi. Juga kepada Yulia dan Agus yang bekerja sama selama masa kuliah dan penelitian.

Terima kasih penulis sampaikan kepada Direktur dan pudir-pudir di Poltekkes Departemen Kesehatan Jakarta II serta Ibu Dra. Tati Suprapti, Apt. selaku Ketua

Jurusan Farmasi yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk mendapatkan beasiswa untuk membiayai pendidikan ini.

Ucapan terima kasih yang terakhir kepada keluarga, suami tercinta, Muhamad Ambia, yang dengan rela meringankan beban saya selama ini. Terima kasih juga untuk anak-anakku yang selalu mengerti ketidak sempurnaan uminya, serta kakak-kakak, adik dan orang tua yang mengerti dengan kesibukan penulis selama ini. Akhir kata saya berharap semoga Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Jakarta, Juni 2010

Khairun Nida

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR
UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Khairun Nida

NPM : 0706170740

Program Studi : Ilmu Biomedik

Departemen : Biokimia dan Biologi Molekuler

Fakultas : Kedokteran

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:

Aktivitas Spesifik Enzim Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) dan hubungannya dengan stres oksidatif pada karsinogenesis payudara tikus yang diinduksi dengan DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene).

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di: Jakarta

Tanggal: 30 Juni 2010

Yang menyatakan


(Khairun Nida)

ABSTRAK

Nama : Khairun Nida
Program Studi : Ilmu Biomedik
Judul : Aktivitas Spesifik Enzim *Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD)* dan hubungannya dengan stres oksidatif pada karsinogenesis payudara tikus yang diinduksi dengan *DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene)*.

Tujuan: menganalisis aktivitas spesifik enzim MnSOD pada karsinogenesis payudara tikus yang diinduksi DMBA dan hubungannya dengan stres oksidatif.

Disain: penelitian eksperimental *in vivo* dengan menggunakan hewan coba.

Metode: Sampel penelitian ini adalah darah dan jaringan payudara tikus betina Sprague Dawley (*Rattus norvegicus L.*), yang diinduksi dengan 20 mg/kg BB DMBA dalam minyak jagung sebanyak 2, 4, 6, 8 dan 10 kali serta kelompok kontrol yang hanya diberikan minyak jagung secara oral. Dari sampel darah dan jaringan payudara diukur aktivitas MnSOD dengan kit RanSOD[®], enzim katalase, kadar MDA dan kadar asam sialat. Homogenat jaringan payudara diukur aktivitas spesifik enzim MnSOD dan katalase, kadar senyawa karbonil, MDA, asam sialat serta analisis jaringan histopatologi.

Hasil: Penurunan aktivitas spesifik enzim MnSOD pada darah secara bermakna, peningkatan yang tidak bermakna pada jaringan kemudian menurun bermakna, dan ada hubungan positif lemah antara aktivitas MnSOD di darah dan jaringan. Aktivitas enzim katalase plasma turun kemudian meningkat secara bermakna, dan menurun secara bermakna pada jaringan. Kadar MDA plasma darah mula-mula meningkat kemudian turun, pada jaringan payudara meningkat secara bermakna pada semua kelompok perlakuan. Kadar senyawa karbonil pada jaringan payudara yang diinduksi DMBA menurun pada semua kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol meski tidak bermakna secara statistik.

Kesimpulan: Aktivitas spesifik enzim MnSOD pada karsinogenesis kimia payudara tikus yang diinduksi dengan DMBA menurun bermakna pada darah dan jaringan. Ada hubungan antara aktivitas spesifik enzim MnSOD di darah dan jaringan dengan kadar asam sialat, derajat keganasan, MDA, senyawa karbonil dan aktivitas katalase.

Kata kunci: karsinogenesis kimia, aktivitas MnSOD, stres oksidatif

ABSTRACT

Name : Khairun Nida

Study Program : Biomedical Science

Title : Specific activity of *Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD)* in breast rat carcinoma induced by *DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene)* in relation to oxidative stress.

Background: The aim of this study is to analyze the specific activity of MnSOD in blood and rat's breast cell induced by chemical carcinogen DMBA related to oxidative stress.

Design: This is an in vivo experimental study.

Method: This study was conducted on 30 female Sprague Dawley rats which were divided into 6 groups and were induced twice, 4 times, 6 times, 8 times and 10 times by 20 mg/kg DMBA in corn oil orally. Rats were sacrificed 5 weeks after treatment, and the blood and breast were used for measurement of specific activity of MnSOD enzyme using RanSOD[®] kit and catalase, also the level of sialic acid, MDA, protein carbonyl and histopathology analysis.

Result: Determination of specific activity of MnSOD in blood and breast cells in the lower levels compare to the control group and there were positive weak relationship between specific activity of MnSOD in blood and breast cells. Specific activity of catalase was decrease in early carcinogenesis then increase in blood and increase in all treatment groups in breast cells. The plasma MDA level was lower than control group in early induction then decrease but increase in breast cells in all treatment groups. The protein carbonyl level was decrease in all treatment groups compare to control one.

Conclusion: Specific activity of MnSOD is decrease in blood and breast cells in rats induced by DMBA. There are relationships between specific activity of MnSOD and the level of sialic acid, MDA, protein carbonyl, score of histopathology and specific activity of catalase.

Keywords: chemical carcinogenesis, specific activity of MnSOD, stress oxidative.

DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN KARYA ILMIAH.....	vi
ABSTRAK.....	vii
<i>ABSTRACT</i>	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
DAFTAR SINGKATAN.....	xvii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah dan pertanyaan penelitian.....	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	5
1.5. Kerangka Konsep Penelitian.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Karsinogenesis.....	7
2.2. Karsinogenesis Kimia.....	9
2.3. DMBA.....	10

2.4. Asam Sialat.....	11
2.5. Radikal Bebas.....	15
2.6. Stres Oksidatif.....	16
2.6.1. MDA (Malondialdehid).....	16
2.6.2. Senyawa Dikarbonil.....	18
2.6.3. Kerusakan oksidatif DNA dan kanker.....	18
2.7. Karsinoma Payudara.....	20
2.8. Antioksidan.....	21
2.8.1. Enzim <i>MnSOD (Manganese Superoxide Dismutase)</i>	22
2.8.2. Enzim Katalase.....	24
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1. Rancangan dan Disain Penelitian	26
3.2. Tempat dan Waktu Penelitian.....	26
3.3. Populasi dan Sampel.....	26
3.4. Jumlah sampel.....	26
3.5. Bahan dan Cara Kerja	
3.5.1. Aklimatisasi dan Pemeliharaan Hewan Coba.....	27
3.5.2. Induksi kanker payudara dan pengambilan sampel.....	28
3.5.3. Pengukuran kadar asam sialat.....	28
3.5.4. Analisis histopatologi tumor	30
3.5.5. Pengukuran kadar malondialdehid.....	30
3.5.6. Pengukuran Kadar Senyawa Karbonil.....	31
3.5.7. Pengukuran Aktivitas Spesifik Enzim Katalase.....	32
3.5.8. Pengukuran Aktivitas Spesifik Enzim <i>MnSOD</i>	33

3.5.9. Analisis statistik.....	35
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1. Induksi karsinogenesis dengan DMBA dan skor histopatologi.....	36
4.2. Kadar Asam Sialat.....	42
4.4. Pemeriksaan Kadar Malondialdehid (MDA).....	48
4.5. Pemeriksaan Kadar Senyawa Karbonil.....	51
4.6. Aktivitas Spesifik Enzim Katalase.....	53
4.7. Aktivitas Spesifik Enzim MnSOD.....	56
4.8. Hubungan aktivitas spesifik MnSOD dengan asam sialat.....	60
4.9. Hubungan aktivitas spesifik MnSOD dengan skor histopatologi.....	63
4.10. Hubungan aktivitas spesifik MnSOD dengan MDA.....	65
4.11. Hubungan aktivitas spesifik MnSOD dengan senyawa karbonil.....	68
4.12. Hubungan aktivitas spesifik MnSOD dengan enzim katalase.....	69
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1. Kesimpulan.....	72
5.2. Saran.....	73
DAFTAR PUSTAKA.....	74
LAMPIRAN.....	78
RIWAYAT HIDUP.....	122

DAFTAR TABEL

halaman

Tabel 1. Skor perubahan histopatologi jaringan payudara tikus.....	30
Tabel 2. Jumlah, letak dan ukuran nodul payudara tikus yang diinduksi DMBA sebelum dilakukan pembedahan.....	37
Tabel 3. Rata-rata kejadian tumor dan jumlah nodul per ekor serta skor histopatologi pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.....	39



DAFTAR GAMBAR

	halaman
Gambar 2.1. Metabolisme DMBA menjadi senyawa mutagenik.....	11
Gambar 2.2. Struktur dasar asam sialat.....	12
Gambar 2.3. Siklus metabolisme asam sialat.....	13
Gambar 2.4. Biosintesis asam sialat.....	14
Gambar 2.5. Proses peroksidasi lipid oleh radikal hidroksil.....	17
Gambar 2.6. Pembentukan ROS dalam rantai pernafasan dan regulasinya oleh antioksidan endogen.....	22
Gambar 2.7. Detoksifikasi ROS oleh enzim SOD dan katalase.....	22
Gambar 4.1. Skor histopatologi jaringan payudara tikus	38
Gambar 4.2. Gambaran histopatologi jaringan payudara tikus dengan skor 1	40
Gambar 4.3. Gambaran histopatologi jaringan payudara tikus dengan skor 2 dan 3	41
Gambar 4.4. Gambaran histopatologi jaringan payudara tikus dengan skor 4 dan 5	42
Gambar 4.5. Spektrum serapan asam sialat	43
Gambar 4.6. Kurva standar asam sialat	44
Gambar 4.7. Kadar asam sialat darah tikus yang diinduksi DMBA.....	45
Gambar 4.8. Kadar asam sialat jaringan payudara tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	46
Gambar 4.9. Diagram batang perbandingan kadar asam sialat plasma darah dan jaringan kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	47
Gambar 4.10. Diagram titik hubungan kadar asam sialat plasma darah dan jaringan kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	47
Gambar 4.11. Kurva standar pengukuran MDA menggunakan tetractoksipropin.....	48
Gambar 4.12. Kadar MDA darah tikus yang diinduksi DMBA.....	48
Gambar 4.13. Kadar MDA jaringan payudara tikus yang diinduksi DMBA.....	49
Gambar 4.14. Diagram batang perbandingan kadar MDA plasma darah dan jaringan kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	50
Gambar 4.15. Diagram titik hubungan kadar MDA plasma darah dan jaringan kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	51
Gambar 4.16. Kadar senyawa karbonil jaringan payudara tikus yang diinduksi DMBA.....	52

Gambar 4.17.	Aktivitas spesifik enzim katalase darah tikus kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	53
Gambar 4.18.	Aktivitas spesifik enzim katalase jaringan payudara tikus kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	54
Gambar 4.19.	Diagram batang perbandingan aktivitas enzim katalase plasma darah dan jaringan kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	54
Gambar 4.20.	Diagram titik hubungan aktivitas enzim katalase plasma darah dan jaringan kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA	55
Gambar 4.21.	Kurva standar aktivitas SOD.....	56
Gambar 4.22.	Kurva standar protein.....	57
Gambar 4.23.	Aktivitas spesifik enzim MnSOD darah tikus kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	57
Gambar 4.24.	Aktivitas spesifik enzim MnSOD jaringan payudara tikus kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	58
Gambar 4.25.	Diagram batang perbandingan aktivitas enzim MnSOD plasma darah dan jaringan kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	59
Gambar 4.26.	Diagram titik hubungan aktivitas enzim MnSOD plasma darah dan jaringan kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	60
Gambar 4.27.	Diagram batang perbandingan aktivitas enzim MnSOD plasma darah dan jaringan kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	61
Gambar 4.28.	Diagram titik hubungan aktivitas enzim MnSOD dengan asam sialat jaringan payudara tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	62
Gambar 4.29.	Diagram batang perbandingan aktivitas enzim MnSOD dan asam sialat plasma darah kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	62
Gambar 4.30.	Diagram titik hubungan aktivitas enzim MnSOD dan asam sialat plasma darah kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	63
Gambar 4.31.	Diagram batang perbandingan aktivitas enzim MnSOD dan derajat keganasan pada jaringan payudara tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA..	64
Gambar 4.32.	Diagram titik perbandingan aktivitas enzim MnSOD dengan derajat keganasan jaringan kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	64
Gambar 4.33	Diagram batang perbandingan aktivitas enzim MnSOD dengan MDA plasma darah tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	65

Gambar 4.34.	Diagram titik hubungan aktivitas enzim MnSOD dengan MDA plasma darah tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	66
Gambar 4.35.	Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan kadar MDA jaringan payudara darah tikus kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	66
Gambar 4.36.	Diagram titik hubungan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan kadar MDA jaringan payudara tikus kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	67
Gambar 4.37.	Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan senyawa karbonil jaringan payudara tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	68
Gambar 4.38.	Diagram titik hubungan aktivitas enzim spesifik MnSOD dengan senyawa karbonil jaringan payudara tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	68
Gambar 4.39.	Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan enzim katalase pada jaringan payudara tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	69
Gambar 4.40.	Diagram titik hubungan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan enzim katalase pada jaringan payudara tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	70
Gambar 4.41.	Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan enzim katalase pada darah tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	70
Gambar 4.42.	Diagram titik hubungan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan enzim katalase pada darah tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.....	71

DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1	Surat persetujuan etik.....	78
Lampiran 2	Berat badan tikus (dalam gram) sebelum dan selama induksi DMBA.....	79
Lampiran 3	Berat badan selama karsinogenesis (setelah induksi).....	80
Lampiran 4	Skor histopatologis pulasan HE.....	81
Lampiran 5	Spektrum serapan maksimal dan kurva standar kadar asam sialat.....	82
Lampiran 6	Hasil pengukuran kadar asam sialat jaringan.....	83
Lampiran 7	Hasil pengukuran kadar asam sialat plasma.....	84
Lampiran 8	Data mentah hasil pengukuran MDA jaringan payudara tikus.....	85
Lampiran 9	Data mentah hasil pengukuran MDA plasma.....	86
Lampiran 10	Data mentah hasil pengukuran kadar karbonil.....	87
Lampiran 11	Data mentah hasil pengukuran aktivitas spesifik katalase jaringan.....	88
Lampiran 12	Data mentah hasil pengukuran katalase plasma.....	89
Lampiran 13	Data kasar pengukuran aktivitas spesifik MnSOD jaringan.....	90
Lampiran 14	Data kasar pengukuran aktivitas spesifik MnSOD darah...	91
Lampiran 15	Data kasar pengukuran kadar protein.....	92
Lampiran 16	Data statistik.....	93

DAFTAR SINGKATAN

AAF	=	Asetilaminafluoren
Cat	=	Catalase
CTP	=	Cytidine 5'-triphosphate
CuZnSOD	=	Copper-and-Zinc-containing superoxide dismutase
CYP1A1	=	Cytochrome P450 1A1
DMBA	=	Dimethylbenz(a)anthracene
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
GPx	=	Glutathione peroxidase
HE	=	Hematoksilin-Eosin
INT	=	2(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazoline chloride
ManNAc	=	N-acetyl-D-mannosamine
MDA	=	Malondialdehyd
MnSOD	=	Manganese superoxide dismutase
Neu 5 Ac	=	N-acetylneuraminic acid
8-OHdG	=	8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine
PAH	=	Polyhydroxy aromatic hydrocarbon
PBS	=	Phosphat Buffer Saline
PUFA	=	Polyunsaturated fatty acid
ROS	=	Reactive oxygen species
TBA	=	Thiobarbituric acid
TBARs	=	Thiobarbituric acid-reactive substance
UDP Glc NAc	=	Uridine 5'-diphosphate-N-acetyl-D-glucosamine

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Karsinogenesis adalah proses transformasi sel normal menjadi ganas. Karsinogenesis merupakan proses yang kompleks dan bertingkat, dimulai dari terbentuknya suatu populasi sel yang abnormal, kemudian abnormalitas ini meningkat akibat serangkaian mutasi dan perubahan pola ekspresi gen. Proses transformasi sel hingga menjadi ganas membutuhkan waktu yang lama. Karsinogenesis dapat diinisiasi oleh karsinogen kimia, (zat kimia lingkungan, makanan dan lain-lain), fisik (radiasi uv, sinar X dan lain-lain) atau biologis (virus) yang menyebabkan kerusakan DNA hingga terjadi mutasi. Sel-sel yang telah terinisiasi kemudian berkembang menjadi sel kanker melalui tahap promosi dan progresi yaitu proliferasi, infiltrasi dan metastasis.^{1,2,3}

Karsinogenesis kimia diawali oleh stres oksidatif dan dapat dicegah secara dini oleh antioksidan. Stres oksidatif adalah ketidakseimbangan antara radikal bebas (prooksidan) dan antioksidan yang dipicu oleh adanya dua kondisi umum yaitu kurangnya antioksidan serta kelebihan produksi radikal bebas. Stres oksidatif membawa kepada kerusakan oksidatif mulai dari tingkat sel, jaringan hingga ke organ tubuh, menyebabkan terjadinya percepatan proses penuaan dan munculnya penyakit. Berbagai penyakit yang telah diteliti dan diduga kuat berkaitan dengan aktivitas radikal bebas mencakup lebih dari 50, diantaranya adalah kanker. Kanker dan tumor banyak disepakati para ilmuwan sebagai penyakit yang berawal dari mutasi gen atau DNA sel. Radikal bebas oksigen atau sering juga disebut ROS (*Reactive Oxygen Species*) dan reaksi oksidasi berantai yang dihasilkan jelas berperan pada proses mutasi ini.^{4,5}

ROS dibentuk sebagai hasil samping metabolisme seluler aerobik dan produksinya diamplifikasi oleh beberapa kondisi stres, kadar ROS yang tinggi dapat merusak sel. ROS meliputi radikal superoksida, hidroksil, peroksil, dan molekul hidrogen peroksida (H_2O_2). ROS dapat memodifikasi protein seluler, lipid dan DNA

sehingga mengubah fungsi sel. Beberapa penelitian melaporkan bahwa ROS dalam kadar tinggi adalah kunci utama dalam mekanisme inisiasi dan progresi penyakit seperti karsinogenesis.^{3,5}

Enzim antioksidan utama yang menetralkan ROS adalah superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT) dan glutathion peroksidase (GPx). SOD mengkatalisis dismutase superoksida menjadi H_2O_2 dan oksigen, sedangkan CAT dan GPx menetralkan H_2O_2 . Dua SOD utama pada eukariot adalah MnSOD dan Cu/ZnSOD yang ditemukan dalam sitoplasma. Kedua enzim ini penting untuk melindungi sel terhadap toksisitas oksigen. Mitokondria mengkonsumsi lebih dari 95% oksigen sel sehingga rantai transport oksigen mitokondria diyakini sebagai sumber utama pembentukan ROS endogen. Sehubungan dengan hal tersebut, MnSOD yang terletak dalam matriks mitokondria merupakan komponen penting yang pertama melakukan perlindungan fisiologi terhadap toksisitas oksigen.³

MnSOD memiliki beberapa kelebihan yang membuatnya lebih cocok untuk penggunaan medis, misalnya MnSOD tidak dihambat oleh hidrogen peroksida dan memiliki waktu paruh 5-6 jam. Waktu paruh ini jauh lebih lama dari waktu paruh Cu/ZnSOD yang hanya 6-10 menit. MnSOD menetralkan anion superoksida yang sangat reaktif melalui dua langkah reaksi dismutase, dimana Mn^{3+} direduksi lalu direoksidasi.⁶

Beberapa penelitian menyatakan bahwa sel tumor memiliki aktivitas enzim MnSOD yang lebih rendah daripada sel normal. Peningkatan aktivitas MnSOD menunjukkan penekanan terhadap sel tumor, yaitu pada sel melanoma manusia, kanker payudara, karsinoma oral skuamosa, kanker pankreas, glioma, liposarkoma dan fibrosarkoma tikus. Pada beberapa jenis sel tumor yang berbeda, overekspresi MnSOD menghambat pertumbuhan sel tumor, hal ini menunjukkan bahwa MnSOD berperan sebagai supresor tumor. Peran MnSOD sebagai supresor tumor masih kontroversial, karena beberapa penelitian lain justru membuktikan bahwa ekspresi MnSOD yang tinggi pada sel tumor berkaitan dengan prognosis buruk. Sebagai antiapoptosis, MnSOD yang diekspresi berlebihan diduga dapat menyebabkan sel tumor tersebut bertahan hidup karena resistensi terapi.⁶

Karsinogenesis kimia merupakan model yang paling erat hubungannya dengan peran MnSOD. Karsinogen kimia dianggap agen terbesar dalam terjadinya kanker dan memiliki struktur yang beragam dengan karakter reaktifitas elektofilik yang beragam pula. Secara umum karsinogen kimia dibagi menjadi dua golongan besar yaitu karsinogen kimia yang bekerja langsung, merupakan senyawa yang sangat elektrofil sehingga dapat langsung bereaksi dengan molekul sel yang bermuatan negatif dan yang tidak langsung, yaitu senyawa yang mengalami metabolisme sebelum bereaksi dengan molekul sel.³

DMBA (*7,12 dimethylbenz-(a)anthracene*) telah banyak digunakan terutama sebagai induktor kanker payudara dan kulit. DMBA dapat menyebabkan karsinogenesis dengan cara tidak langsung, yaitu melalui bioaktivasi dalam sitokrom P450 membentuk DMBA-5,6-dihidrodiol dan 7,12-epoxid yang akan bereaksi dengan DNA membentuk *adduct*, menyebabkan inisiasi tumor. Mekanisme lain dengan mengaktivasi metabolit rantai alkil samping membentuk turunan hidroksi metil, diikuti dengan katalisis sulfontransferase yang akan mengaktivasi DMBA untuk membentuk ester asam sulfat yang elektrofilik dan mengikat DNA.^{3,7}

Data penelitian yang ada mengenai aktivitas enzim MnSOD pada sel kanker masih saling bertentangan, maka perlu dilakukan penelitian yang lebih mendalam mengenai hal tersebut pada tahap yang lebih dini yaitu pada tahap inisiasi karsinogenesis. Sebagian besar penelitian mengenai enzim MnSOD adalah pada sel kanker dan belum ada penelitian mengenai peran MnSOD pada proses karsinogenesis kimia mulai dari induksi hingga terjadinya kanker.

Terjadinya karsinogenesis payudara pada tikus yang diinduksi dengan DMBA, dimonitor kadar asam sialat sebagai penanda tumor dan perubahan morfologi jaringan payudara yang dipulas dengan HE (Hematoksilin-Eosin), baik preneoplastik maupun neoplastik. Kadar asam sialat merupakan penanda tumor yang sudah banyak dibuktikan pada penelitian-penelitian sebelumnya, dimana kadarnya akan meningkat sejalan dengan keganasan.^{8,9,10} Parameter stres oksidatif yang diuji adalah kadar MDA (malondialdehid) dan senyawa karbonil yang mencerminkan tingkat peroksidasi lipid dan protein serta aktivitas spesifik enzim katalase sebagai salah satu

enzim antioksidan penetral ROS.^{3,11} Sampel diambil dari plasma dan jaringan payudara karena payudara merupakan target utama DMBA dan proses kerusakan yang berlangsung di jaringan lain akan tercermin di dalam plasma.

1.2. Rumusan Masalah dan Pertanyaan Penelitian

Berdasarkan uraian di atas, hingga saat ini belum ada penelitian mengenai peran MnSOD pada proses karsinogenesis kimia yang diinduksi dengan DMBA sehingga timbul pertanyaan penelitian sebagai berikut:

- Bagaimanakah aktivitas spesifik enzim MnSOD pada karsinogenesis kimia payudara tikus yang diinduksi dengan DMBA?
- Bagaimanakah hubungan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan asam sialat sebagai penanda tumor pada karsinogenesis kimia payudara tikus yang diinduksi DMBA?
- Bagaimanakah hubungan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan derajat keganasan pada karsinogenesis kimia payudara tikus yang diinduksi DMBA?
- Bagaimanakah hubungan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan kadar MDA dan senyawa karbonil sebagai tanda kerusakan oksidatif pada karsinogenesis kimia payudara tikus yang diinduksi DMBA?
- Bagaimanakah hubungan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan enzim katalase pada karsinogenesis kimia payudara tikus yang diinduksi DMBA?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk menganalisis sejauh mana peran MnSOD sebagai antioksidan endogen utama pada karsinogenesis kimia kanker payudara tikus yang diinduksi dengan DMBA dan hubungannya dengan stres oksidatif.

1.3.2. Tujuan Khusus

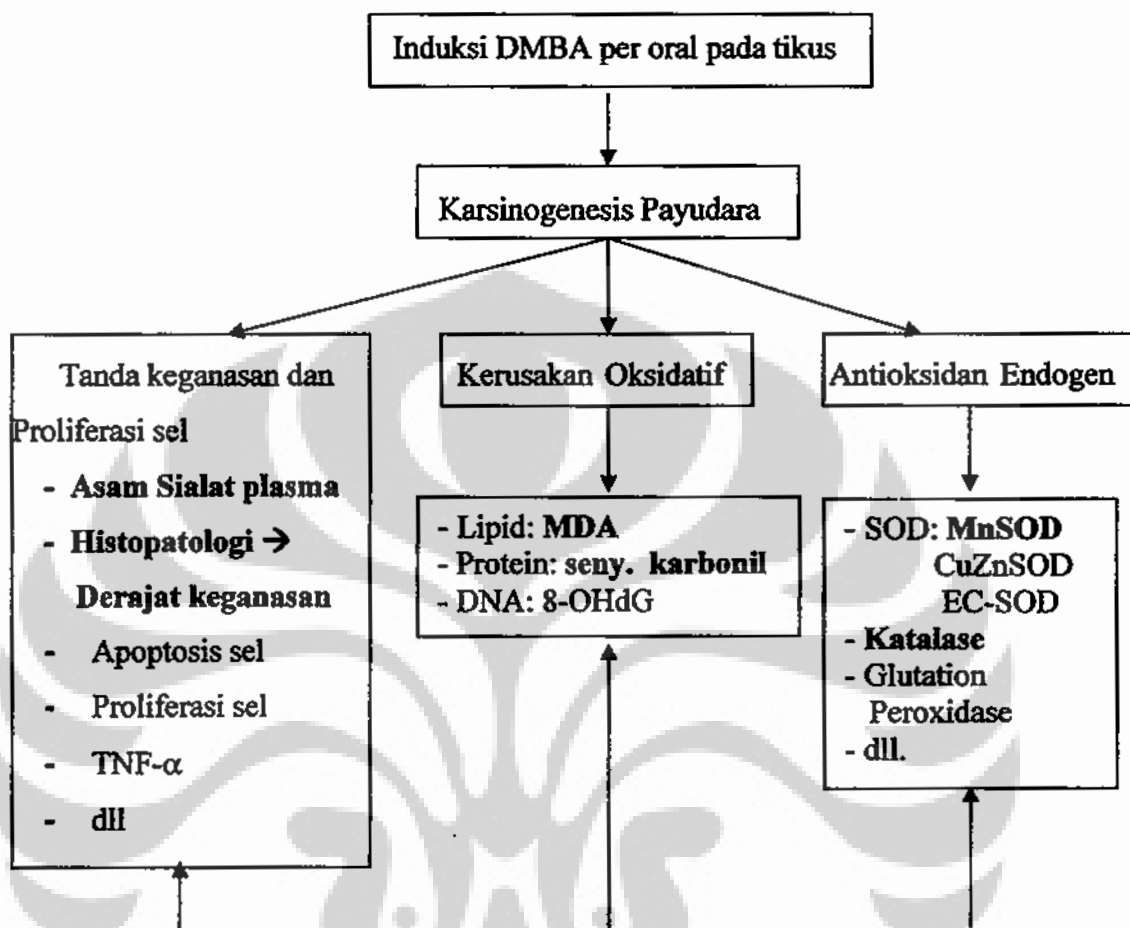
Tujuan khusus penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Menginduksi tumor payudara tikus dengan karsinogen kimia DMBA
- Menganalisis kadar asam sialat sebagai penanda tumor selama karsinogenesis kimia dengan DMBA
- Menganalisis derajat keganasan dari ciri histopatologi jaringan payudara tikus selama karsinogenesis kimia
- Menganalisis kadar senyawa karbonil dan MDA selama karsinogenesis kimia sebagai tanda kerusakan oksidatif
- Menganalisis aktivitas spesifik enzim MnSOD dan katalase selama karsinogenesis kimia
- Menganalisis hubungan aktivitas spesifik MnSOD dengan kadar asam sialat sebagai penanda tumor
- Menganalisis hubungan aktivitas spesifik MnSOD dengan derajat keganasan dari ciri histopatologi jaringan payudara selama karsinogenesis kimia
- Menganalisis hubungan aktivitas spesifik MnSOD dengan kadar MDA dan senyawa karbonil sebagai tanda terjadinya kerusakan oksidatif
- Menganalisis hubungan aktivitas spesifik MnSOD dengan aktivitas spesifik enzim katalase sebagai antioksidan endogen lain pada karsinogenesis kimia

1.4. Manfaat Penelitian

Mengetahui peran enzim MnSOD pada karsinogenesis kimia sehingga dapat menjadi pertimbangan penatalaksanaan pencegahan dini karsinogenesis terutama yang diinduksi oleh bahan-bahan kimia serta intervensi karsinogenesis baik pada tahap inisiasi dan promosi maupun pada tahap progresi yang lebih lanjut, misalnya pada manajemen terapi kanker dengan pemberian terapi gen MnSOD disamping terapi konvensional lainnya seperti pembedahan, radioterapi dan kemoterapi.

1.5. Kerangka Konsep Penelitian



Catatan: Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan terhadap parameter-parameter yang dituliskan dengan huruf tebal.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Karsinogenesis

Karsinogenesis merupakan proses yang kompleks dan bertingkat, berhubungan dengan akumulasi perubahan genetik pada sel-sel somatik. Dari terbentuknya suatu populasi sel yang abnormal kemudian meningkat akibat serangkaian mutasi dan perubahan pola ekspresi gen. Banyak faktor yang menyebabkan terjadinya kanker, diantaranya paparan virus, senyawa-senyawa xenobiotik yang berasal dari bahan kimia dan radiasi. Faktor-faktor yang menyebabkan keganasan dapat diturunkan atau dari lingkungan, misalnya resiko kanker payudara dipengaruhi oleh gen *BRCA1* dan *BRCA2*, sedangkan konsumsi makanan berkalori tinggi atau kegemukan dapat meningkatkan resiko kanker payudara.^{3,5,12}

Penelitian karsinogenesis pada hewan mengungkapkan adanya tiga tahap proses karsinogenesis, yaitu inisiasi, promosi, dan progresi. Tahap inisiasi ditandai dengan adanya perubahan genetik yang *irreversibel*. ROS secara spesifik terbentuk pada populasi sel yang terinisiasi. Inisiator bisa berupa zat kimia yang dapat bereaksi dengan DNA, baik endogen seperti ROS atau xenobiotik, maupun eksogen seperti radiasi ionisasi. Sel-sel yang terinisiasi sekali, tidak dapat dikenali tanpa adanya perubahan fenotip setelah multiplikasi. Mutasi yang terjadi saat sintesis DNA menyebabkan mutasi permanen. Aktivasi karsinogen menjadi senyawa elektrofilik-DNA merupakan tahapan penting pada proses ini. Aktivasi karsinogen terjadi pada senyawa aflatoxin B, amin aromatik dan hidrokarbon aromatik polisiklik. ROS atau produk sampingan peroksidasi lipid, malondialdehid (MDA), dapat juga bereaksi dengan DNA untuk membentuk DNA oksidatif *adduct*. Keberadaan karsinogen-DNA *adduct* yang dihasilkan oleh karsinogen kimia menjelaskan adanya peran interaktif ROS pada tahap inisiasi. Dengan demikian ROS memiliki berbagai pengaruh pada

tahap inisiasi melalui aktivasi karsinogen, menyebabkan kerusakan DNA dan mempengaruhi perbaikan kerusakan DNA. Perlindungan utama terhadap inisiasi kanker adalah detoksifikasi karsinogen, perbaikan DNA dan eliminasi sel dengan DNA yang rusak melalui jalur apoptosis.^{3,5}

Tahap kedua promosi, terjadi akibat ekspansi klonal selektif dari populasi sel yang terinisiasi melalui peningkatan proliferasi sel dan atau hambatan kematian sel (apoptosis). Secara patologi, terlihat sebagai pembentukan lesi preneoplastik. Tahap promosi biasanya ditandai dengan proses aktivasi gen yang *reversible*, sering dihasilkan dari proses xenobiotik atau zat-zat endogen. Proses ini melibatkan seluruh jaringan, baik sel yang terinisiasi maupun tidak.

Tahap terakhir adalah progresi, merupakan hasil pertumbuhan keganasan dari lesi yang jinak, ditandai dengan pertumbuhan yang lebih cepat, invasif, metastasis dan ketidakstabilan genetik yang tinggi. Pada tahap ini stres oksidatif berperan pada perkembangan karakteristik kanker, seperti pertumbuhan yang tidak terkendali, ketidakstabilan genomik, resistensi kemoterapi, invasi dan metastasis. Sel tumor secara terus menerus mengalami stres oksidatif yang tinggi dan persisten. Hal ini ditunjukkan dengan tingginya kadar 8-OHdG pada sel berbagai kanker dibandingkan dengan jaringan normal di sekitarnya.^{3,5}

Perkembangan kanker pada hewan sudah lama diteliti dan melibatkan perubahan sel dan jaringan secara progresif, sebagai contoh kanker serviks. Proliferasi sel normal terjadi pada lapisan basal epitelial. Sel baru menuju keatas, berproliferasi, menjadi keratin, lalu tanggal dari permukaan. Pada skrining serviks kadang ditemukan displasia, pembelahan sel yang terjadi di luar lapisan basal dan nampak susunan sel yang tak normal. Displasia bisa bertahan atau hilang, tapi kadang-kadang dapat berkembang menjadi karsinoma in situ, seluruh sel epitel menjadi tidak normal dan mengandung sel-sel proliferasi, kebanyakan bentuk dan ukurannya tidak normal. Karsinoma in situ dapat juga bertahan tanpa menimbulkan masalah, namun pada beberapa kasus dapat menjadi karsinoma ganas, dimana sel-sel keluar dari epitel melewati membran untuk berinvasi ke bawah jaringan konektif.³

2.2. Karsinogenesis Kimia

Senyawa kimia yang ditemukan sebagai penyebab kanker mula-mula diketahui oleh Percival Pott tahun 1775 di Inggris yang mendapati bahwa kanker scrotal berhubungan dengan cerobong asap. Kebanyakan zat kimia yang diketahui sebagai karsinogen adalah senyawa antara (*by products*) pada proses industri, misalnya senyawa-senyawa hidrokarbon aromatik polisiklik (*PAH*). Zat karsinogen kimia lainnya terdapat pada makanan atau lingkungan, seperti aflatoksin B dan senyawa-senyawa turunan amin heterosiklik yang berasal dari asam-asam amino selama pengolahan makanan dengan temperatur tinggi.^{3,5}

Proses inisiasi dapat terjadi karena adanya interaksi antara karsinogen kimia dengan DNA yang menghasilkan mutasi. Setidaknya ada tiga fungsi seluler yang berperan pada proses inisiasi yaitu metabolisme karsinogen, perbaikan DNA dan proliferasi sel. Metabolisme dapat mengaktifasi atau menginaktifasi karsinogen kimia, proses perbaikan DNA dapat memperbaiki atau mengenali perubahan basa nitrogen dalam genom dan proliferasi sel diperlukan pada perlekatan perubahan secara permanen dalam genom. Inisiasi bersifat irreversibel namun tidak semua sel yang terinisiasi akan menjadi tumor karena bisa saja mengalami apoptosis. Perubahan DNA bisa tidak terdeteksi sepanjang hidup suatu organisme jika tidak berkembang menjadi tumor.^{3,5}

Tidak ada mekanisme spesifik yang dapat menjelaskan aktivitas berbagai macam zat promotor tumor. Namun secara umum proses promosi tumor dapat dilihat sebagai ekspansi klonal sel yang sudah terinisiasi melalui perubahan ekspresi gen. Promotor tumor menyebabkan sel-sel berproliferasi namun tidak diakhiri dengan diferensiasi sehingga menghasilkan sel preneoplastik dan perubahan lesi jinak seperti papiloma, nodul atau polip. Beberapa lesi mengalami kemunduran namun sebagian lagi memerlukan mutasi tambahan untuk menjadi neoplasma ganas. Berbagai kemungkinan zat-zat inisiator dan promotor pada percobaan kanker kulit pada hewan coba. Beberapa zat yang dapat menjadi promotor tumor adalah fenobarbital, TPA

(*12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*) dan TCDD (*2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin*).^{3,5}

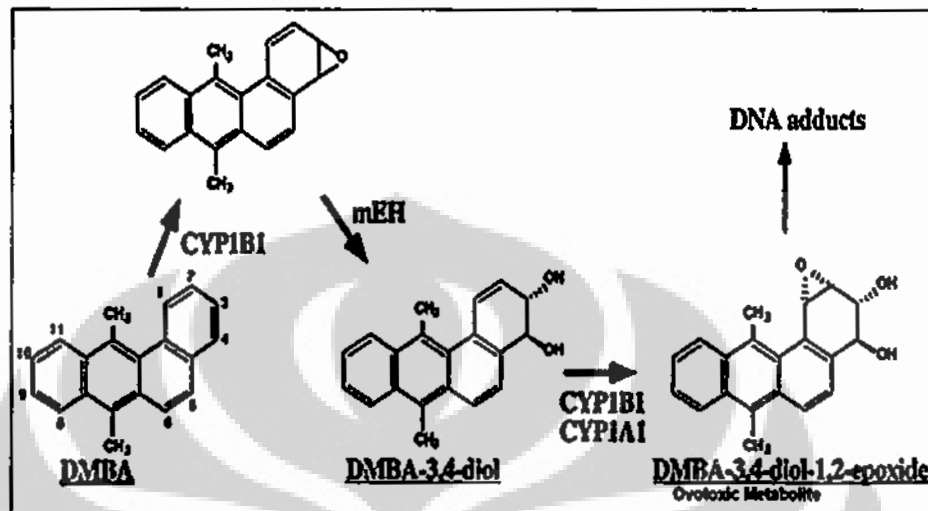
Progresi tumor digambarkan sebagai proses dimana tumor mendapatkan kemampuan untuk tumbuh, menginvasi jaringan lokal dan bermetastasis. Peningkatan ketidakstabilan genetik dan perubahan-perubahan kariotip adalah tanda-tanda progresi. Mutasi yang didapat atau mutasi bawaan dalam gen seperti *p53*, *Rb*, *MLH1* dan *MSH2* dapat meningkatkan kecepatan mutasi pada gen lain sehingga mempercepat akumulasi mutasi yang penting pada perkembangan kanker secara klinis. Zat-zat karsinogen yang merusak DNA dan berperan sebagai inisiator dapat memicu progresi tumor dengan meningkatkan kecepatan mutasi pada gen kunci.^{3,5}

2.3. DMBA (*7,12 dimethylbenz-(a)anthracene*)

DMBA adalah senyawa hidrokarbon aromatik polihidroksi (PAH) yang dihasilkan selama proses pembakaran tidak sempurna senyawa-senyawa yang mengandung karbon, terutama pada asap rokok, makanan yang mengalami proses pembakaran, polusi udara, pembakaran batubara dan lain-lain. DMBA dapat menyebabkan karsinogenesis dengan cara tidak langsung karena dimetabolisme dahulu menjadi senyawa epoksi yang dapat bereaksi dengan DNA. Aktivitas karsinogeniknya sudah sering dibuktikan dan sudah banyak digunakan sebagai zat karsinogen laboratorium sebagai induktor berbagai macam jenis kanker, terutama kanker payudara, kulit dan serviks. DMBA biasanya digunakan sebagai induktor pada tahap inisiasi.^{3,5,13}

DMBA dibioaktivasi dalam sitokrom P450 membentuk DMBA *cis*-5,6-dihidrodiol dan DMBA *trans*-5,6-dihidrodiol serta 7-hidroksimetil-12-methylbenz-(a)antrasen oleh enzim CYP1A1 dan CYP1B1 serta enzim epoksi hidroksilase yang bereaksi dengan DNA membentuk *adduct*, menyebabkan inisiasi tumor (Gambar 2.1). Mekanisme lain adalah dengan aktivasi metabolit rantai alkil samping membentuk turunan hidroksi metil, diikuti dengan katalisis sulfontransferase yang

mengaktivasi DMBA membentuk ester asam sulfat yang elektrofilik dan mengikat DNA.^{3,5,14}



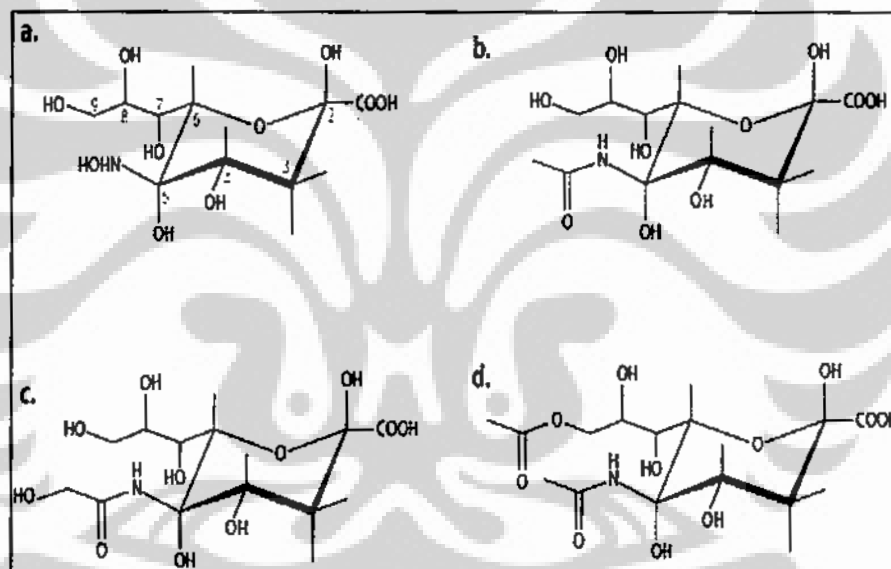
Gambar 2.1. Metabolisme DMBA menjadi senyawa mutagenik(Miyata et al. 1999).

2.4. Asam Sialat

Asam sialat adalah sekelompok senyawa amino karbohidrat (memiliki gugus poliol), turunan asam neuraminat, suatu monosakarida dengan sembilan atom karbon. Strukturnya berbeda dengan gula pada umumnya karena ada substitusi struktur glikan pada C4, C7, C8, C9 dan substitusi amin pada C5 (Gambar 2.2.). Lebih dari 50 bentuk asam sialat yang sudah teridentifikasi dengan lokasi yang berbeda-beda di dalam struktur sel. Faktor yang berperan pada kompleksitas asam sialat *in vivo* adalah migrasi gugus *O*-asetil ester antara C7 dan C9 pada kondisi fisiologis tertentu. Setelah perpindahan, asam sialat dapat digunakan lagi dengan cara menempel pada sitidin 5'-trifosfat (CTP) sebagai substrat atau didegradasi.^{15,16}

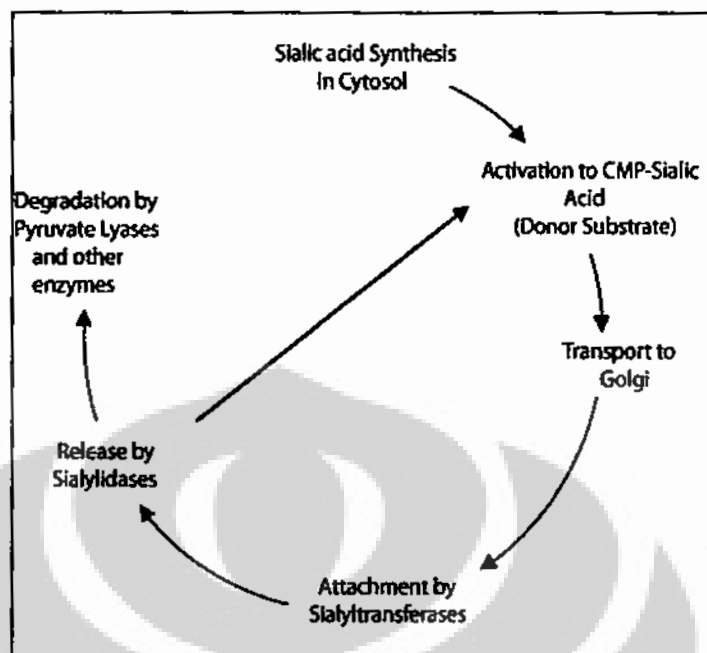
Asam sialat tersebar sangat luas dari bakteri sampai hewan vertebrata. Pada mamalia terutama terdapat pada sel-sel ganglion sistem saraf pusat dan pada membran sel, sebagian besar terikat sebagai senyawa glikosfingolipid yang disebut gangliosida. Gangliosida adalah sekelompok senyawa glikosfingolipid dengan

struktur yang sangat kompleks dengan bagian kepala yang polar tersusun dari beberapa unit residu monosakarida. Sebagai ciri khasnya, satu sampai lima unit karbohidrat terminal pada gangliosida selalu berupa asam sialat. Gangliosida merupakan komponen reseptor spesifik pada permukaan membran sel. Senyawa ini terdapat pada situs spesifik ujung sel-sel saraf tempat molekul neurotransmitter terikat ketika berlangsung transmisi rangsang dari satu sel saraf ke sel saraf berikutnya. Gangliosida juga merupakan reseptor zat-zat toksik seperti toksin tetanus dan beberapa jenis virus, misalnya virus influenza. Selain itu senyawa glikosfingolipid ini mempunyai peran dalam penyampaian informasi pada interaksi antar sel dengan membentuk determinan pengenalan spesifik pada permukaan sel.^{7,8,17}



Gambar 2.2. (a). Asam neuraminat, struktur dasar asam sialat. (b) Struktur asam N-asetil neuraminat. (c) Struktur asam N-glikolilneuraminat (d). Struktur asam N-asetil-9-O-asetilneuraminat.¹⁵

Altheid, et al. membuat lima langkah proses yang dilakukan oleh asam sialat. (1). Biosintesis asam sialat dari prekursornya, (2) Aktivasi CMP-asam sialat dan penempelan struktur glikan dengan bantuan enzim transferase, (3) Modifikasi (penambahan dan relokasi). (4). Pengenalan protein terhadap sialoglikan. (5) Daur ulang dan degradasi, proses pemindahan residu asam sialat dan degradasi asam sialat bebas secara enzimatik (Gambar.2.3).¹⁵

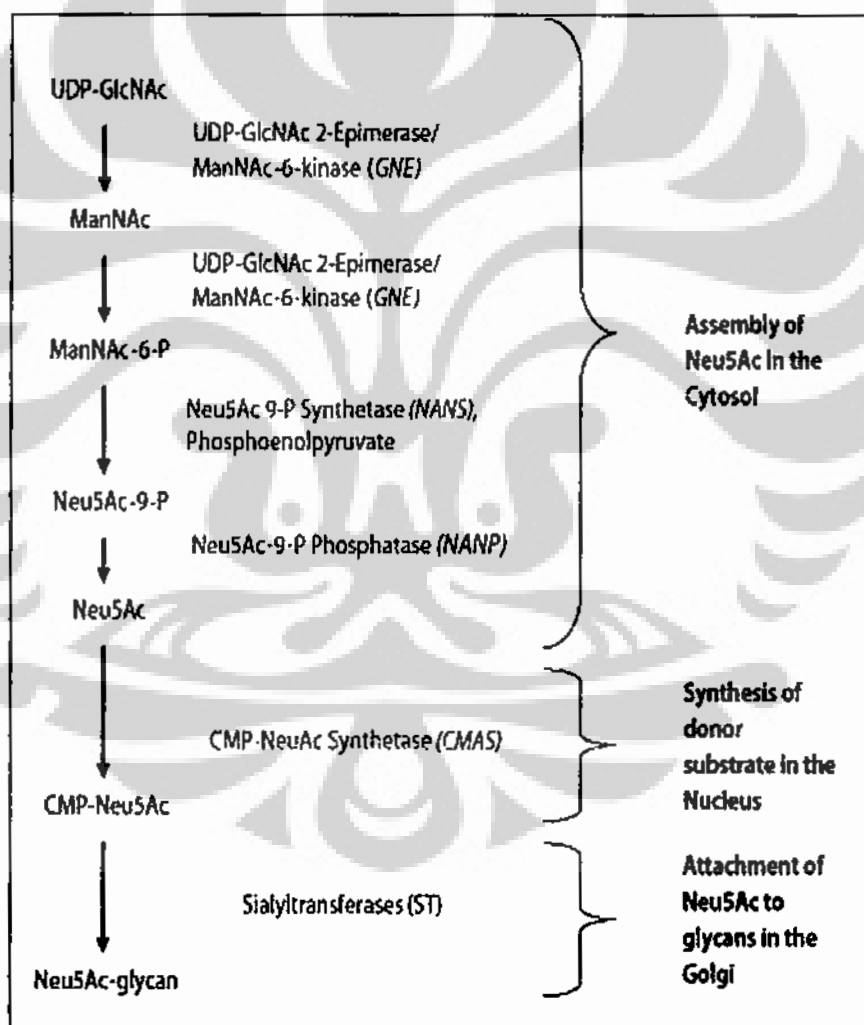


Gambar 2.3. Siklus metabolisme asam sialat.¹⁵

Telah diketahui bahwa transformasi neoplastik disertai oleh hipersialasi glikoprotein dan dapat digunakan sebagai salah satu penanda tumor. Apabila dibandingkan dengan penanda tumor lain seperti AKE (Antigen Karsinoma Embrionik) dan sialil transferase, asam sialat memiliki kelebihan karena kenaikan kadar asam sialat sudah dapat ditemukan pada stadium kanker yang lebih dini. Beberapa peneliti melaporkan adanya peningkatan aktivitas enzim-enzim permukaan, antara lain adenil siklase, protease dan glikosidase. Perubahan lain adalah menyangkut keadaan senyawa-senyawa glikosfingolipid dan glikoprotein yang terdapat pada membran sel. Suatu protein bermolekul besar yang dinamakan LETS (*Large molecular weight External Transformation Sensitive protein*) yang terdapat pada permukaan sel normal, ternyata menghilang pada transformasi neoplastik. Selain itu terjadi juga hipersialasi atau peningkatan kandungan asam sialat dari glikoprotein membran plasma sel yang mengalami transformasi neoplastik. Sebaliknya pada glikosfingolipid justru terjadi penurunan jumlah residu sakarida terminal.¹⁷

Biosintesis asam sialat pada hewan terjadi mula-mula di sitosol yang melibatkan empat macam enzim (gambar 2.4.). Aktivitas enzim UDP-GlcNAc 2-epimerase dan ManNAc 6-kinase mengubah substrat awal uridin 5'-difosfat-N-asetil-

D-mannosamin (UDP-GlcNAc) menjadi N-asetil-d-mannosamin (ManNAc) dengan memindahkan UDP dan epimerasi karbohidrat. Enzim kinasenya memindahkan gugus fosfat membentuk N-asetil-D-mannosa-6-fosfat (ManNAc-6-P). Reaksi kondensasi antara fosfoenolpiruvat (PEP) dengan ManNAc-6-P diinisiasi oleh NeuAc-9-P sintetase menghasilkan prekursor asam sialat yang terfosforilasi yaitu asam N-asetil neuraminat-9-fosfat (Neu5Ac-9-P). Prekursor ini difosforilasi oleh Neu5Ac-9-P-fosfatase menghasilkan asam N-asetilneuraminat (asam 2-ketoasetamido-3,5-dideoksi-D-glisero-D-galaktonunononat, Neu5Ac).¹⁵



Gambar 2.4. Biosintesis asam sialat.¹⁵

2.5. Radikal Bebas

Radikal bebas adalah suatu molekul atau atom yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbit terluar. Elektron tidak berpasangan ini bertanggung jawab pada ketidakstabilan dan reaktivitas radikal bebas yang tinggi karena ia mudah bereaksi dengan molekul lain dengan cara mengikat elektron yang terletak pada orbit terluarnya sehingga membuat molekul tersebut menjadi radikal reaktif. Radikal bebas dapat dibentuk dari senyawa non radikal yang kehilangan atau menerima satu elektron atau dibentuk oleh pemecahan ikatan kovalen yang terjadi di sel atau jaringan dengan banyak cara, terutama sebagai hasil proses metabolisme. Radikal bebas yang penting antara lain *RNS (Radical Nitrogen Species)* dan *ROS (Radical Oxygen Species)*. Molekul radikal bebas yang berasal dari oksigen adalah radikal hidroksil (OH^\bullet), oksigen singlet ($^1\text{O}_2^\bullet$), superoksida (O_2^\bullet), nitrogen dioksida (NO_2^\bullet) dan nitrit oksida (NO^\bullet). Turunan oksigen bersifat non radikal namun dapat dengan mudah membentuk reaksi radikal bebas pada makhluk hidup, seperti hidrogen peroksida (H_2O_2) dan ozon (O_3). ROS dibentuk di mitokondria sebagai hasil samping metabolisme seluler aerobik dan produksinya diamplifikasi oleh kondisi stres. Kadar ROS yang rendah memiliki fungsi fisiologis sebagai aktivator dan modulator transduksi sinyal, namun pada kadar yang tinggi ROS dapat merusak sel. ROS dapat memodifikasi protein seluler, lipid dan DNA sehingga mengubah fungsi sel. Telah dilaporkan bahwa ROS dalam kadar tinggi adalah kunci utama dalam mekanisme inisiasi dan progresi penyakit seperti karsinogenesis.^{3,18}

Selain berasal dari dalam sel, radikal bebas juga dapat berasal dari lingkungan luar, antara lain dari pencemaran udara dan makanan seperti asap rokok, kendaraan bermotor, industri dan zat tambahan makanan. Sekitar 90 persen polutan udara merupakan hidrokarbon, karbonmonoksida, nitrogen oksida, dan sulfur oksida akan mengakibatkan stres oksidatif dengan berbagai akibat buruk dalam tubuh. Stres oksidatif adalah salah satu faktor yang bertanggung jawab terhadap kerusakan yang diakibatkan oleh ROS di dalam sel dan jaringan. Hal ini dapat terjadi karena adanya peningkatan ROS atau penurunan jumlah antioksidan sehingga mengakibatkan stres

oksidatif, keadaan dimana terjadi ketidakseimbangan antara jumlah radikal bebas atau ROS dengan jumlah antioksidan yang ada. Stres oksidatif ditandai dengan peningkatan produksi ion superoksida dan peroksidase yang tidak normal terutama dari proses fagositosis.^{3,19}

2.6. Stres Oksidatif

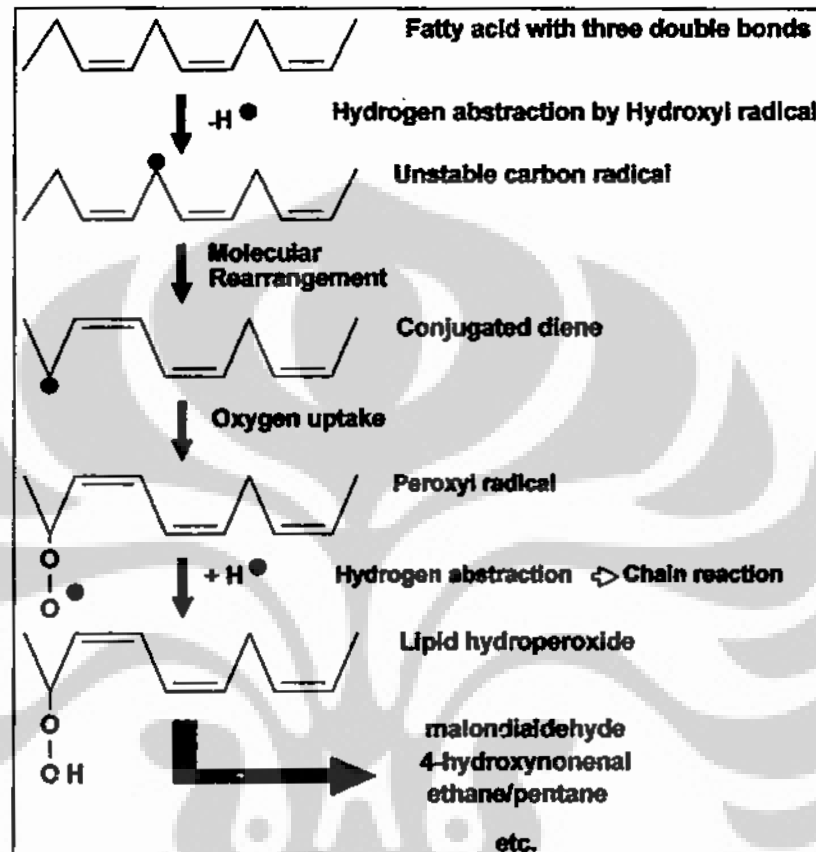
Pada keadaan tertentu, kadar ROS dapat melebihi kapasitas tubuh untuk dapat menetralsirkannya. Keadaan ini dikenal dengan istilah stres oksidatif. Pada stres oksidatif, ROS mengakibatkan kerusakan dalam tubuh seperti DNA, peroksidasi lipid, modifikasi protein, disrupsi membran dan kerusakan mitokondria. Kerusakan-kerusakan ini dapat menimbulkan berbagai penyakit.^{3,5}

Pembentukan radikal hidroksil terjadi jika homeostasis berubah, contohnya kerusakan jaringan menyebabkan pelepasan ion logam dari sel yang rusak. Radikal hidroksil bereaksi pada kecepatan difusi yang terkontrol dengan hampir semua molekul di sel hidup. Jika radikal hidroksil dibentuk secara *in vivo*, akan merusak apa pun yang dibentuk, kemudian karena radikal hidroksil tidak dapat bermigrasi jauh di dalam sel, akibatnya hidroksil akan merusak protein, DNA, asam lemak tidak jenuh atau *Poli Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) dan molekul biologis lain.¹⁹

2.6.1. MDA (Malondialdehid)

Malondialdehid (MDA) merupakan suatu senyawa yang dihasilkan dari peroksidasi lipid. Peroksida lipid terbentuk sebagai hasil reaksi antara radikal bebas dengan asam lemak tidak jenuh atau PUFA (*poly unsaturated fatty acid*) yang merupakan unsur utama dalam membran sel. Kadar peroksida lipid di jaringan dan darah dapat digunakan sebagai indikator terjadinya stres oksidatif. Pengukuran MDA saat ini sering digunakan untuk mengetahui tingkat kerusakan yang disebabkan oleh proses peroksidasi lipid membran atau lipoprotein. Salah satu cara

pengukuran kadar MDA yang telah lama dan paling sering digunakan adalah dengan TBARs (*Thiobarbituric Acid Reactive Substance*).^{3,20}



Gambar 2.5. Proses peroksidasi lipid oleh radikal hidroksil.¹⁷

Proses peroksidasi lipid umumnya dimulai dengan penarikan atom hidrogen yang mengandung satu elektron dari ikatan rangkap PUFA membentuk radikal lipid. Radikal karbon lipid cenderung menstabilkan diri dengan melakukan penataan ulang intramolekuler, sehingga menghasilkan suatu konjugat yang dengan cepat bereaksi dengan O_2 yang menyebabkan terbentuknya radikal peroksil lipid. Radikal peroksil lipid akan menarik atom hidrogen dari ikatan rangkap PUFA yang lain, sehingga terbentuk radikal lipid berikutnya. Kombinasi radikal peroksil dengan atom hidrogen akan menghasilkan peroksida lipid (Gambar 2.5).²

2.6.2. Senyawa Dikarbonil

Makromolekul lain yang dapat dirusak oleh ROS adalah protein. Senyawa karbonil atau dikarbonil adalah senyawa yang terbentuk akibat serangan radikal bebas pada makromolekul terutama protein. Molekul protein terdiri dari rangkaian asam amino dengan ikatan peptida. Kerusakan peptida akan merusak protein tersebut, baik struktur maupun fungsinya. Pada proses kerusakan ini rantai peptida akan berubah menjadi senyawa dikarbonil. Selain dari kerusakan rantai peptida, senyawa karbonil juga dapat dibentuk dari kerusakan rantai samping terutama yang mengandung asam-asam amino arginin, lisin, histidin dan prolin yang mengandung atom nitrogen. Senyawa dikarbonil juga dapat terbentuk dari monosakarida seperti glukosa yang mengalami oksidasi. Senyawa dikarbonil yang terbentuk dapat bereaksi dengan gugus NH_2 protein membentuk *AGEs (Advanced Glycation End-products)*. Radikal hidroksil yang terbentuk dari reaksi ini dapat menyerang monosakarida yang lain sehingga membentuk lebih banyak lagi senyawa dikarbonil. Beberapa diantaranya identik dengan yang terbentuk pada karbohidrat yaitu glioksal dan metilglioksal.^{18,20,21}

2.6.3. Kerusakan oksidatif DNA dan kanker

Kerusakan DNA oleh ROS sudah banyak diketahui sebagai salah satu penyebab terjadinya kanker. Pada pasien dengan resiko kanker menunjukkan peningkatan kerusakan DNA oksidatif atau pada beberapa kasus menurunkan sistem perbaikan DNA seperti pada anemia Fanconi, hepatitis kronik, *cystic fibrosis* dan berbagai macam penyakit autoimun. Penelitian pada manusia mendukung dugaan kerusakan DNA oksidatif sebagai faktor mutagenik dan karsinogenik yang penting. ROS dapat merusak dan pembelahan sel yang dapat menyebabkan mutasi. Sebagian besar mutasi yang diinduksi oleh ROS terlibat dalam modifikasi guanin, menyebabkan perubahan guanin menjadi timin. Jika perubahan ini terjadi pada gen

kritis seperti onkogen atau gen supresor tumor maka akan terjadi inisiasi atau progresi, bahkan kombinasi pada beberapa tahap karsinogenesis.

Mutasi yang disebabkan oleh kerusakan DNA oksidatif terutama mengoksidasi purin dan pirimidin, situs alkali yang labil, pemutusan rantai tunggal dan bentuk-bentuk yang tidak stabil lainnya atau pada proses perbaikan. Keberagaman modifikasi yang disebabkan oleh ROS, menjadi sulit menentukan frekuensi dan spesifisitas mutasi. Modifikasi basa diketahui memiliki sifat mutagenik, bila mutasi tersebut tidak dapat diperbaiki maka akan terjadi karsinogenesis. Meskipun keempat basa dimodifikasi oleh ROS, mutasi biasanya berhubungan dengan modifikasi pasangan basa GC, sedangkan AT jarang dimodifikasi. Sebagian besar mutasi ini melibatkan substitusi, jarang delesi dan insersi. Perubahan G menjadi C pada tumor yang diderita manusia merupakan mutasi yang dominan pada gen supresor tumor p53. Peningkatan modifikasi basa pada jaringan kanker juga menghasilkan peningkatan kadar H_2O_2 pada berbagai sel tumor manusia. Inisiasi tumor pada manusia oleh ROS mendukung adanya modifikasi DNA oksidatif pada jaringan kanker.^{3,22}

Kerusakan DNA oksidatif berperan pada perkembangan kanker payudara. Peningkatan kerusakan basa DNA yang memiliki gugus hidroksil dilaporkan terjadi pada payudara yang mengalami inflamasi, sehingga dapat menyebabkan terjadinya progresi keganasan. Peningkatan *8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) adduct* pada DNA memegang peranan penting pada tahap progresi kanker payudara menjadi bentuk metastatik serta pada kanker hepar. Karsinoma sel hepatik sering dihubungkan dengan infeksi kronik hepatitis B dan C atau paparan aflatoksin. Pengukuran kadar kerusakan DNA dan mutasi pada kanker hepar dapat digunakan untuk memprediksi onset kanker. Hipertrofi prostat kronik yang didiagnosa pada laki-laki usia di atas 40 tahun dapat menjadi karsinoma prostat melalui tahapan karsinogenesis. Alasan yang paling mungkin dari pembentukan genotoksin endogen adalah akumulasi ROS.^{3,22}

2.7. Karsinoma Payudara²³

Karsinoma payudara merupakan masalah kesehatan dunia, baik di negara yang sedang berkembang maupun di negara maju, dengan mortalitas dan morbiditas yang terus meningkat. Pada periode awal tahun 1980 kejadian karsinoma payudara masih menduduki peringkat ketiga tertinggi di dunia, tetapi pada periode akhir tahun 1980 menjadi tumor ganas dengan kejadian yang tertinggi. Di Indonesia pada tahun 1995 diperkirakan kasus baru karsinoma payudara paling sedikit ditemukan 19.000 per tahun, merupakan kasus terbanyak kedua setelah karsinoma serviks yaitu antara 17-18/100.000 wanita per tahun. Pada tahun 2007 diperkirakan menjadi 34,3/100.000 wanita per tahun dan pada tahun ini juga kemungkinan makin meningkat. Kecenderungan peningkatan tersebut kemungkinan akibat perubahan pola hidup.

Kelenjar payudara merupakan kelenjar tubulo alveolar yang bercabang-cabang, terdiri dari 15-20 tubulus yang dikelilingi oleh jaringan ikat dan lemak. Tiap lobulus mempunyai duktus laktiferus yang dilapisi epitel gepeng berlapis. Tiap lobus terdiri atas beberapa lobulus, disebut *collecting duct* yang dikelilingi oleh 10-100 asinus. Jaringan ikat interlobular mengandung lebih banyak sel dari pada jaringan ikat intra lobular, yang terdiri atas jaringan miktomatos. Sekresi dilakukan oleh kelenjar yang dilapisi oleh membran basalis, miopitel dan epitel kuboid selapis dan epitel torak selapis yang rendah, lalu ke duktus alveolaris, yang dilapisi oleh lapisan epitel kuboid berlapis, kemudian bermuara ke duktus laktiferus yang berakhir pada puting susu.

Inisiasi dan promosi neoplastik sel kelenjar payudara diawali dengan inisiasi neoplastik sel epitel kelenjar payudara, yang terjadi melalui mutasi somatik yang berkaitan dengan rangsang hormonal. Rangsang hormonal yang berkelanjutan tanpa faktor penghambat akan menimbulkan proliferasi autonom. Faktor resiko kanker payudara antara lain hormon estrogen, faktor pertumbuhan non endokrin, zat kimia karsinogenik menimbulkan proliferasi. Pada sebagian kecil kanker payudara berasosiasi dengan familial. Terdapat pula identifikasi mutasi gen yaitu gen BRCA1 dan BRCA2.

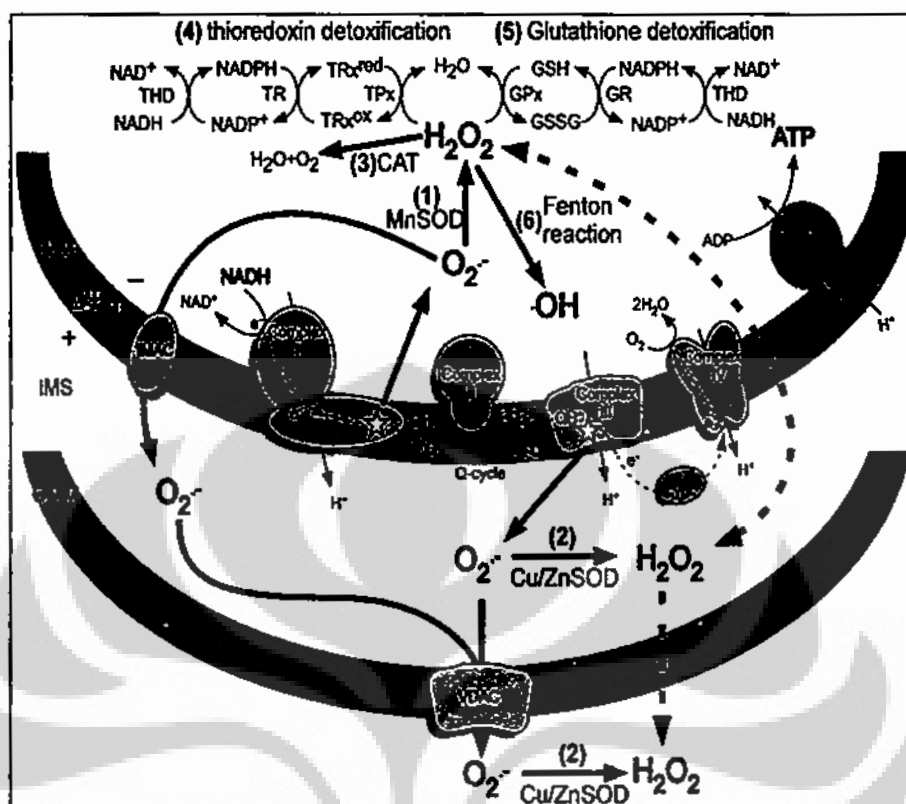
Tahap promosi pada epitel kelenjar payudara berlangsung karena dipengaruhi proses internal, yaitu hormonal terutama pada usia produktif. Konsep onkogenesis epitel payudara yaitu berupa urutan penyimpangan morfologik dari hiperplasia epitel, hiperplasia atipik, karsinoma *in situ*, karsinoma invasif. Interaksi tahap inisiasi dan promosi sudah mulai terlihat pada lesi proliferasif jinak.

Karsinoma payudara invasif adalah sekelompok tumor epitelial ganas yang ditandai oleh invasi jaringan sekitar dan cenderung menyebar ke daerah yang lebih jauh. Mayoritas tumor ini adalah adenokarsinoma yang diturunkan dari epitel sistem duktus ekskretorius ataupun dari epitel duktus terminal lobobular unit (TDLU). Karsinoma payudara mempunyai banyak variasi gambaran histologis.

2.8. Antioksidan

Tubuh memiliki mekanisme dalam mengatur kadar ROS melalui sistem antioksidan dapat dilihat pada gambar 2.6. Antioksidan adalah molekul yang dapat mencegah proses oksidasi yang dimediasi oleh ROS. Antioksidan bekerja melindungi sel dan jaringan sasaran dari kerusakan akibat radikal bebas dengan mencegah pembentukan dan kerja oksigen reaktif yang dapat menyebabkan kerusakan DNA, lemak, karbohidrat, dan protein.

Enzim antioksidan utama yang menetralkan ROS adalah superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT) dan glutathion peroksidase (GPx). SOD mengkatalisis dismutase superoksida menjadi H_2O_2 dan oksigen, sedangkan CAT dan GPx menetralkan H_2O_2 . Dua SOD utama pada eukariot adalah MnSOD dan Cu/ZnSOD yang ditemukan dalam sitoplasma. Kedua enzim ini penting untuk melindungi sel terhadap toksisitas oksigen. Mitokondria mengkonsumsi lebih dari 95% oksigen sel sehingga rantai transport oksigen mitokondria diyakini sebagai sumber utama pembentukan ROS endogen. Sehubungan dengan hal tersebut, MnSOD yang terletak dalam matriks mitokondria merupakan komponen penting yang pertama melakukan perlindungan fisiologi terhadap toksisitas oksigen.³



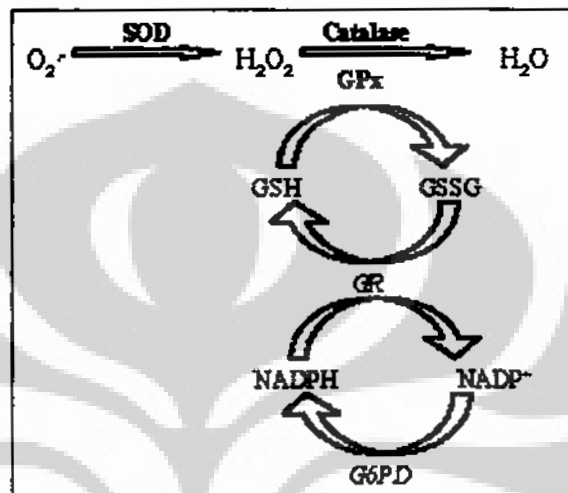
Gambar 2.6. Pembentukan ROS dalam rantai pernafasan dan regulasinya oleh antioksidan endogen.³¹

Selain antioksidan endogen ada pula antioksidan eksogen yang berasal dari luar tubuh, seperti α -tokoferol, vitamin C dan β -karoten. Kadar antioksidan pada beberapa subyek yang diteliti menunjukkan adanya efek suplemen antioksidan. Antioksidan berperan dalam pencegahan berbagai penyakit. Jaringan yang status antioksidannya baik dapat membantu menahan trauma, sedangkan jaringan yang sakit cenderung meningkatkan stres oksidatif.³

2.8.1. Enzim MnSOD (*Manganese Superoxide Dismutase*)

Enzim superoksida dismutase adalah salah satu enzim antioksidan endogen yang terletak pada matriks mitokondria yang dapat melindungi sel dari kerusakan oksidatif. Enzim ini menguraikan radikal bebas anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$) yang amat reaktif menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) yang kurang reaktif. Hidrogen peroksida

selanjutnya didetoksifikasi menjadi air oleh enzim katalase dan glutathion peroksidase (gambar 2.7.) Hidrogen peroksida dapat dengan mudah diubah menjadi radikal hidroksil melalui reaksi Fenton. Radikal hidroksil merupakan salah satu radikal bebas yang paling reaktif sehingga hydrogen peroksida berbahaya bagi sel.³



Gambar. 2.7. Detoksifikasi ROS oleh enzim SOD dan katalase³

Enzim SOD ditemukan pada semua organisme aerob, baik prokariot maupun eukariot. Enzim ini mengandung ion logam (Fe, Ni, Cu, Zn dan Mn) pada pusat aktifnya. Pada sel eukariot terdapat tiga isoform SOD yaitu Cu/ZnSOD, SOD ekstraseluler (EC-SOD) dan MnSOD (*Manganese Superoxide Dismutase*). Cu/Zn SOD atau SOD 1 terdapat dalam sitoplasma dengan aktivitas paling besar, kemudian MnSOD atau SOD 2 yang terdapat di mitokondria dengan aktivitas 10-20% dari aktivitas SOD sel dan terakhir EC-SOD atau SOD 3 terdapat dalam cairan ekstraseluler. Diantara ketiga SOD, enzim MnSOD merupakan enzim pertama dan utama dalam menangkal toksisitas radikal superoksida dan pertahanan kedua dilakukan oleh enzim Cu/ZnSOD yang terdapat di sitosol guna mendukung fungsi perlindungan dari MnSOD dengan menetralkan superoksida yang bocor dari mitokondria. Fungsi EC-SOD adalah menetralkan superoksida yang berada di permukaan sel serta di cairan dan matriks ekstraseluler. Enzim SOD sudah terbukti

amat efektif dalam penanganan inflamasi pada *colitis*, dimana SOD dapat menurunkan pembentukan ROS sehingga mencegah stres oksidatif.²³

Enzim MnSOD adalah enzim dengan struktur homotetramer yang disandi oleh DNA inti dan setelah disintesis akan ditranspor ke dalam matriks mitokondria. Ion mangan pada situs aktif MnSOD berada dalam bentuk Mn^{3+} dan penghilangan ion ini akan mengakibatkan enzim kehilangan aktivitas katalitiknya. Enzim ini mudah rusak pada pemanasan dan perlakuan dengan pelarut organik atau detergen, berbeda dengan Cu/ZnSOD yang lebih stabil. Namun MnSOD memiliki beberapa kelebihan yang membuatnya lebih cocok untuk penggunaan medis, misalnya karena MnSOD tidak dihambat oleh hidrogen peroksida dan memiliki waktu paruh 5-6 jam. Waktu paruh ini jauh lebih besar dari waktu paruh Cu/ZnSOD yang hanya 6-10 menit. MnSOD menetralkan anion superoksida yang sangat reaktif melalui dua langkah reaksi dismutase, dimana Mn^{3+} direduksi lalu direoksidasi dengan reaksi sebagai berikut.^{3,4}

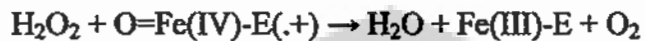
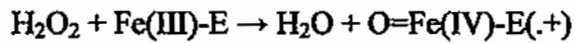
2.8.2. Enzim Katalase

Katalase adalah enzim yang ditemukan di hampir semua makhluk hidup yang terpapar oksigen. Fungsinya mengubah H_2O_2 menjadi air dan oksigen. Katalase merupakan salah satu enzim yang memiliki *turnover number* yang tinggi, satu mol enzim katalase dapat mengubah jutaan molekul peroksida menjadi air dan oksigen. pH optimum pada manusia adalah 7, namun masih dapat bekerja pada pH antara 6,8-7,5. Beberapa katalase memiliki pH optimum 4-11 tergantung spesiesnya, begitu pula suhu optimumnya.²⁴

Enzim katalase mengandung empat ion feri dan heme, berbentuk homotetramer yang masing-masing monomernya terdiri dari 500 asam amino. Katalase mula-mula ditemukan tahun 1818, namun nama katalase baru diberikan tahun 1900 oleh Oscar Loew yang menemukannya di berbagai tanaman dan hewan.

Katalase terutama terdapat di peroxisom, tapi terdeteksi juga di sitoplasma dan mitokondria (Radi *et al.* 1991, Kinnula *et al.* 1995, Fridovich 1998). Katalase tidak berperan penting pada katabolisme H_2O_2 jika produksi H_2O_2 rendah, namun menjadi penting jika produksi H_2O_2 meningkat (Jones *et al.* 1981).²⁴

Reaksi yang dikatalisis oleh enzim katalase terdiri dari dua tahap, yaitu:



Hidrogen peroksida ketika memasuki situs aktif, berinteraksi dengan asam amino Asparagin147 dan Histidin74 menyebabkan satu ion hidrogen ditransfer ke atom oksigen. Atom oksigen yang bebas membentuk molekul air dan $Fe(IV)=O$, lalu $Fe(IV)=O$ bereaksi dengan molekul hidrogen peroksida kedua membentuk $Fe(III)-E$ dan menghasilkan air dan oksigen.^{3,25} Katalase juga mengoksidasi berbagai toksin seperti formaldehid, asam format, fenol-fenol dan alkohol, dengan persamaan reaksi sebagai berikut:



Hidrogen peroksida merupakan metabolit dari proses metabolisme normal. Untuk mencegah kerusakan sel, hidrogen peroksida harus segera diubah menjadi senyawa yang tidak berbahaya.. Hidrogen peroksida digunakan sebagai zat antimikroba yang poten pada saat sel terinfeksi kuman patogen, seperti *M. tuberculosis*, *L.pneumophila* dan *C. jejuni*.²⁴

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan dan Disain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan hewan coba berupa tikus betina strain Sprague Dawley.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian:

Penelitian ini dilakukan di Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler serta di Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Penelitian dilakukan selama 18 (delapan belas) bulan sejak bulan April 2008 s/d bulan Oktober 2009.

3.3. Populasi dan Sampel

Populasi adalah tikus betina Sprague Dawley betina (*Rattus norvegicus* L) berusia 5-7 minggu dengan berat antara 100-200 gram yang diperoleh dari Laboratorium Badan Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta. Sampel adalah plasma darah dan jaringan payudara tikus populasi yang telah diinduksi dengan DMBA dengan dosis dan kurun waktu yang tertentu. DMBA diperoleh dari LABTIAP, Serpong.

3.4. Jumlah Sampel

Untuk menentukan jumlah ulangan pada masing-masing kelompok digunakan Rumus *Federer*:²⁶

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

t = jumlah kelompok perlakuan dimana dalam penelitian ini ada 6 kelompok.

n = jumlah ulangan pada masing-masing kelompok

Bila t = 6, maka jumlah ulangan masing-masing kelompok adalah: $n \geq 4$ atau $n = 5$. Jadi dalam penelitian ini digunakan 30 ekor tikus *Sprague Dawley* betina yang terbagi dalam 6 kelompok (masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor), yaitu: .

Kelompok kontrol : tikus yang hanya diberi minyak jagung

Kelompok 1: diinduksi DMBA 2 x 20 mg/kg BB selama 1 minggu.

Kelompok 2 : diinduksi DMBA 4 x 20 mg/kg BB selama 2 minggu.

Kelompok 3 : diinduksi DMBA 6 x 20 mg/kg BB selama 3 minggu.

Kelompok 4 : diinduksi DMBA 8 x 20 mg/kg BB selama 4 minggu.

Kelompok 5 : diinduksi DMBA 10 x 20 mg/kg BB selama 5 minggu.

3.5. Bahan dan Cara Kerja

3.5.1. Aklimatisasi dan Pemeliharaan Hewan Coba

Aklimatisasi hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus L.*) betina galur *Sprague Dowley* yang berusia 5 minggu dengan berat antara 130-200 g selama 2 pekan untuk adaptasi di *animal house*. Makanan tikus yang diberikan berupa *pellet* yang diperoleh dari PD Kasman, Jakarta dengan komposisi yang sudah diketahui, yaitu serat, protein dan lemak kasar. Pemberian makanan dan minuman kepada binatang percobaan dilakukan secara *ad libitum*, suhu kandang dijaga sekitar 25°C dan ada pertukaran gelap dan terang setiap 12 jam.²⁷

Masing-masing kelompok tikus diletakkan dalam kandang tersendiri dan dijaga sedemikian rupa sehingga tidak saling berinteraksi. Setiap kali akan diinduksi dan setiap pekan setelah induksi terakhir berat badan tikus ditimbang sampai tikus diterminasi.

3.5.2. Induksi kanker payudara dengan DMBA dan pengambilan sampel

Mula-mula tikus ditimbang untuk mengetahui volume larutan DMBA yang akan diberikan. Bahan yang digunakan adalah serbuk DMBA (Merck®) yang dilarutkan dalam minyak jagung. Induksi menggunakan sonde oral, seminggu dua kali dengan dosis 20 mg/kg BB yang dilarutkan dalam minyak jagung. Setiap tikus dengan berat \pm 200g mendapatkan \pm 1mL larutan dengan konsentrasai 4 mg/mL. Sonde untuk tikus kontrol dibedakan dengan tikus perlakuan untuk mencegah adanya kontaminasi.

Berat badan tikus ditimbang sebelum, selama dan setelah induksi. Terminasi tikus dilakukan lima minggu setelah induksi terakhir. Tiap kelompok tikus ditambah satu ekor kelompok kontrol dimatikan/diterminasi dengan anestesi menggunakan uap eter terlebih dahulu. Mula-mula diambil darahnya lalu diamati nodul yang ada pada payudara. Sebagian jaringan payudara difiksasi dengan 10% buffer formalin untuk menilai perubahan histopatologinya, setelah itu diwarnai dengan HE (Hematoksilin-Eosin). Sebagian lagi disimpan dalam *deep freezer* suhu -80°C untuk pembuatan homogenat jaringan.

3.5.3. Pengukuran Kadar Asam Sialat

Pengukuran kadar asam sialat dilakukan dengan modifikasi metode Warren.²⁸ Prinsipnya adalah membebaskan terlebih dahulu asam sialat dari protein plasma atau jaringan dengan cara hidrolisis ringan, kemudian dioksidasi dengan natrium metaperiodat dalam asam sulfat pekat. Hasil oksidasi direaksikan dengan asam

tiobarbiturat sehingga terbentuk kromofor yang dilarutkan dalam sikloheksanon dan diukur serapannya pada panjang gelombang 549-550 nm.

Pereaksi yang digunakan antara lain: TCA (asam trikloro asetat) 10 % dan 5%, H_2SO_4 0,1 N, larutan natrium periodat, larutan natrium arsenit 10%, larutan TBA (asam tiobarbiturat) 0,6% dalam Na_2SO_4 0,5 M, dan larutan sikloheksanon. Mula-mula dioptimalisasi panjang gelombang maksimal serapan dan dibuat kurva kalibrasinya menggunakan standar NANA (*N-Asetil Neuraminic Acid*).

Sebanyak 25 μL plasma/homogenat payudara ditambahkan 125 μL akuades dan 250 μL TCA 10% kemudian larutan divorteks sampai campuran merata dan disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Setelah disentrifugasi, supernatan dibuang lalu ke dalam endapan yang tersisa ditambahkan 250 μL TCA 5%, divorteks sampai campuran merata dan disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Setelah disentrifugasi, supernatan dibuang, lalu dihidrolisis dengan menambahkan larutan H_2SO_4 0,1 N sebanyak 125 μL . Tabung ditutup dan dikocok kemudian diletakkan di penangas air suhu 80°C selama 1 jam. Setelah itu disentrifugasi sebentar untuk mendapatkan hidrolisatnya.

Larutan natrium periodat sebanyak 12,5 μL ditambahkan ke dalam 12,5 μL hidrolisat dan langsung divorteks kemudian didiamkan selama 20 menit pada suhu kamar. Setelah ditambahkan 125 μL natrium arsenit 10%, dan divorteks lalu ditambahkan 375 μL larutan TBA 0,6% dalam Na_2SO_4 0,5 M. Tabung ditutup dan dikocok lalu diletakkan dalam penangas air mendidih selama 20 menit. Setelah didinginkan dalam penangas es selama 5 menit, ditambahkan 540 μL larutan sikloheksanon (Sigma) dan disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 5000 rpm. Fasa sikloheksanon yang terbentuk pada bagian atas larutan diperiksa densitas optiknya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 549 nm.

3.5.4. Analisis histopatologi tumor

Analisis perubahan histopatologi dilakukan dengan membaca pulasan jaringan secara *double blind* dengan mengamati morfologi sel menggunakan metode Ting yang dimodifikasi, kemudian diklasifikasikan berdasarkan skor 1 sampai dengan 5 seperti pada tabel 3.1.¹⁰

Tabel 3.1. Skor perubahan histopatologi jaringan payudara tikus.

Skor	Ciri histopatologi
1	Normal
2	Hiperplasia
3	Hiperplasia dengan atipia
4	Perubahan neoplastik seperti <i>ductal carcinoma in situ</i>
5	<i>Invasive ductal carcinoma</i>

3.5.5. Pengukuran Kadar Malondialdehid (MDA)

Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan metode Wills.²⁹ Prinsipnya adalah mereaksikan MDA dengan asam tiobarbiturat sehingga terbentuk senyawa berwarna yang memberikan serapan maksimal pada panjang gelombang 530 nm. Bahan yang digunakan antara lain: plasma darah, supernatan homogenat jaringan payudara, larutan asam trikloroasetat (TCA) 20%, larutan asam tiobarbiturat (TBA) 0,67% dan larutan standar tetraetoksipropan.

Terhadap masing-masing standar Tetra Etoksi Propan (TEP) yang diencerkan 1:80.000 sebanyak 400 μ L ditambahkan 200 μ L TCA 20% lalu divortex sehingga terlihat campuran menjadi keruh. Campuran kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipisahkan untuk pemeriksaan selanjutnya dan ampasnya dibuang. Sebanyak 400 μ L TBA 0,67% ditambahkan terhadap supernatan dan dilanjutkan dengan pemanasan di atas penangas air 96^oC selama 10 menit. Setelah itu larutan disentrifugasi kembali pada 5000 rpm selama 5

menit dan dibaca serapannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 530 nm.

Sampel plasma/homogenat jaringan dipipet ke dalam tabung ependorf 1,5 cc sebanyak 50 μ L dan diencerkan dengan air sebanyak 350 μ L. Larutan ini ditambahkan 200 μ L TCA 20% lalu divortex dan disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan ditambahkan 400 μ L TBA 0,67%, kemudian dipanaskan di atas penangas air 96°C selama 10 menit. Setelah itu larutan disentrifugasi kembali pada 5000 rpm selama 5 menit dan dibaca serapannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 530 nm.

3.5.6. Pengukuran kadar senyawa karbonil

Teknik pengukuran senyawa karbonil menggunakan metode modifikasi Levine et.al.³⁰ Prinsip pengukuran senyawa karbonil adalah gugus karbonil akan bereaksi dengan senyawa DNPH (dinitrofenil hidrazin) membentuk suatu senyawa berwarna yang dapat diukur serapannya pada panjang gelombang 355-390 nm. Bahan-bahan yang digunakan antara lain larutan 10 mM 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) yang dilarutkan dalam HCl 2,5 M, larutan TCA 20% dan 10%, campuran etanol:etil asetat = 1:1, serta larutan guanidine HCl 6M.

Mula-mula disiapkan dua tabung berisi 100 μ L supernatan homogenat jaringan payudara tikus, masing-masing untuk sampel dan kontrol. Ke dalam tabung sampel dimasukkan 400 μ L larutan DNPH, sedangkan ke dalam tabung kontrol dimasukkan HCl 2,5 M dengan jumlah yang sama. Kedua tabung diinkubasi di tempat gelap selama satu jam dan divorteks tiap 15 menit. Kemudian kedua tabung diberi larutan TCA 20% sebanyak 500 μ L dan diinkubasi selama 5 menit di dalam es lalu disentrifugasi pada 10.000 g, 4°C selama 10 menit dan dibuang supernatannya. Kemudian prosedur diulangi dengan pemberian TCA 10% pada tiap tabung tersebut. Endapan yang terbentuk dicuci tiga kali dengan campuran etanol:etil asetat = 1:1,

setiap kali sebanyak 500 μL . Kemudian divorteks keras dan ditambahkan larutan guanidine HCl 6M sebanyak 250 μL . Setelah divorteks dan disentrifus, larutannya diukur serapannya pada panjang gelombang 370 nm.

3.5.7. Pengukuran aktivitas spesifik enzim katalase

Pengukuran aktivitas spesifik katalase menggunakan metode Mates et al yang dioptimasi kembali sesuai dengan sampel serta situasi dan kondisi laboratorium yang ada.³¹ Mula-mula ditentukan absorbansi pengenceran H_2O_2 yang optimal dan panjang gelombang maksimal dengan spektrofotometer. Kemudian ditentukan pula pengenceran sampel yang optimal sehingga serapan maksimal 0,700.

Kinetika katalase dilakukan dengan menggunakan absorbansi 975 μL H_2O_2 oleh blanko (PBS pH 7,4) maupun sampel (25 μL) setiap menit selama 10 menit. Selanjutnya penguraian H_2O_2 , baik oleh blanko maupun sampel didapat dengan cara mengurangi absorbansi di awal (t_0) dengan absorbansi pada menit-menit berikutnya (menit ke-x, t_x). Selisih penguraian oleh sampel dikurangkan dengan selisih penguraian oleh blanko, kemudian dihitung kecepatan reaksi setiap menit, sehingga didapatkan waktu terbaik penguraian H_2O_2 oleh sampel. Hasil pengukuran dan perhitungan dicatat dalam bentuk tabel dan kurvanya.

Penentuan aktivitas spesifik katalase sampel dihitung berdasarkan penguraian H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 pada panjang gelombang 210 nm. Dekomposisi H_2O_2 diamati secara spektrofotometri berdasarkan penurunan serapan pada panjang gelombang maksimum. Pengukuran aktivitas katalase dilakukan pada pH 7,0 karena suasana yang terlalu asam atau basa dapat menyebabkan hilangnya aktivitas katalase. Satu unit aktivitas spesifik didefinisikan sebagai kecepatan penguraian satu mikromolar H_2O_2 per menit per miligram protein jaringan/plasma. Aktivitas katalase

$$(\text{Unit/mL}) = \frac{(\Delta \text{ serapan uji} - \Delta \text{ serapan blanko})/\text{menit}}{(\text{molaritas } \text{H}_2\text{O}_2) \times (\text{volume sampel yang diukur})} \times \text{faktor pengenceran}$$

Hasil perhitungan tersebut digunakan untuk menghitung aktivitas spesifik katalase (U/mg protein), sehingga:

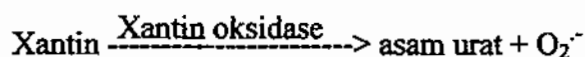
$$\text{Aktivitas spesifik katalase (Unit/mg protein)} = \frac{\text{Aktivitas katalase (U/mL)}}{\text{Kadar protein (mg/mL)}}$$

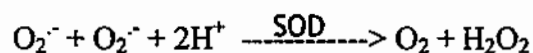
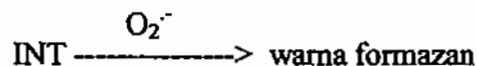
3.5.8. Pengukuran aktivitas spesifik enzim MnSOD

Untuk pengukuran aktivitas MnSOD darah digunakan 300 μL darah ditambahkan 900 μL larutan lisis sel dan diinkubasi selama 10 menit. Selanjutnya larutan disentrifugasi, supernatannya dibuang dan pelletnya yang merupakan sel darah putih divortex. Pellet dilisis dengan menggunakan larutan lisis inti sebanyak 300 μL . Sebanyak 25 μL larutan ini digunakan untuk pengukuran kadar MnSOD darah.

Aktivitas MnSOD ditentukan secara biokimia menggunakan kit RanSOD[®]. Pereaksi-pereaksi pada kit ini terdiri dari *mixed substrat* yang mengandung xantin, buffer fosfat untuk mengencerkan (standar maupun sampel), xantin oksidase dan larutan standar untuk membuat kurva standar.

Prinsip pemeriksaan MnSOD dengan menggunakan kit ini adalah pengukuran besarnya inhibisi pembentukan radikal superoksida oleh MnSOD. Xantin yang terdapat dalam *mixed substrat* akan diubah oleh enzim xantin oksidase menjadi asam urat dan menghasilkan radikal superoksida (O_2^-). Radikal ini akan bereaksi dengan 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyl tetrazoline chloride (INT) membentuk warna merah formazan yang dapat diukur serapannya pada panjang gelombang 505 nm. Aktivitas MnSOD ditetapkan dengan penambahan NaCN ke dalam reaksi tersebut untuk menghambat aktivitas CuSOD dan ZnSOD.





Mula-mula 25 μL sampel/standar dimasukkan ke dalam kuvet dan ditambahkan 850 μL *mixed substrat* serta dicampur dengan baik. Untuk menghambat CuSOD dan ZnSOD ditambahkan 5 μL natrium sianida 5 mM ke dalam campuran sampai tercampur baik. Setelah itu ditambahkan 125 μL xantin oksidase dan dihitung sebagai t_0 . Serapan dibaca pada panjang gelombang 505 nm pada 30 detik pertama (A1) dan 3 menit kemudian (A2).

Perhitungan:
$$\frac{A1 - A2}{3} = \Delta A/\text{menit}$$

Kecepatan sampel diluent/bufer fosfat (S1) = kecepatan yang tidak diinhibisi = 100%

$$\% \text{ inhibisi} = 100 - \left(\frac{\Delta A \text{ standar/menit} \times 100}{\Delta A \text{ S1/menit}} \right)$$

$$100 - \left(\frac{\Delta A \text{ sampel/menit} \times 100}{\Delta A \text{ S1/menit}} \right)$$

% inhibisi sampel yang diperoleh diplot pada kurva log 10/semilog standar.

Aktivitas spesifik enzim MnSOD pada darah dan jaringan dihitung per mg protein. Sebanyak 5 μL plasma/homogenat diencerkan hingga 1 mL. Kadar protein diukur pada panjang gelombang 280 nm dan dibandingkan dengan standar BSA (*Bovine Serum Albumin*).

3.5.9. Analisis Statistik

Analisis statistik dilakukan dengan bantuan program statistik *PASW 18 (Predictive Analytic Software)*. Semua data hasil pengukuran dilakukan uji normalisasi menurut distribusi Gaussian dengan pendekatan uji Kolmogorov-Smirnov dan uji homogenitas Levene. Bila distribusi data tidak memenuhi persyaratan, maka dilakukan proses transformasi. Analisis dilanjutkan dengan uji Anova dan uji post hoc untuk melihat adanya perbedaan antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Depkes RI. No. LB.03.02/KE/4529/08 tertanggal 12 November 2008 (Lampiran 1). Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian besar lain mengenai enzim MnSOD. Penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya antara lain mengenai aktivitas dan ekspresi gen MnSOD yang diinduksi hipoksia sistemik dan stres oksidatif pada induksi karsinogenesis kimia menggunakan FAA (N-2-fluorenilasetamida) pada tikus.

4.1. Induksi karsinogenesis dengan DMBA dan skor histopatologi

Telah dilakukan induksi karsinogenesis payudara tikus Sprague Dawley betina dengan menggunakan DMBA secara oral dengan dosis 20 mg/kg BB yang dilarutkan dalam minyak jagung. Hasil penimbangan berat badan sebelum, selama dan setelah induksi disajikan pada lampiran 2 dan 3. Dari data berat badan tikus selama penelitian menunjukkan bahwa tikus kontrol tidak mengalami penurunan dan fluktuasi berat badan, bahkan tampak berat badan relatif meningkat (dari 160 gram sebelum induksi menjadi 223.5 gram setelah induksi). Semua tikus kelompok perlakuan mengalami fluktuasi berat badan, baik yang diberi DMBA dosis rendah maupun tinggi, namun juga tidak mengalami penurunan berat badan. Ketiadaan penurunan berat badan ini kemungkinan disebabkan karena induksi karsinogenesis kimia dengan DMBA yang dilakukan pada penelitian ini masih dalam tahap awal sehingga belum berdampak pada penurunan berat badan tikus. Selain itu tikus yang digunakan adalah tikus yang masih dalam tahap pertumbuhan, yaitu usia 5-7 minggu sedangkan usia pubertas 6-11 minggu sehingga masih terjadi peningkatan berat badan sejalan dengan bertambahnya usia.

Ketiadaan efek penurunan berat badan juga diperoleh pada penelitian Barnejee et.al. dan Kauffman et.al. serta Meiyanto dkk. Barnejee menginduksi dengan dosis 10 mg/BB DMBA pada tikus Sprague Dawley betina usia 45 hari

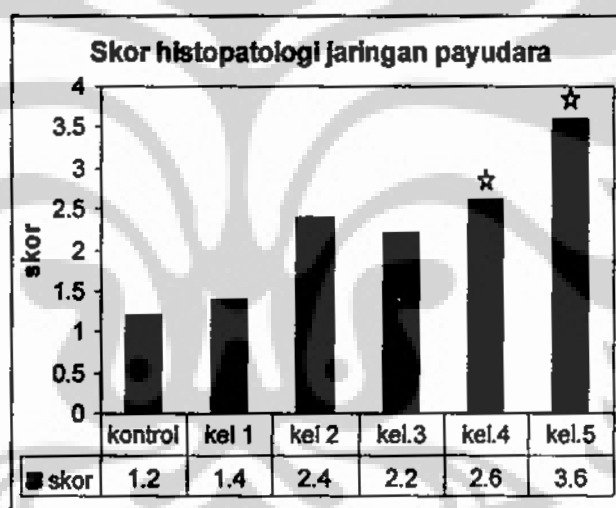
dan melakukan euthanasia setelah 120 hari (17 minggu lebih). Hasilnya tidak ada efek perbedaan berat badan antara kontrol dan perlakuan dan kejadian tumor tumbuh pada hari ke32-35 setelah induksi (alveolar), 40-60 hari (ductal). Sedangkan Kaufmann menginduksi 100 mg /kg BB DMBA (1x) pada tikus SD betina usia 35-40 hari dan euthanasia dilakukan 22 minggu kemudian. Berdasarkan penelitian Meiyanto dan kawan-kawan yang menginduksi 20 mg/kg BB 2 x seminggu selama 5 minggu DMBA pada tikus SD betina usia 45 hari, euthanasia dilakukan 2 hari (16 minggu) kemudian, hasilnya tidak ada penurunan berat badan antara kontrol dan perlakuan (DMBA). Peningkatan BB kontrol lebih besar pada perlakuan dan tumor tumbuh pada minggu ke12 setelah induksi pada 100% tikus perlakuan.^{32,33,34}

Sebelum pembedahan, dijumpai adanya benjolan (nodul) pada payudara tikus. Hasil lengkap yang menunjukkan jumlah nodul terdapat pada tabel 2. Pada kelompok kontrol tidak ditemukan adanya nodul, sedangkan pada kelompok 1 hanya ditemukan 1 nodul. Pada kelompok 2 ada 6 nodul yang terdapat pada 3 ekor tikus, masing-masing memiliki 2 nodul. Pada kelompok 3 terdapat masing-masing 2 nodul pada 3 ekor tikus sehingga jumlah total nodul kelompok 3 adalah 6. Kelompok 4 terjadi 9 nodul dengan ukuran yang lebih besar dari kelompok 3 pada masing-masing 3 ekor tikus, sedangkan pada kelompok 5 terdapat 3 nodul sebesar nodul pada kelompok 4 pada 2 ekor tikus dan 4 nodul yang lebih besar pada seekor tikus sehingga jumlah nodul pada kelompok 5 ada 10. Dengan demikian makin lama waktu karsinogenesis menyebabkan makin banyak dan makin besar ukuran nodul yang ditemukan.

Tabel 2. Jumlah nodul payudara tikus yang diinduksi DMBA sebelum dilakukan pembedahan

kelompok	keterangan
kontrol	tak ditemukan nodul
1	1 nodul kecil di bag.bawah dalam payudara (1 ekor)
2	2 nodul kecil di bagian bawah dalam payudara (3 ekor)
3	2 nodul agak besar di jaringan dalam payudara (3 ekor)
4	3 nodul agak besar di jaringan payudara (3 ekor)
5	4 nodul amat besar di atas & bawah kanan kiri (1 ekor)
	3 nodul besar di kanan dan kiri bawah payudara (2 ekor)

Hasil penilaian skor histopatologi dari setiap preparat jaringan payudara tikus diklasifikasikan sesuai dengan metode Ting yang dimodifikasi (Lampiran 4, gambar 2.1). Hasil skor histopatologi yang diuji dengan tes Annova didapat bahwa kelompok perlakuan berbeda dengan kelompok kontrol ($p = 0.012$). Dari uji lanjutan dengan tes Post Hoc diperoleh bahwa skor histopatologi kelompok 1, kelompok 2 dan kelompok 3 tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ($p = 0.519, 0.061$ dan 0.115). Skor histopatologi kelompok 4 dan kelompok 5 berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ($p = 0.031$ dan 0.001). Hal ini sesuai dengan skor histopatologi pada kelompok 5, dimana sudah terdapat karsinoma in situ (skor 4) pada seekor tikus dan karsinoma invasif (skor 5) pada 2 ekor tikus yang diinduksi DMBA.



Gambar 4.1. Skor histopatologi jaringan payudara tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi dengan DMBA.

Tanda * menunjukkan hasil yang bermakna secara statistik dibandingkan dengan kelompok kontrol (Uji post hoc. $p < 0.05$)

Pada tabel 3 dan lampiran 4 terlihat pada tikus kelompok kontrol tidak ditemukan nodul dan skor histopatologinya rata-rata 1.2 ± 0.45 , hanya ada skor 1 (pada 4 ekor tikus) dan skor 2 (pada 1 ekor tikus). Pada kelompok 1 hanya ada 1 nodul dengan angka kejadian nodul per ekor sebesar 0.2. Skor histopatologi rata-rata 1.4 ± 0.55 , dimana terdapat 3 ekor dengan skor 2 dan 2 ekor skor 1. Kejadian nodul dan jumlah nodul pada kelompok 2 dan 3 nilainya sama yaitu masing-masing 6 nodul dan angka kejadian tumornya 1.2, namun rata-rata skor histopatologi kelompok 2 sebesar 2,4 sedangkan kelompok 3 sebesar 2,2. Pada

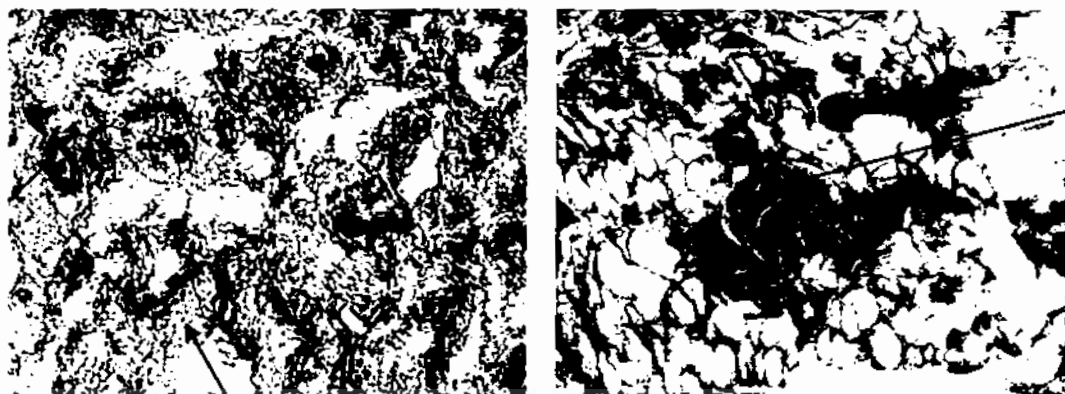
kelompok 4 ada 9 nodul dengan angka kejadian nodul per ekor sebesar 1.8 dan rata-rata skor histopatologi 2.6 ± 0.55 . Pada kelompok 5 terjadi peningkatan jumlah nodul yaitu 10 nodul dengan angka kejadiannya 2 dengan rata-rata skor 3.6 ± 1.67 . Dengan demikian makin besar dosis DMBA yang diberikan, makin banyak pula jumlah nodul dan kejadian tumor, seperti yang terlihat pada kelompok 5 dengan pemberian DMBA sebanyak 10 X 20 mg/kg BB didapat 2 ekor tikus memperlihatkan skor 5 dan 1 ekor skor 4.

Tabel 3. Rata-rata kejadian tumor dan jumlah nodul per ekor serta skor histopatologi pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

Kelompok	Jumlah nodul	Kejadian nodul per ekor	Skor histopatologi
Kontrol	0	0	1.2 +0.45
Kel.1	1	0.2	1.4 +0.55
Kel.2	6	1.2	2.4 + 0.89
Kel.3	6	1.2	2.2 + 1.09
Kel.4	9	1.8	2.6 + 0.55
Kel.5	10	2	3.6 + 1.67

Pemeriksaan histopatologi merupakan pemeriksaan yang sering dilakukan untuk melihat gambaran kerusakan jaringan yang diakibatkan oleh suatu penyakit. Demikian juga pada kanker, meskipun sudah ada pemeriksaan penanda biokimia yang dapat mendeteksi kanker secara dini, namun untuk melihat jenis dan perubahan bentuk sel tumor serta perubahan struktur pada jaringan kanker maka pemeriksaan histopatologi sangat diperlukan.²

Hasil pemeriksaan histopatologi yang mewakili setiap skor ditunjukkan pada gambar 4.2, 4.3 dan 4.4. Hal ini menunjukkan bahwa telah berhasil dilakukan induksi karsinogenesis kimia payudara dengan DMBA dengan dosis yang digunakan. Hasil ini sama dengan yang dilakukan oleh Eruwibowo yang menginduksi tikus dengan dosis yang sama (20 mg/kg BB) sebanyak 10 kali (belum dipublikasi). Dari semua tikus hanya terdapat masing-masing 1 ekor yang memiliki skor 4 dan 2 ekor dengan skor 5 karena karsinogenesis pada penelitian ini dilakukan dalam jangka waktu yang tidak lama (6 sampai 10 minggu).



(A)

(B)

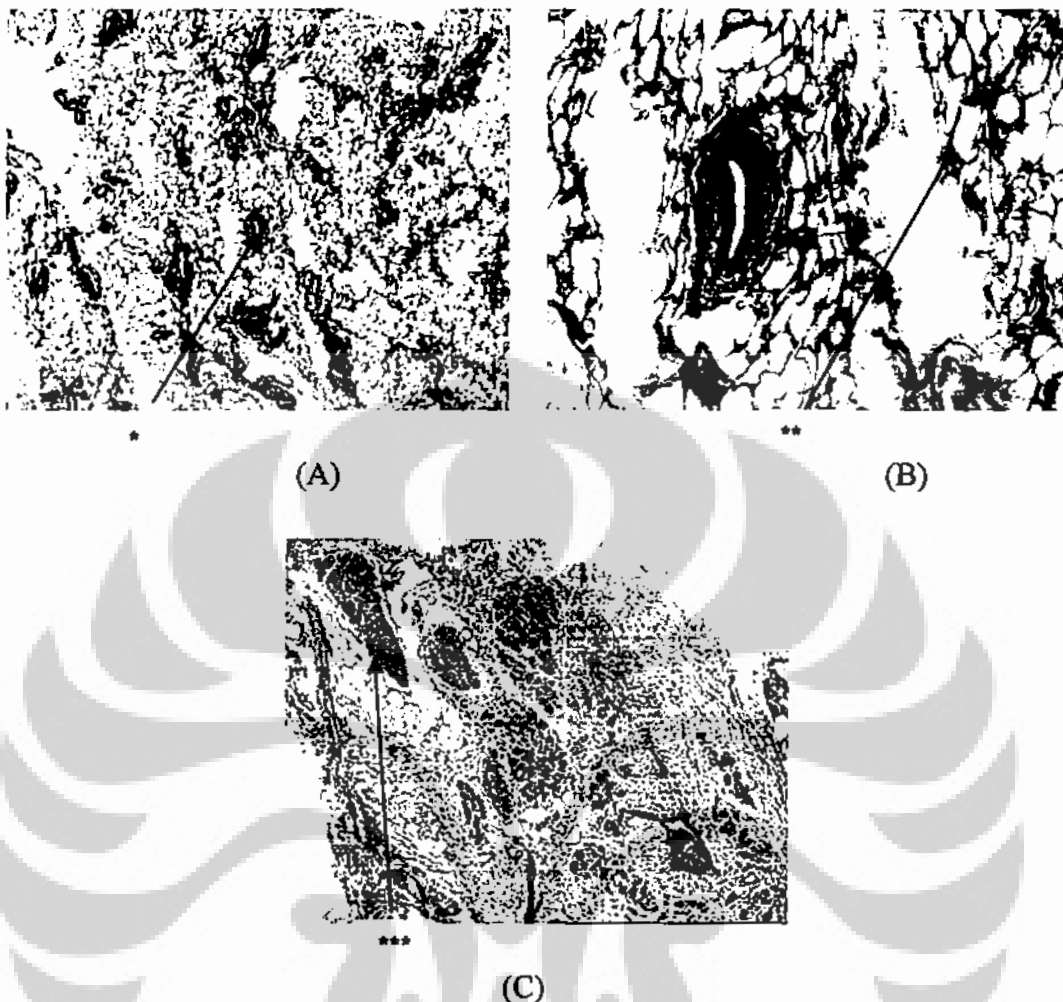
Gambar 4.2. Gambaran histopatologi jaringan payudara tikus dengan skor 1, perbesaran 10X pada (A) dan perbesaran 40X pada (B).

Tanda * adalah kelenjar payudara dan tanda** jaringan adipose.

Pada preparat jaringan payudara tikus dengan skor 1 (jaringan payudara tikus normal) dengan perbesaran 10 X menunjukkan sebagian besar lapang pandang terdiri dari sel adipose dengan beberapa kelenjar susu dan kadang ada pembuluh darah. Bentuk sel masih normal dan hanya satu lapis sel tanpa ada pembesaran inti.⁴³ Dari hasil skor histopatologi kelompok kontrol, hampir semuanya menunjukkan skor normal, kecuali satu tikus nomor 5. Pada kelompok 2 dijumpai 3 ekor tikus yang memiliki skor 1, sedangkan 2 ekor tikus memiliki skor 2.

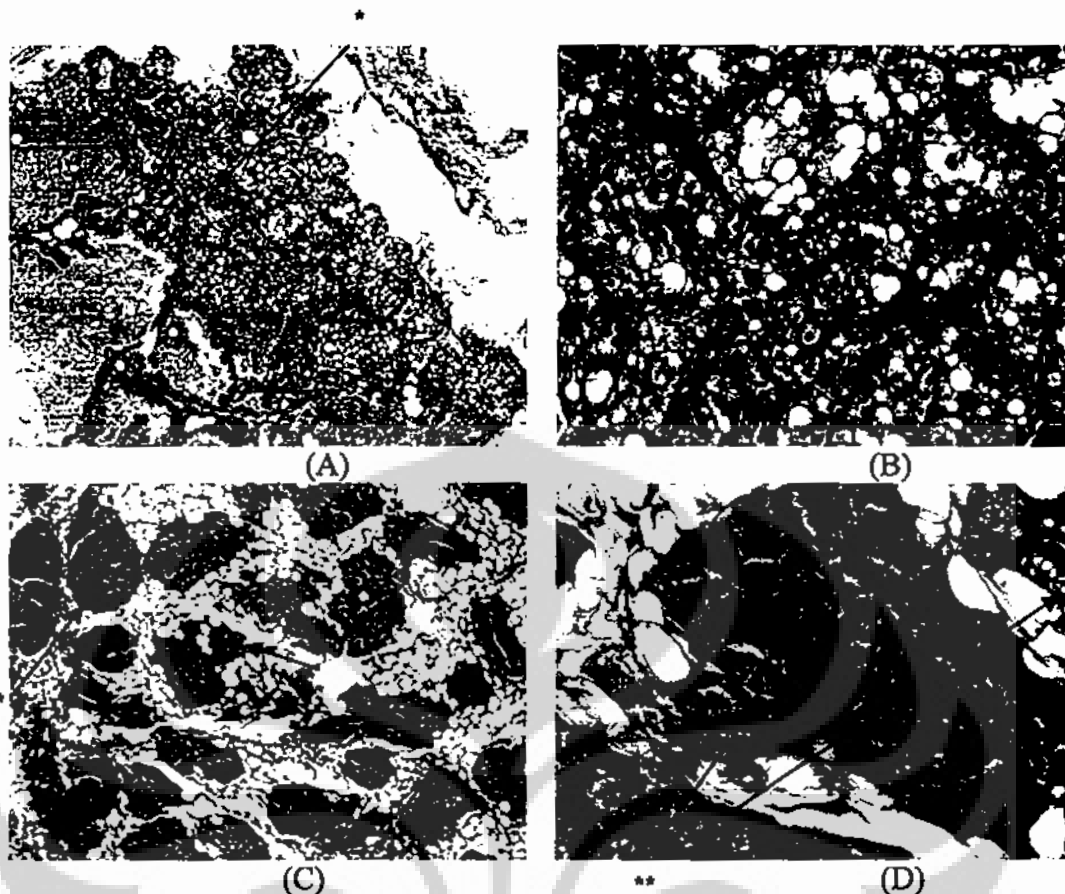
Pada skor histopatologi 2 kelenjar susu mulai mendominasi lapang pandang karena adanya hiperplasia epitel kelenjar payudara maupun duktus dan jumlahnya lebih banyak dari normal. Kadang-kadang terlihat sel epitel yang lebih dari selapis. Skor 2 dijumpai pada seekor tikus kelompok kontrol, 2 ekor kelompok 1, 3 ekor kelompok 2, 1 ekor kelompok 2, 3 ekor kelompok 3 dan 2 ekor kelompok 4.

Skor histopatologi 3 tidak dijumpai pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan 1, sedangkan kelompok 3 ditemui ada 3 ekor tikus dengan skor 3. Pada kelompok 4 dijumpai 3 ekor tikus dengan skor 3 dan kelompok 5 hanya ada 1 ekor. Pada skor ini dijumpai sel-sel yang menyebar dimana bentuk sel mulai berubah.



Gambar 4.3. Gambaran histopatologi jaringan payudara tikus yang diinduksi DMBA dengan skor 2 (A), (B) dan skor 3 (C). Perbesaran 10X pada (A) dan (C), perbesaran 40X pada (B). Tanda * adalah kelenjar payudara dan tanda** jaringan adipose, tanda***menunjukkan hiperplasia.

Perubahan neoplastik dan terjadinya *ductal carcinoma in situ* (skor 4) mulai terlihat pada kelompok perlakuan yang diinduksi DMBA 6 x 20mg/kg BB. Ada 2 ekor tikus yang memiliki skor 4 yaitu pada kelompok 3 dan lima, masing-masing 1 ekor. Pada derajat 5 terdapat kelompok-kelompok sel kanker yang invasif. Derajat histopatologi 5 hanya ada pada 2 ekor tikus pada kelompok 5 yang diberikan dosis 10 x 20mg/kg BB. Hal ini menunjukkan bahwa karsinogenesis merupakan suatu proses dan perlu waktu yang lebih lama untuk sampai pada kanker yang invasif.³⁶

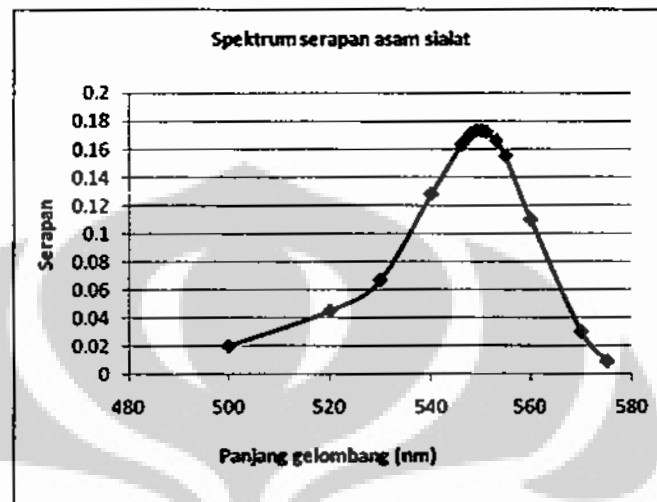


Gambar 4.4. Gambaran histopatologi jaringan payudara tikus yang diinduksi DMBA dengan skor 4 (A dan B) dan skor 5 (C dan D). Perbesaran 10X pada (A), (C), perbesaran 40X pada (B), (D). Tanda * menunjukkan adanya *ductal carcinoma in situ*. Tanda** menunjukkan karsinoma invasif

4.2. Kadar asam sialat

Pada penelitian ini telah dilakukan optimasi kondisi untuk pengukuran kadar asam sialat plasma darah dan jaringan dengan memodifikasi metode Warren.²⁸ Optimasi diawali dengan membuat spektrum absorpsi asam sialat untuk mengetahui panjang gelombang maksimal yang akan dipergunakan selanjutnya. Digunakan kadar 100 $\mu\text{g/mL}$ dan dimulai dari panjang gelombang 500 nm sampai 575 nm. Diperoleh absorpsi maksimal terjadi pada panjang gelombang 549-550 nm (Lampiran 5) sehingga pengukuran selanjutnya dilakukan pada panjang gelombang 549 nm. Menurut Warren, ada sejumlah lipid tidak jenuh yang menghasilkan MDA pada oksidasi periodat dan berkontribusi pada densitas

optik pada panjang gelombang 532 dan 549 nm, namun dari hasil optimasi ini tidak ditemukan puncak pada 532 nm dan hanya ada satu puncak tajam pada panjang gelombang antara 549-550 nm (gambar 4.5).

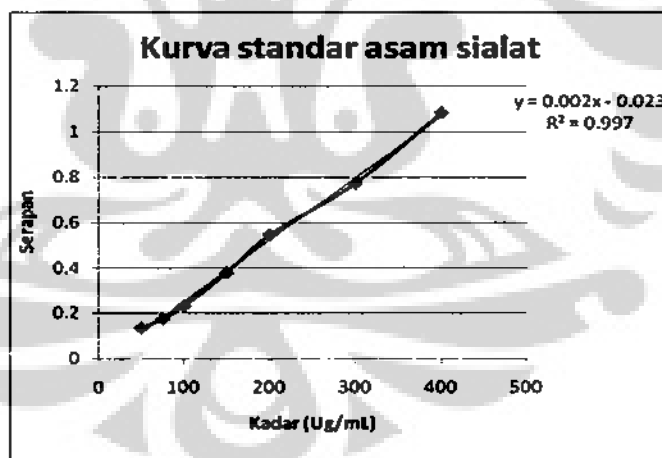


Gambar 4.5 Spektrum serapan asam sialat, didapat λ_{max} 549-550 nm

Optimasi metode Warren dipengaruhi oleh banyak faktor, antara lain kondisi hidrolisis, ukuran dan jumlah sampel, penggunaan TCA dan stabilitas larutan TBA. Hidrolisis sampel dilakukan menggunakan larutan H_2SO_4 0,1 N pada suhu diatas $80^{\circ}C$ selama satu jam. Ukuran dan jumlah sampel mempengaruhi jumlah pereaksi yang digunakan yang belum tentu sama dalam perbandingan berat dan volume. Penggunaan TCA sebagai pengendap protein juga memerlukan optimasi karena kandungan protein sampel berbeda-beda untuk tiap jaringan dan plasma. Stabilitas larutan TBA juga berpengaruh karena larutan ini relatif tidak stabil, mengendap pada suhu kamar. Menurut Warren larutan TBA stabil selama \pm satu bulan, namun pada kondisi penelitian ini larutan TBA hanya stabil selama \pm satu minggu. Tahap penambahan larutan periodat mempengaruhi pengukuran kadar asam sialat karena oksidasi periodat membutuhkan suasana asam kuat agar gugus asetil atau gliksil lepas dari gugus amino. Pembentukan warna meningkat dengan peningkatan jumlah periodat dan menurun pada suhu $37^{\circ}C$ dibandingkan pada suhu kamar.^{35,36}

Ada beberapa cara lain pengukuran kadar asam sialat, diantaranya dengan ELISA, namun metode Warren paling tepat digunakan pada kondisi penelitian ini. Metode ini dipilih karena pertimbangan bahan dan alat yang digunakan meskipun menurut Sobenin metode kolorimetri Warren tidak terlalu spesifik karena adanya beberapa senyawa yang dapat mengganggu hasil, diantaranya MDA dan aldehid-aldehid lain dalam sirkulasi. Kekurangan ini diminimalisir dengan menggunakan kontrol yang dibuat dengan perlakuan yang sama dengan sampel di setiap langkah.³⁶

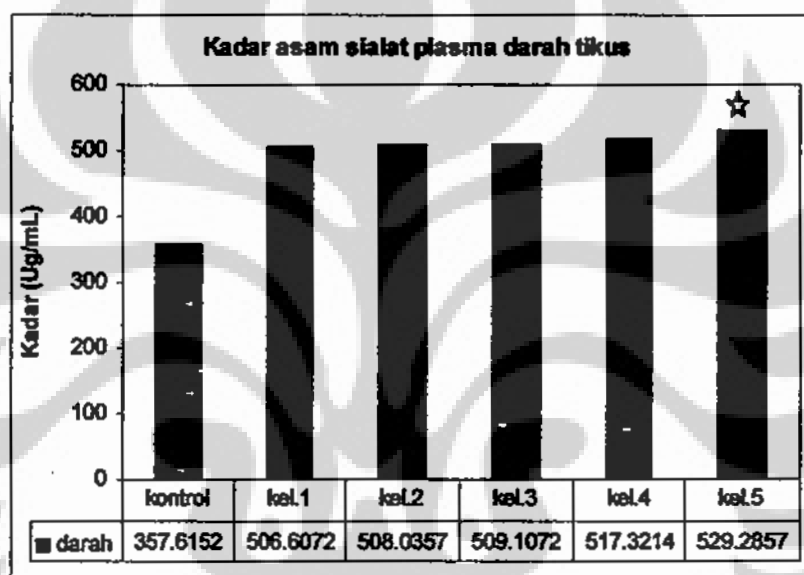
Setiap kali pengukuran kadar asam sialat sampel, dibuat juga kurva standar menggunakan NANA (*N-Asetil Neuraminic Acid*) dengan berbagai konsentrasi mulai dari 50 µg/mL sampai 300 µg/mL atau disesuaikan dengan sampel yang akan diukur. Persamaan yang didapat digunakan untuk menghitung kadar asam sialat sampel. Salah satu kurva standar asam sialat dapat dilihat pada gambar 4.6, hasil serapan maksimal dan serapan sampel terdapat dalam lampiran 5.



Gambar 4.6. Kurva standar pengukuran MDA menggunakan tetraetoksipropan

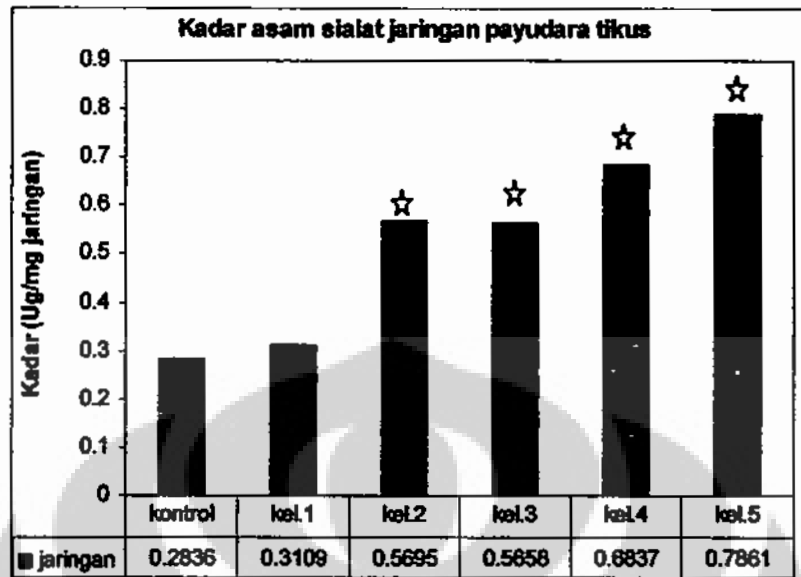
Pada gambar 4.7 terlihat kadar asam sialat plasma tikus yang diinduksi dengan DMBA menunjukkan peningkatan dibanding dengan kontrol pada semua perlakuan. Secara statistik peningkatan kadar asam sialat terhadap kelompok kontrol bermakna hanya pada kelompok 5 ($p = 0.046$), sedangkan kelompok 1-4 tidak bermakna ($p > 0.05$). Peningkatan kadar asam sialat plasma darah semua kelompok perlakuan relatif sama, yaitu antara 506 µg/mL (kelompok 2) sampai

529 $\mu\text{g/mL}$ (kelompok 5). Hal ini dimungkinkan karena kadar asam sialat dalam darah mewakili kadar sistemiknya. Tingginya kadar asam sialat di plasma darah tikus yang mendapat perlakuan adalah karena adanya proses pengelupasan membran pada keganasan sehingga asam sialat yang terikat pada glikoprotein dan glikolipid membran akan turut dilepaskan ke dalam plasma. Peristiwa ini disebut dengan *shedding*.¹⁷ Peningkatan kadar asam sialat plasma pada penelitian ini menambah kemungkinan bahwa kadar asam sialat plasma dapat digunakan sebagai penanda dini tumor.



Gambar 4.7. Kadar asam sialat darah tikus yang diinduksi DMBA.
Tanda * menunjukkan hasil yang bermakna secara statistik dibandingkan dengan kelompok kontrol (Uji post hoc. $p < 0.05$)

Peningkatan kadar asam sialat tumor di dalam plasma akan diikuti dengan peningkatan kadarnya di dalam jaringan. Kadar asam sialat jaringan payudara tikus yang diinduksi DMBA meningkat dibanding kontrol dan peningkatannya bermakna kecuali pada kelompok 1 ($p = 0,725$) (Gambar 4.8). Peningkatan kadar asam sialat pada jaringan payudara tikus mulai meningkat secara bermakna pada kelompok 2 ($p = 0.001$), demikian juga pada kelompok 3 ($p = 0.001$), kelompok 4 ($p = 0.000$) dan kelompok 5 ($p = 0.000$).



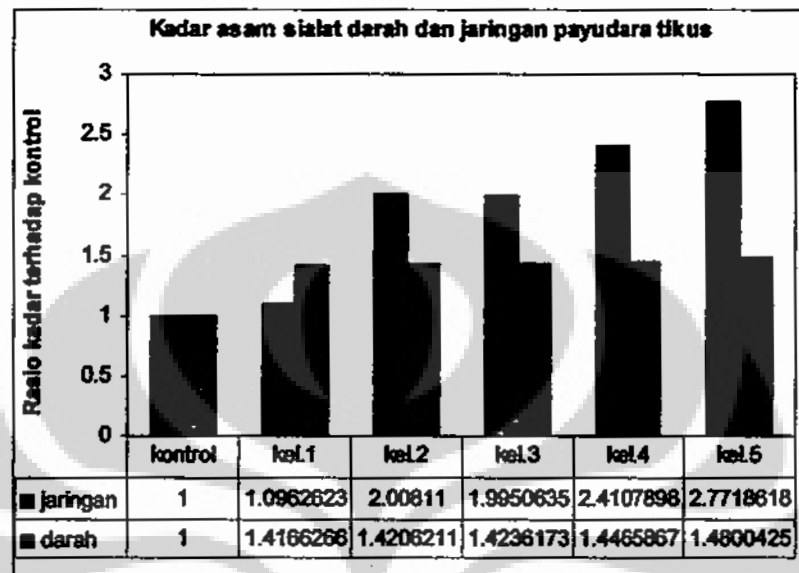
Gambar 4.8. Kadar asam sialat jaringan payudara tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.

Tanda * menunjukkan hasil yang bermakna secara statistik dibandingkan dengan kelompok kontrol (Uji post hoc, $p < 0.05$)

Asam sialat merupakan komponen glikoprotein dan glikolipid membran yang banyak berperan dalam pengenalan seluler dan molekuler. Peningkatan kadar asam sialat dalam berbagai jaringan tumor mencerminkan reaksi inflamasi terhadap tumor yang mengakibatkan meningkatnya sekresi protein fase akut oleh sel. Teori lain yang mendukung tingginya kadar asam sialat pada jaringan tumor adalah bertambahnya jumlah sel-sel baru yang banyak mengandung asam sialat. Selain itu peningkatan ini juga disebabkan oleh peningkatan ekspresi enzim sialiltransferase, yaitu enzim yang diperlukan untuk biosintesis sialokonjugat pada berbagai jaringan tumor. Peningkatan enzim ini akan menyebabkan peningkatan jumlah asam sialat pada glikoprotein yang terdapat pada membran sel.¹⁷

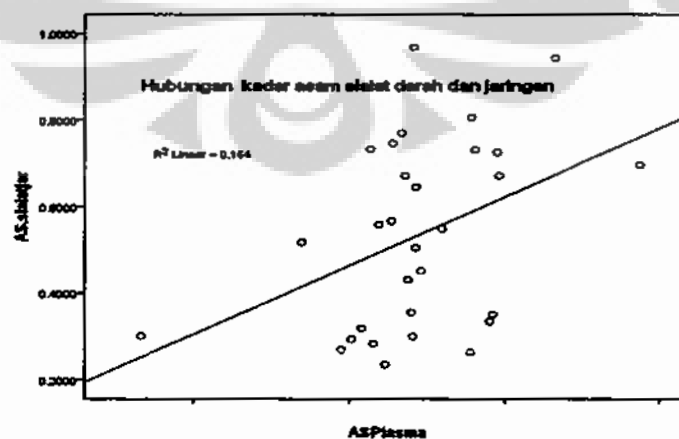
Gambar 4.8. menunjukkan perbandingan antara kadar asam sialat plasma dan jaringan yang diinduksi dengan DMBA. Dari gambar ini dapat dilihat bahwa kadar asam sialat pada plasma kelompok perlakuan meningkat dibandingkan dengan kontrol, sedangkan kadar asam sialat di jaringan meningkat sejalan dengan makin banyaknya induksi DMBA dan makin lamanya waktu karsinogenesis. Hasil pengukuran kadar asam sialat plasma lebih tinggi dibandingkan pada jaringan payudara. Hasil yang sama juga didapat oleh

Sinaga, Prijanti dan Novrida yang menginduksi kanker hati memperoleh hasil kadar asam sialat plasma kontrol lebih rendah dari pada perlakuan.^{17,37,38}



Gambar 4.9. Diagram batang perbandingan kadar asam sialat plasma darah dan jaringan kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA. Nilai kadar dinormalisasi terhadap kontrol (kontrol = 1).

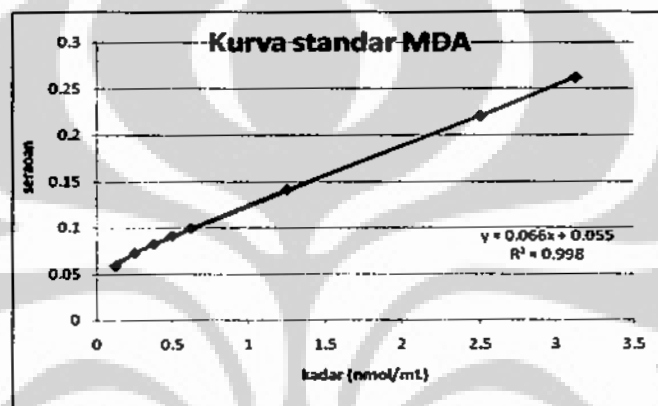
Gambar 4.9. menunjukkan perbandingan antara kadar asam sialat plasma dan jaringan yang diinduksi dengan DMBA. Analisis statistik regresi linier menghasilkan hubungan positif sedang antara kadar asam sialat di plasma dengan kadar asam sialat di jaringan. ($R = 0.405$).



Gambar 4.10. Diagram titik hubungan kadar asam sialat plasma darah dan jaringan kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA. Nilai $R = 0.405$, berhubungan positif sedang

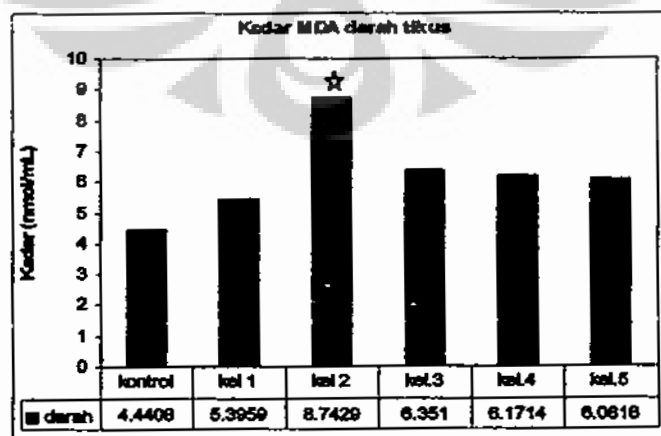
4.4. Pemeriksaan kadar malondialdehid (MDA)

Malondialdehid tidak stabil pada suhu ruang sehingga dilakukan dengan pembuatan kurva standar MDA menggunakan tetraetoksipropan (TEP), yaitu senyawa yang bila terhidrolisis oleh air akan menghasilkan MDA dan alkohol. Kurva standar TEP dibuat dengan mereaksikan berbagai macam konsentrasi mulai dari kadar 0.125 nmol/mL sampai 1.25 nmol/mL. Salah satu kurva standar MDA dapat dilihat pada gambar 4.10.



Gambar 4.11. Kurva standar pengukuran MDA menggunakan tetraetoksipropan

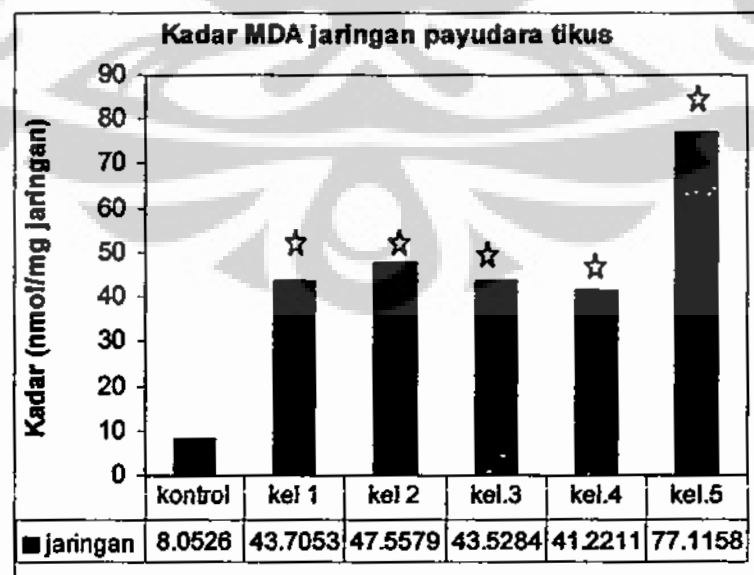
Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan metode Wills yang telah dimodifikasi sesuai dengan jumlah sampel dan kondisi bahan dan alat penelitian di laboratorium biokimia dan biologi molekuler melalui optimasi pengukuran kadar. Hasil pengukuran serapan yang didapat disajikan pada lampiran 8 dan lampiran 9.



Gambar 4.12. Kadar MDA darah tikus yang diinduksi DMBA
Tanda * menunjukkan hasil yang bermakna secara statistik dibandingkan dengan kelompok kontrol (Uji post hoc, $p < 0.05$)

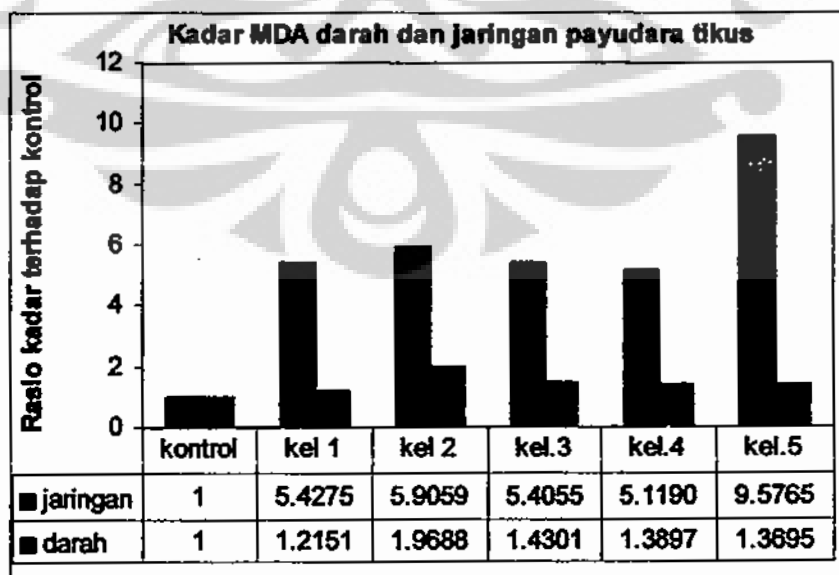
Pada gambar 4.12 terlihat kadar MDA plasma semua tikus kelompok perlakuan yang diinduksi DMBA meningkat, bahkan pada kelompok 2 peningkatannya mencapai dua kali kadar tikus kontrol dan bermakna secara statistik ($p = 0.013$). Kadar MDA plasma tikus kelompok 3, 4 dan 5 menurun dibandingkan kelompok 1 namun tetap lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini dapat dipahami karena MDA merupakan gambaran dari kerusakan lemak pada membran sel, menunjukkan makin besar dosis DMBA yang diberikan, makin banyak kerusakan membran yang terjadi, sampai pada tahap tertentu dimana kerusakan membran sel tidak lagi dipengaruhi oleh tingkat kerusakan sel karena darah sudah dapat mengantisipasi adanya stres oksidatif yang ditimbulkan.

Hasil yang sama didapat oleh Novrida dan Kurniawati yang menginduksi kanker dengan FAA. Keduanya mendapatkan peningkatan kadar MDA plasma tikus yang diinduksi dengan FAA selama dua minggu induksi.^{38,39} Namun Wanandi mendapatkan kadar MDA pasien kanker paru menurun dibandingkan kontrol (tidak kanker) dan Ayly memberikan alasan bahwa penderita kanker mengalami kerusakan karena stres oksidatif yang sudah parah sehingga tidak terukur pada kadar MDAny.⁴⁰



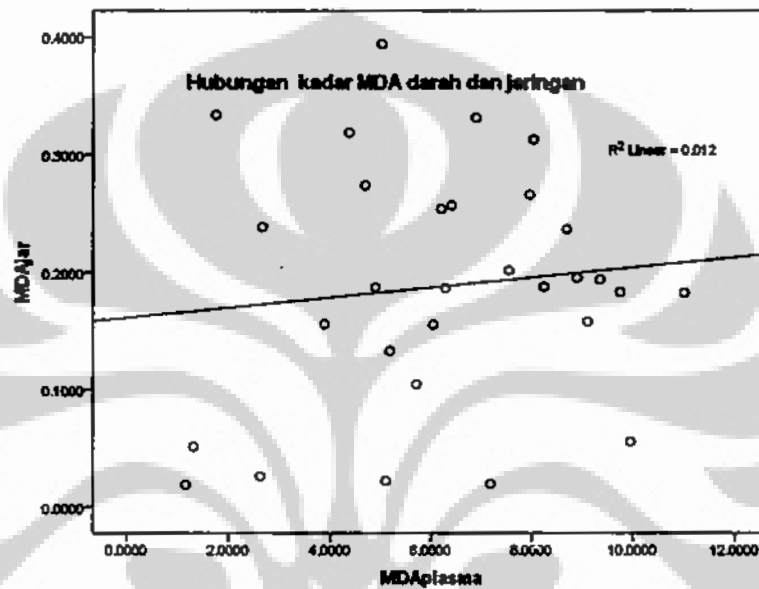
Gambar 4.13. Kadar MDA jaringan tikus yang diinduksi DMBA
Tanda * menunjukkan hasil yang bermakna secara statistik dibandingkan dengan kelompok kontrol (Uji post hoc, $p < 0.05$)

Pada gambar 4.13 terlihat kadar MDA jaringan tikus yang diinduksi DMBA meningkat secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol pada semua kelompok perlakuan. Kadar MDA jaringan tikus kelompok 1 meningkat secara bermakna dibandingkan kelompok kontrol ($p = 0.000$), dari 8.05 nmol/mg pada jaringan kontrol menjadi 43.70 nmol/mg jaringan pada kelompok 1. Kadar MDA tikus yang diinduksi DMBA empat kali (kelompok 2) menurun sedikit dari kelompok 1 namun masih meningkat secara bermakna dibandingkan kontrol ($p = 0.000$). Pada kelompok 3, kadarnya meningkat kembali menjadi menjadi 47,5579 nmol/mg jaringan ($p = 0.001$), sedangkan yang diinduksi delapan kali menurun dibandingkan kelompok 2, meskipun tetap meningkat secara bermakna dibandingkan tikus kontrol ($p = 0.001$). Pada kelompok 5 yang diinduksi DMBA sepuluh kali, kadar MDA meningkat kembali menjadi 77,1158 nmol/mg jaringan. Hal ini dapat dipahami bahwa induksi dengan DMBA dapat menyebabkan kerusakan peroksidasi lipid karena adanya stres oksidatif. Secara statistik, kenaikan kadar MDA di jaringan maupun darah meningkat secara bermakna pada semua kelompok perlakuan. Hasil yang sama diperoleh dari penelitian Kurniawati, Handayani dan Novrida yang menginduksi kanker dengan FAA pada jaringan hati dan mendapatkan kadar MDA yang meningkat dibandingkan dengan kontrol.^{19,38,39}



Gambar 4.14. Diagram batang perbandingan kadar MDA plasma darah dan jaringan kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA. Nilai kadar dinormalisasi terhadap kontrol (kontrol = 1).

Pada gambar 4.14. terlihat bahwa kadar MDA jaringan jauh lebih besar dibanding dalam darah karena kadar dalam darah merupakan efek yang sistemik sehingga sudah ada sistem yang menetralsirnya. Hasil analisis statistik regresi linier diperoleh nilai $R = 0.146$ (Gambar 4.15) yang berarti ada hubungan yang lemah antara kadar MDA pada jaringan dan plasma yang diinduksi dengan DMBA.

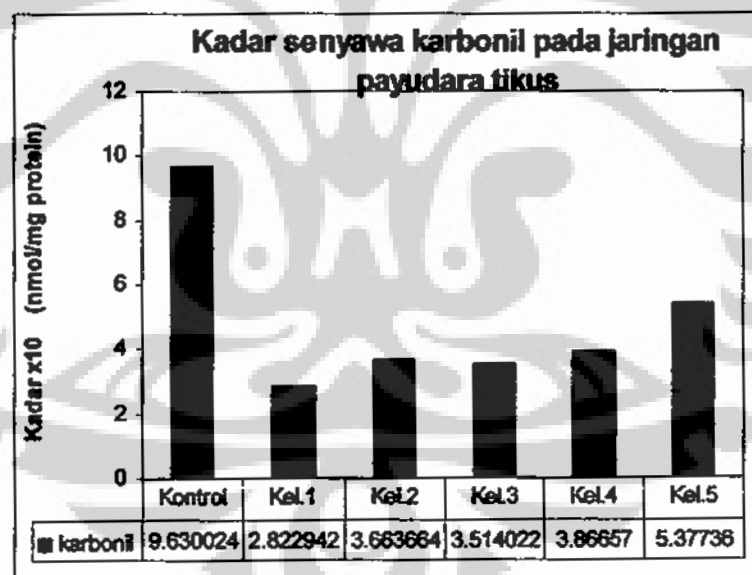


Gambar 4.15. Diagram titik hubungan kadar MDA plasma darah dan Jaringan kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA. Nilai $R = 0.146$, berhubungan positif lemah

4.5 Pemeriksaan kadar senyawa karbonil

Metode yang digunakan untuk mengukur kadar senyawa karbonil adalah metode Levine et.al. yang sudah dimodifikasi sesuai dengan jumlah sampel dan kondisi laboratorium.³¹ Kadar senyawa karbonil kelompok kontrol sebesar $9,63 \times 10^{-5}$ nmol/mg protein, sedangkan kelompok perlakuan memiliki kadar senyawa karbonil antara $2,82 \times 10^{-5}$ sampai $5,38 \times 10^{-5}$ nmol/mg protein (gambar 4.16). Kadar senyawa karbonil pada jaringan payudara semua kelompok perlakuan menurun, meskipun penurunannya tidak bermakna secara statistik. Kelompok perlakuan yang diinduksi dua kali dengan DMBA menurun dari $9,63 \times 10^{-5}$ nmol/mg protein menjadi $2,83 \times 10^{-5}$ nmol/mg protein, namun penurunan ini tidak

bermakna secara statistik ($p = 0.096$). Kelompok perlakuan 2 yang diinduksi DMBA empat kali meningkat dibandingkan dengan kelompok 1, namun nilainya tetap jauh lebih rendah dibandingkan kontrol. Meskipun penurunannya juga tidak bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p = 0.306$), maupun terhadap kelompok 1 (0.501). Peningkatan kembali kadar karbonil pada kelompok empat maupun penurunan pada kelompok 5 tidak mengubah kebermaknaanya secara statistik, dimana nilai p kelompok 4 dibandingkan kontrol adalah 0.387 dan kontrol dibandingkan dengan kelompok 5 = 0.731. Hal ini menunjukkan bahwa pada penelitian ini kerusakan oksidatif jaringan payudara tidak atau belum menyebabkan kerusakan protein, atau kerusakan protein pada payudara tidak/belum terlihat namun hanya menyebabkan kerusakan lipid karena jaringan payudara sebagian besar terdiri dari lipid. Data mentah hasil pengukuran kadar senyawa karbonil disajikan pada lampiran 10.

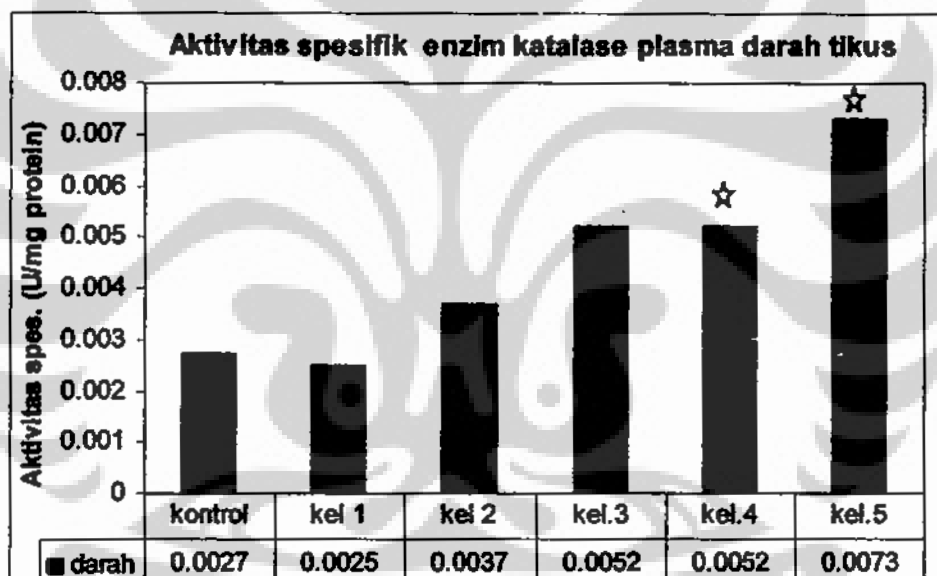


Gambar 4.16. Kadar senyawa karbonil jaringan tikus yang diinduksi DMBA (Uji Anova, $p = 0.338$)

Hasil sebaliknya didapat oleh Novrida dan Handayani yang mendapatkan peningkatan kadar senyawa karbonil pada induksi jaringan payudara tikus yang diinduksi dengan FAA. Ayly juga memperoleh hasil yang menunjukkan bahwa pada pasien kanker paru kadar senyawa karbonilnya meningkat dibandingkan pasien yang tidak kanker karena pada kanker kerusakannya sudah lanjut sehingga kerusakan yang banyak terjadi adalah kerusakan protein.^{9,38}

4.6. Aktivitas spesifik enzim katalase

Aktivitas spesifik katalase darah tikus yang mendapatkan dua kali, empat kali dan enam kali induksi DMBA (kelompok 1, 2 dan 3) meningkat dibanding tikus kontrol namun peningkatannya belum bermakna dibandingkan tikus kontrol ($p > 0,05$). Aktivitas katalase juga meningkat pada kelompok 4 dan 5 yang diinduksi 8x dan 10 x dengan DMBA dan kenaikannya bermakna secara statistik ($p = 0,038$ pada kelompok 4 dan $p = 0,01$ pada kelompok 5). Data kasar pengukuran aktivitas enzim katalase terdapat pada lampiran 12, sedangkan diagram batang aktivitas katalase sampel darah dan jaringan dapat dilihat pada gambar 4.17. dan gambar 4.18.

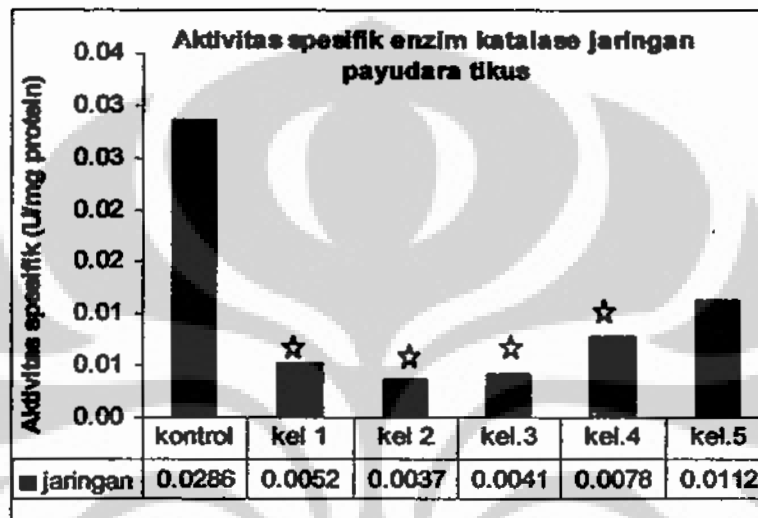


Gambar 4.17. Aktivitas spesifik enzim katalase darah tikus kontrol dan perlakuan pada karsinogenesis kimia yang diinduksi (DMBA 20mg/kgBB)

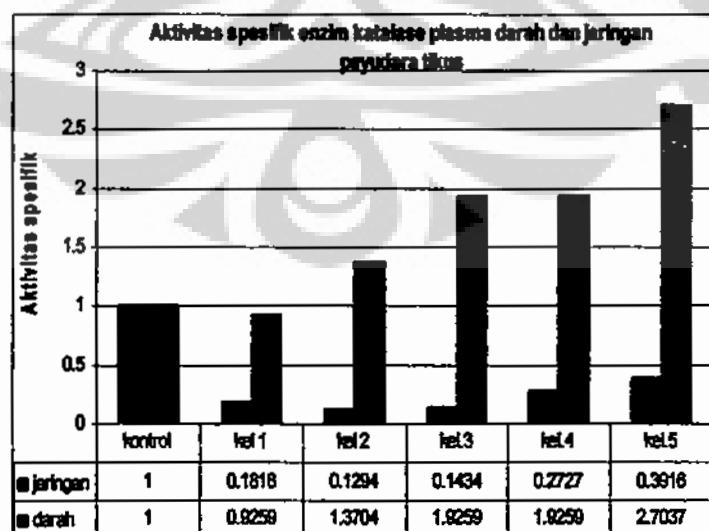
Tanda * menunjukkan hasil yang bermakna secara statistik dibandingkan dengan kelompok kontrol (Uji post hoc, $p < 0,05$)

Aktivitas spesifik enzim katalase pada jaringan payudara tikus yang diinduksi DMBA pada semua kelompok perlakuan menurun dibandingkan dengan kelompok kontrol dan penurunannya bermakna secara statistik ($p < 0,05$, gambar 4.18). Aktivitas spesifik enzim katalase pada kelompok kontrol sebesar 0.0286 Unit/mg protein, sedangkan kelompok 1, yang diinduksi DMBA 2 kali sebesar 0.0052 Unit /mg protein. Penurunan ini bermakna secara statistik ($p = 0,05$). Kelompok 2 yang diinduksi 4 kali dengan DMBA

menurun sedikit menjadi 0,0037 u/mg protein dan naik kembali pada kelompok 3, 4 dan 5. Penurunan aktivitas spesifik katalase kelompok 2 terhadap kelompok kontrol bermakna secara statistik ($p = 0.000$), demikian juga dengan kelompok 3 ($p = 0.001$) dan kelompok 4 ($p = 0.017$), sedangkan penurunannya pada kelompok 5 tidak bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p = 0.112$).



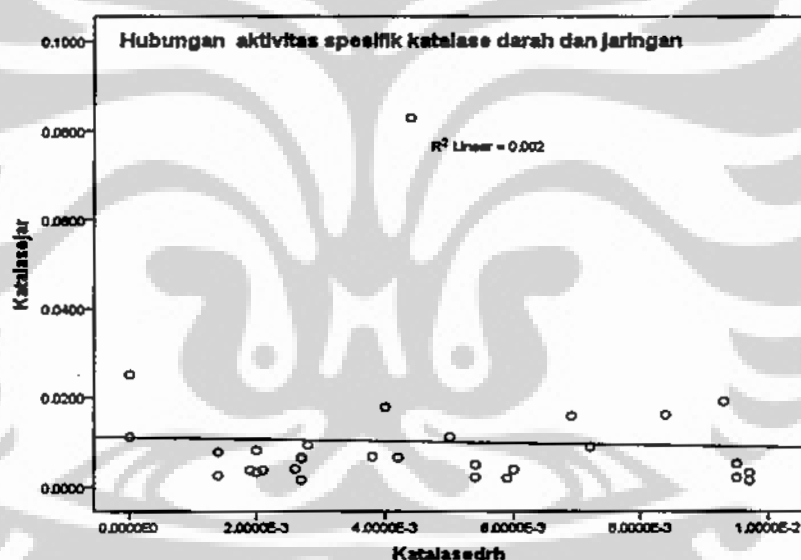
Gambar 4.18. Aktivitas spesifik enzim katalase jaringan tikus kontrol dan perlakuan pada karsinogenesis kimia yang diinduksi DMBA. Tanda * menunjukkan hasil yang bermakna secara statistik dibandingkan dengan kelompok kontrol (Uji post hoc, $p < 0.05$).



Gambar 4.19. Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik enzim katalase plasma darah dan jaringan kelompok kontrol dan perlakuan pada karsinogenesis kimia yang diinduksi DMBA.

Nilai kadar dinormalisasi terhadap kontrol (kontrol = 1).

Dari gambar 4.19. dapat dilihat bahwa aktivitas enzim katalase dalam darah mula-mula mengalami penurunan (kelompok 1), kemudian naik sesuai dengan kenaikan jumlah induksi. Hal ini menunjukkan bahwa ada peningkatan radikal bebas dan diatasi dengan antioksidan katalase akibat stres oksidatif yang ditimbulkan oleh induksi dengan DMBA. Pada sampel jaringan terlihat bahwa aktivitas spesifik enzim katalase menurun pada semua kelompok perlakuan, meskipun pada kelompok 4 dan 5 aktivitasnya meningkat dibandingkan kelompok perlakuan lain. Hal ini menunjukkan bahwa ada ada kemungkinan peningkatan kadar peroksida pada stres oksidatif di jaringan payudara diatasi oleh antioksidan lain misalnya enzim glutathion peroksidase (GPx) atau enzim thioredoxin peroksidase (TPx) yang juga bekerja menetralkan radikal peroksida.



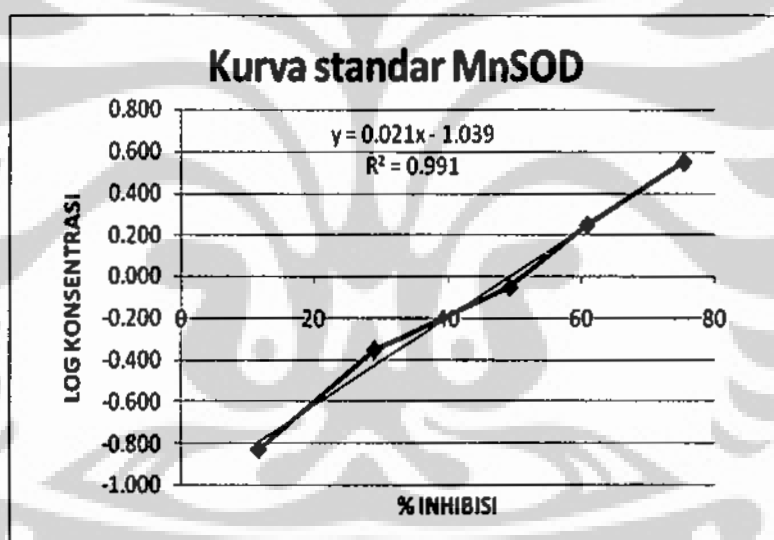
Gambar 4.20. Diagram titik hubungan aktivitas spesifik enzim katalase plasma darah dan jaringan kelompok kontrol dan perlakuan pada karsinogenesis kimia yang diinduksi DMBA.

Nilai R = 0.043, berhubungan negatif lemah

Penelitian Ho, et.al. pada kanker paru manusia yang baru saja meninggal diperoleh hasil yang sama yaitu terjadi penurunan aktivitas katalase pada jaringan kanker dibanding jaringan normal, sedangkan enzim GPx tetap sama pada kanker maupun jaringan normal.⁴¹ Sedangkan Shimozawa, et.al. meneliti pasien yang memiliki kelainan genetik dan ditemukan adanya katalase yang berbeda dengan pasien normal.⁴²

4.7. Aktivitas spesifik enzim MnSOD

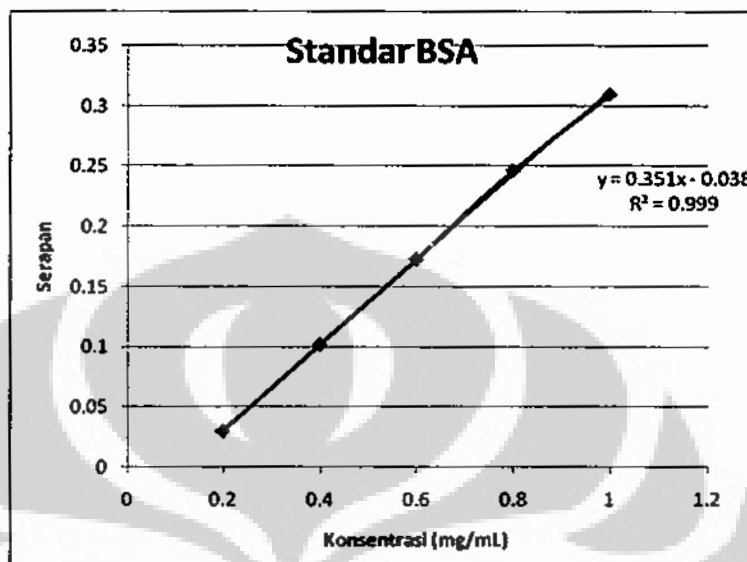
Pengukuran aktivitas enzim MnSOD dilakukan dengan menggunakan Kit RanSOD[®] terhadap homogenat jaringan payudara dan darah yang diekstraksi dengan PMSF (*Phenyl Methyl Sulfon Fluoride*). Penambahan PMSF dilakukan untuk mengurangi kerja enzim protease yang dapat merusak protein-protein pada sampel, termasuk enzim MnSOD. Setiap kali pengukuran, dibuat juga kurva standar menggunakan berbagai konsentrasi mulai dari 0.1475 U/mL sampai 3.54 U/mL sesuai dengan kit RanSOD yang digunakan. Persamaan yang didapat digunakan untuk menghitung kadar MnSOD sampel. Salah satu kurva standar SOD dapat dilihat pada gambar 4.21 dan hasil serapan serta % inhibisi sampel terdapat dalam lampiran 13.



Gambar 4.21. Kurva semilog standar aktivitas enzim SOD
Didapat persamaan $y = 0.021x - 1.039$ dengan nilai $R^2 = 0.991$

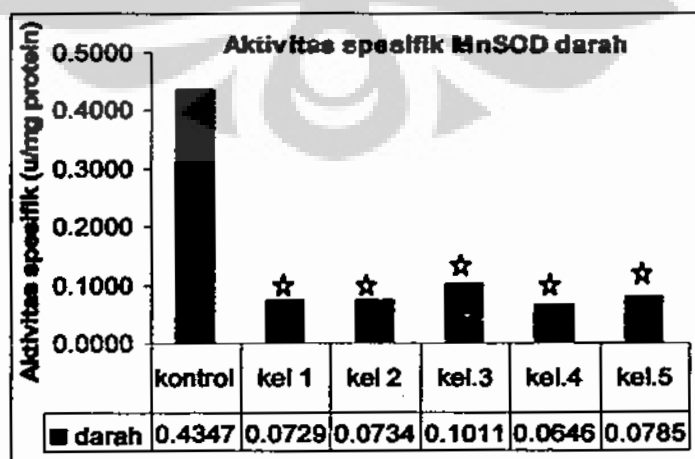
Aktivitas spesifik MnSOD dihitung dengan menggunakan satuan unit/mg protein sehingga diukur pula kadar protein darah dan jaringan yang digunakan. Kurva standar protein dibuat setiap kali melakukan pengukuran kadar protein dengan menggunakan larutan standar protein BSA (*Bovine Serum Albumin*) mulai dari konsentrasi 0.1 mg/mL sampai 1 mg/mL atau disesuaikan dengan perkiraan konsentrasi sampel. Serapan standar dan sampel dibaca menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm. Persamaan yang didapat

digunakan untuk menghitung kadar protein sampel. Salah satu kurva standar enzim SOD dan protein BSA dapat dilihat pada gambar 4.22.



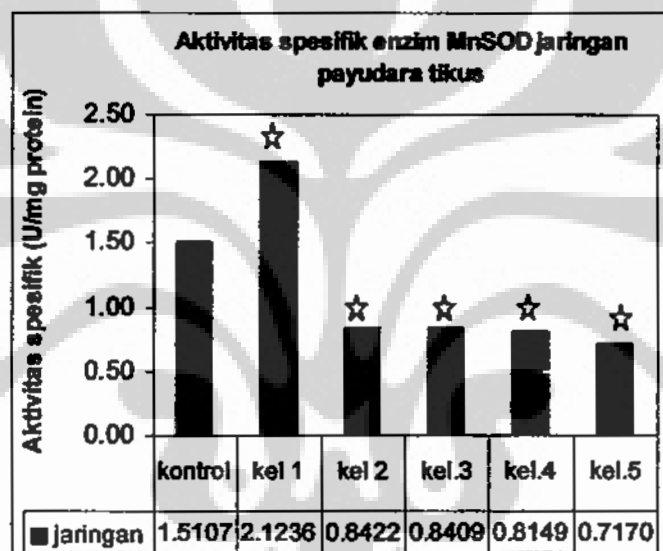
Gambar 4.22. Kurva standar protein
Didapat persamaan $y = 0.352x + 0.038$ dengan $R^2 = 0.999$.

Pada pemeriksaan aktivitas MnSOD darah didapatkan hasil bahwa pada darah tikus kontrol kadarnya 0.4347 U/mg protein, sedangkan semua kelompok perlakuan kadarnya turun, yaitu antara 0,00646 U/mg protein sampai 0,0785 U/mg protein (gambar 4.23). Penurunan aktivitas spesifik enzim MnSOD semua kelompok perlakuan menurun jauh di bawah kelompok kontrol dan penurunannya bermakna secara statistik dengan nilai p yang sama, yaitu 0.000.



Gambar 4.23. Aktivitas spesifik enzim MnSOD darah tikus kontrol dan perlakuan yang diinduksi dengan DMBA
Tanda * menunjukkan hasil yang bermakna secara statistik dibandingkan dengan kelompok kontrol (Uji post hoc, $p < 0.05$)

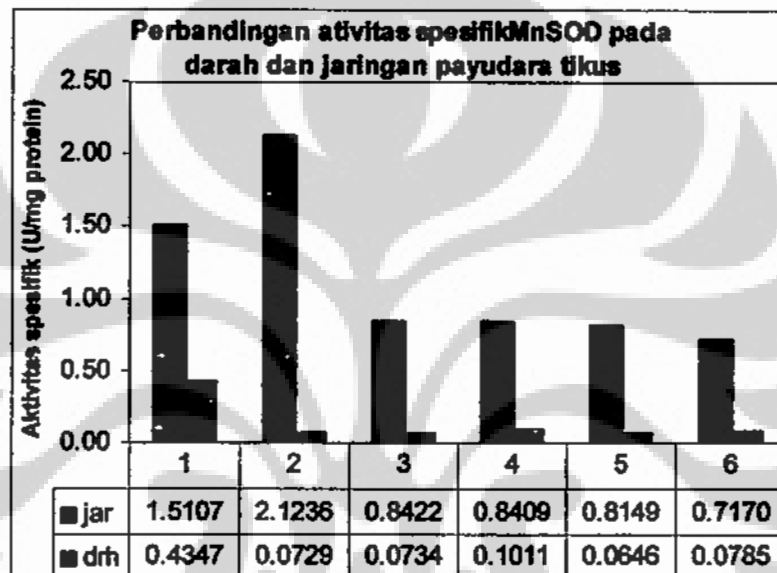
Aktivitas spesifik MnSOD yang diinduksi DMBA pada jaringan payudara (gambar 4.24) mula-mula meningkat pada kelompok 1 dibandingkan dengan kelompok kontrol dan peningkatannya bermakna secara statistik ($p = 0.039$). Pada kelompok 2 aktivitas enzim MnSOD menurun dibandingkan dengan kelompok 1 maupun terhadap kontrol. Penurunan ini bermakna secara statistik dibandingkan dengan kontrol ($p = 0.025$) maupun terhadap kelompok 1 ($p = 0.000$). Demikian seterusnya pada kelompok 3, 4 dan 5 aktivitas spesifiknya makin turun dan penurunannya bermakna dibandingkan kelompok kontrol, dimana nilai p kelompok 3 = 0.025, dan kelompok 4 = 0.020 dan kelompok 5 $p = 0.009$.



Gambar 4.24. Aktivitas spesifik enzim MnSOD jaringan tikus yang diinduksi DMBA
Tanda * menunjukkan hasil yang bermakna secara statistik dibandingkan dengan kelompok kontrol (Uji post hoc, $p < 0.05$)

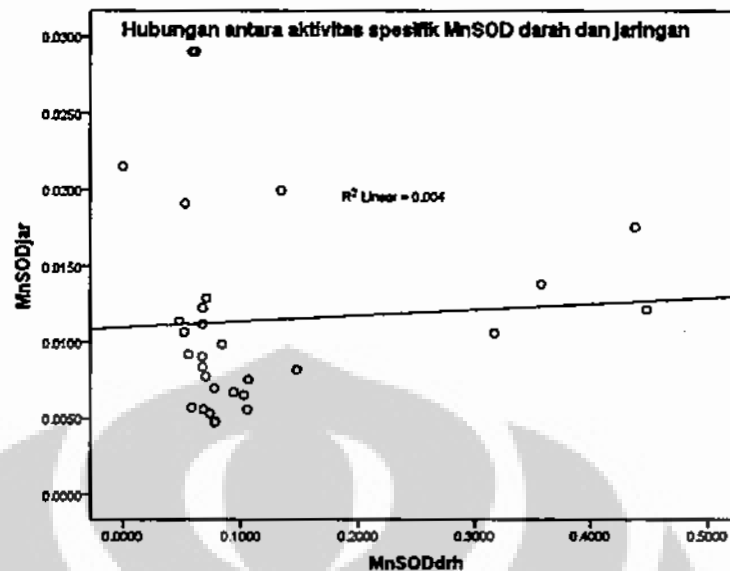
Gambar 4.25. menunjukkan bahwa pada jaringan payudara, aktivitas spesifik enzim MnSOD mula-mula meningkat kemudian turun, sedangkan pada darah aktivitas semua kelompok perlakuan menurun dibandingkan dengan kontrol. Aktifitas spesifik MnSOD di jaringan kelompok 1 meningkat lebih dari 40% dibandingkan kelompok kontrol, sedangkan kelompok tikus yang diinduksi dengan DMBA lebih dari 2 kali yaitu kelompok 2, 3, 4 dan 5 memperlihatkan penurunan aktivitas spesifik MnSOD pada jaringan payudara dibandingkan kelompok kontrol. Hal ini disebabkan karena pada awal induksi DMBA (hanya 2 kali), tikus membutuhkan aktivitas enzim MnSOD yang besar untuk menangkal

radikal bebas yang timbul akibat induksi DMBA tersebut. Namun karena pada awal induksi radikal bebas yang terbentuk belum terlalu banyak, aktivitas spesifik MnSOD masih terlihat meningkat. Sebaliknya pada kelompok tikus yang diinduksi DMBA lebih dari 2 kali, radikal bebas yang terbentuk sudah sangat banyak sehingga aktivitas enzim MnSOD yang pada awalnya ditingkatkan menjadi menurun, kondisi ini terus stabil sampai kelompok terakhir (10 kali induksi).



Gambar 4.25. Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik enzim MnSOD darah dan jaringan kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA. Nilai kadar dinormalisasi terhadap kontrol (kontrol = 1).

Aktivitas spesifik MnSOD pada darah tampak menurun mulai dari kelompok 1 (induksi 2 kali) sampai dengan kelompok 5 (induksi 10 kali) dibandingkan dengan kontrol, sedangkan pada jaringan payudara terjadi sebaliknya, aktivitas spesifik MnSOD meningkat meskipun lalu menurun. Hal ini disebabkan karena aktivitas enzim MnSOD pada darah bekerja secara sistemik. Darah merupakan jaringan yang bersirkulasi, sehingga dia berperan juga dalam menangkal radikal bebas yang terbentuk di berbagai jaringan. Sedangkan pada jaringan, dengan adanya induksi DMBA terjadi peningkatan radikal bebas yang diatasi dengan peningkatan aktivitas MnSOD.

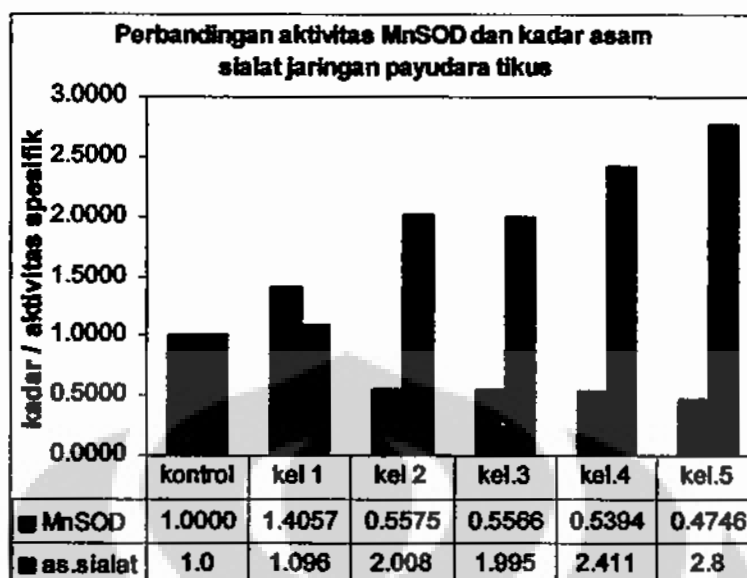


Gambar 4.26. Diagram titik hubungan aktivitas spesifik enzim MnSOD darah dan jaringan kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA. Nilai R = 0.066, berhubungan positif lemah

Gambar 4.26 memperlihatkan adanya hubungan positif lemah antara aktivitas spesifik MnSOD di darah dan di jaringan. Lebih lanjut, MnSOD telah diketahui sebagai *tumor suppressor* pada berbagai jenis sel kanker. Selain itu telah diteliti bahwa ekspresi berlebihan dari enzim ini dapat menghambat pertumbuhan sel kanker. Kadar protein dan aktivitas MnSOD menurun pada sel-sel kanker prostat dibandingkan dengan sel-sel nonmalignant. Sedangkan pada penelitian lain MnSOD meningkat pada tumor tyroid, kanker kolorektal dan kanker ginjal.^{43,44,45}

4.8. Hubungan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan asam sialat

Hubungan aktifitas spesifik MnSOD dengan asam sialat sebagai penanda tumor, baik di darah maupun di jaringan disajikan dalam bentuk diagram batang dan diagram titik pada gambar 4.27 dan gambar 4.28.



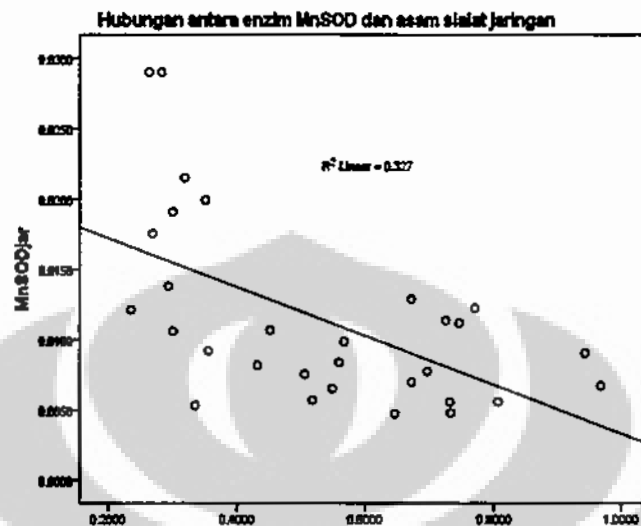
Gambar 4.27. Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan kadar asam sialat jaringan payudara tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.

Nilai kadar dinormalisasi terhadap kontrol (kontrol = 1).

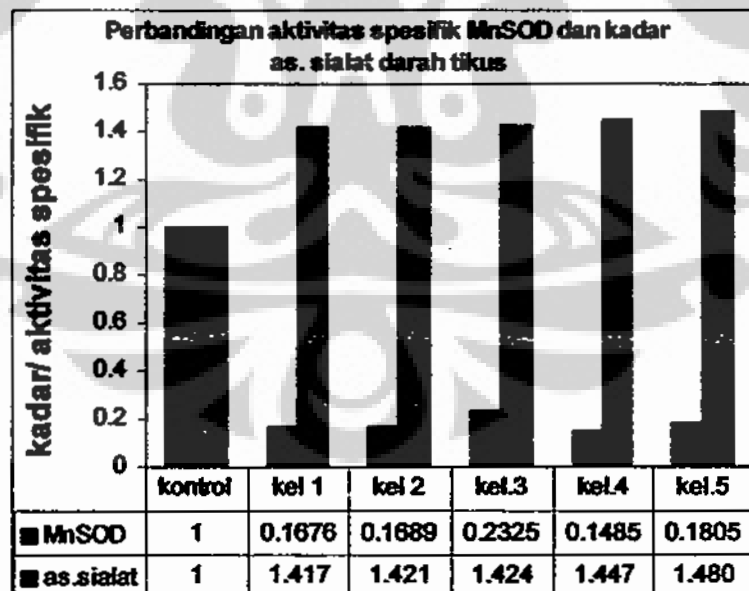
Gambar 4.27. menunjukkan bahwa pada jaringan payudara, aktivitas spesifik enzim MnSOD mula-mula meningkat kemudian turun, sedangkan kadar asam sialat semua kelompok perlakuan meningkat dibandingkan dengan kontrol. Aktifitas spesifik MnSOD di jaringan kelompok 1 meningkat lebih dari 40% dibandingkan kelompok kontrol, sedangkan kelompok tikus yang diinduksi dengan DMBA lebih dari 2 kali yaitu kelompok 2, 3, 4 dan 5 memperlihatkan penurunan dibandingkan kelompok kontrol. Hal ini disebabkan karena pada awal induksi DMBA (kelompok 1) dibutuhkan antioksidan yang lebih banyak untuk menangani radikal bebas yang disebabkan oleh induksi DMBA, sedangkan MnSOD merupakan antioksidan endogen utama yang ada di dalam sel. Aktifitas yang menurun pada kelompok yang diinduksi lebih dari 2 kali mungkin karena adanya sistem antioksidan endogen lain yang mengatasinya.

Hubungan antara aktifitas spesifik enzim MnSOD dengan kadar asam sialat di jaringan ditunjukkan pada gambar 4.28, yang memperlihatkan adanya hubungan negatif sedang, dengan nilai $R = 0.572$. Hal ini menunjukkan bahwa dengan adanya induksi DMBA menyebabkan kerusakan membran sel sehingga terjadi peningkatan kadar asam sialat di jaringan payudara, namun karena kerusakannya belum terlalu parah (masih tahap awal, belum bermakna secara statistik), maka aktifitas enzim MnSOD juga belum ditingkatkan di jaringan

payudara, bahkan aktivitas spesifiknya menurun dibandingkan dengan kelompok kontrol.



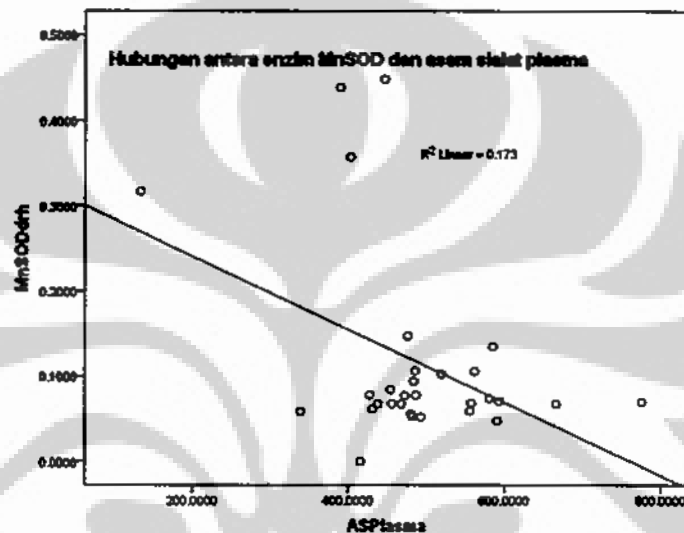
Gambar 4.28. Diagram titik hubungan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan kadar asam sialat jaringan payudara tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA. Nilai R = 0.572, berhubungan negatif sedang



Gambar 4.29. Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan kadar asam sialat darah kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA. Nilai kadar dan aktifitas spesifik dinormalisasi terhadap kontrol (kontrol = 1). Nilai R = 0.396, berhubungan negatif sedang

Hubungan antara aktifitas spesifik enzim MnSOD di darah dengan kadar asam sialat plasma ditunjukkan pada gambar 4.29, yang memperlihatkan adanya

hubungan negatif sedang, dengan nilai $R = 0.396$. Hal ini menunjukkan bahwa dengan adanya induksi DMBA menyebabkan kerusakan membran sel sehingga terjadi peningkatan kadar asam sialat di jaringan payudara, namun karena kerusakannya belum terlalu parah (masih tahap awal, belum bermakna secara statistik), maka aktifitas enzim MnSOD juga belum ditingkatkan di jaringan payudara, bahkan aktivitas spesifiknya menurun dibandingkan dengan kelompok kontrol.

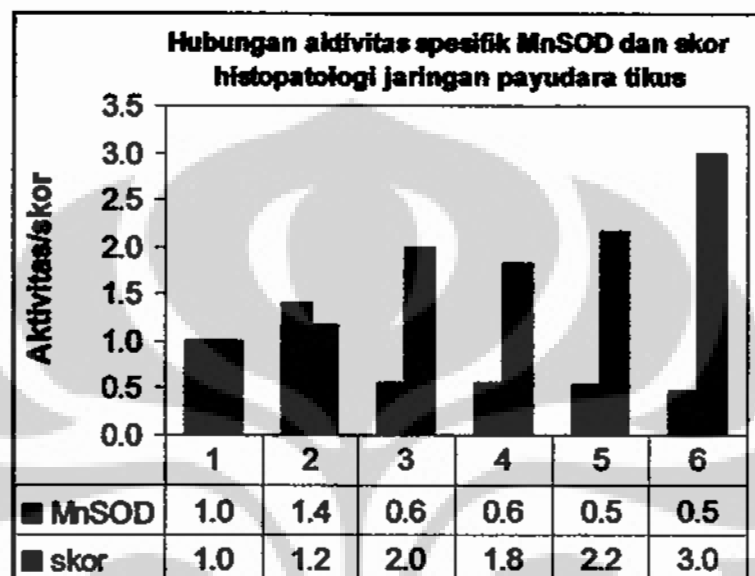


Gambar 4.30. Diagram titik hubungan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan kadar asam sialat darah kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA. Nilai kadar dan aktifitas spesifik dinormalisasi terhadap kontrol (kontrol = 1). Nilai $R = 0.396$, berhubungan negatif sedang

4.9. Hubungan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan skor histopatologi

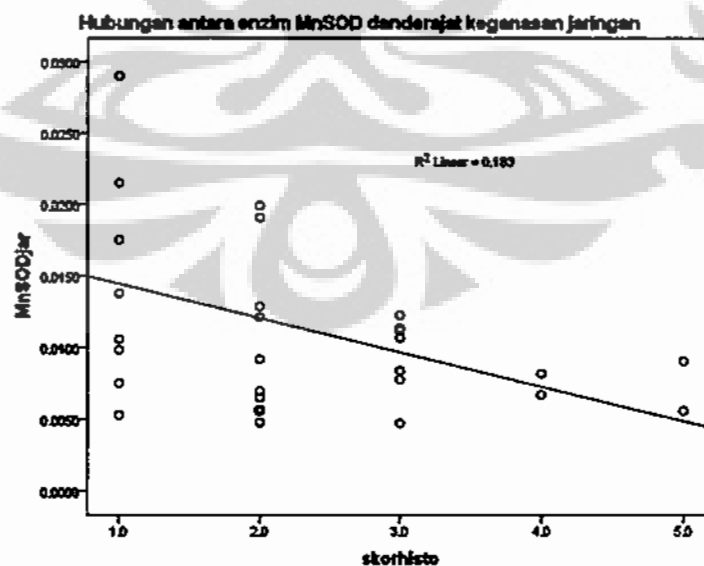
Hubungan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan skor histopatologi disajikan pada gambar 4.30 dan gambar 4.31 dalam bentuk diagram batang dan diagram titik. Dari diagram batang terlihat bahwa aktivitas spesifik MnSOD perlakuan mula-mula naik kemudian turun di kelompok-kelompok perlakuan berikutnya, sedangkan skor histopatologi makin meningkat sejalan dengan makin banyaknya induksi, kecuali kelompok 3 yang sedikit menurun dibandingkan kelompok 2, meskipun tetap lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol

dan kelompok 1. Dari analisis statistik regresi linier antara aktifitas MnSOD dengan skor histopatologi didapat $R = 0,428$, berarti ada hubungan negatif sedang. Di satu sisi penurunan aktivitas MnSOD diikuti dengan peningkatan skor histopatologi tumor.



Gambar 4.31. Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan skor histopatologi pada jaringan payudara tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.

Nilai kadar dinormalisasi terhadap kontrol (kontrol = 1).

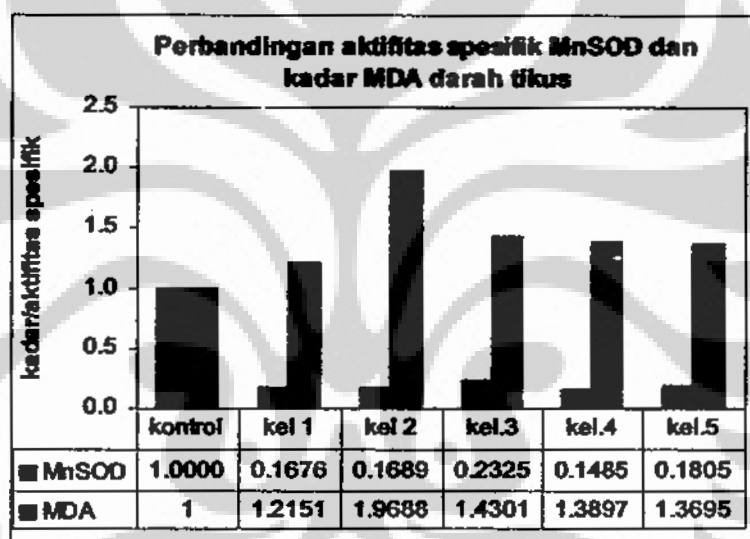


Gambar 4.32. Diagram titik hubungan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan skor histopatologi pada jaringan payudara tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.

Nilai $R = 0.428$, berhubungan negatif sedang

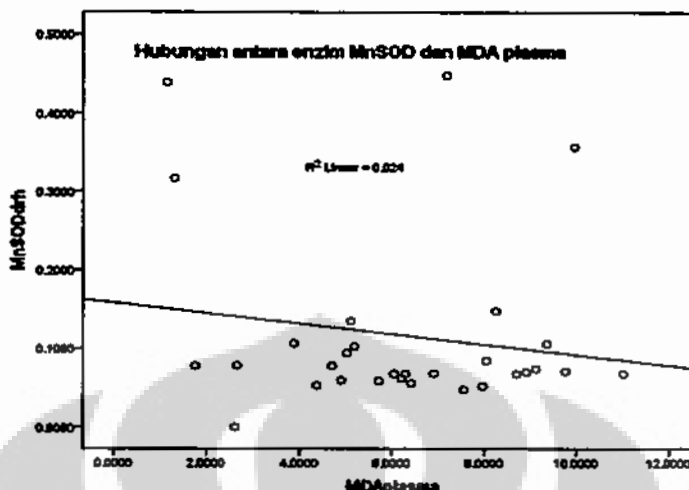
4.10. Hubungan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan MDA

Aktivitas spesifik MnSOD pada darah tikus yang diinduksi dengan DMBA menurun pada semua kelompok perlakuan dengan nilai yang relatif sama di semua kelompok, sedangkan kadar MDA justru menurun pada awal induksi, kemudian turun mulai di kelompok tikus yang diinduksi enam kali (gambar 4.32). Hasil uji statistik regresi linier antara aktifitas spesifik MnSOD dengan kadar MDA darah menghasilkan garis lurus menurun dengan nilai $R = 0.482$ yang berarti ada hubungan negatif sedang. Bila kadar MDA meningkat maka aktivitas MnSOD menurun (gambar 4.33).



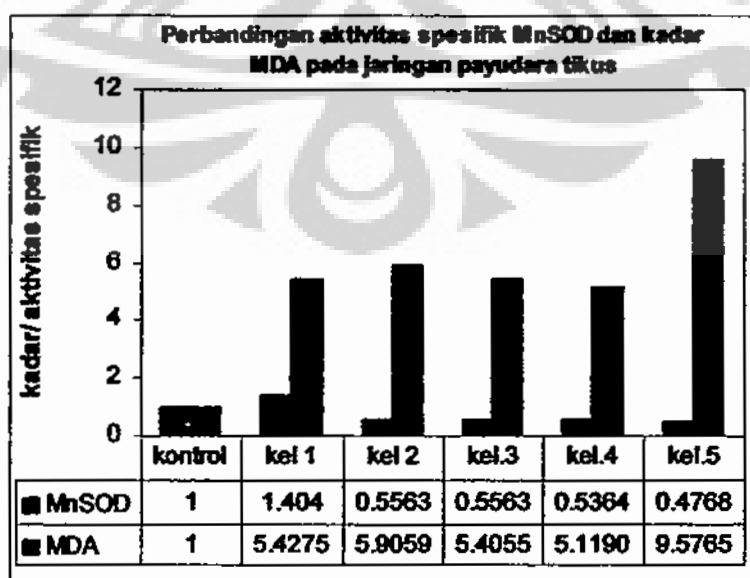
Gambar 4.33. Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan kadar MDA pada darah tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA. Nilai kadar dinormalisasi terhadap kontrol (kontrol = 1).

Dari hasil ini menunjukkan bahwa telah terjadi kerusakan oksidatif PUFA dalam darah akibat induksi karsinogenesis kimia dengan DMBA, namun penanganannya kemungkinan dilakukan oleh enzim lain atau oleh sistem lain selain enzim MnSOD karena aktivitas MnSOD tidak mencukupi untuk mengatasi stres oksidatif yang terjadi. Aktivitas katalase darah meningkat kemungkinan karena ada H_2O_2 lain yang dihasilkan selain oleh MnSOD. Hasil yang didapat oleh Mariana justru kebalikannya, aktivitas spesifik enzim MnSOD tidak berhubungan dengan kadar MDA darah pasien kanker payudara yang mendapatkan kemoradiasi.⁶



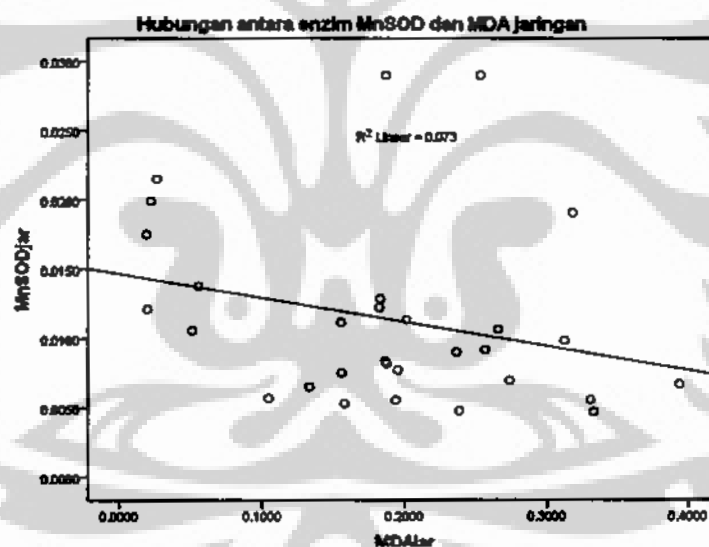
Gambar 4.34. Diagrama titik hubungan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan kadar MDA pada darah tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA. Nilai R = 0,482 berhubungan negatif sedang

Perbandingan antara aktivitas spesifik MnSOD dengan kadar MDA pada jaringan payudara tikus yang diinduksi dengan DMBA menunjukkan tidak adanya perbedaan menggunakan uji annova. ($p = 0.083$). Diagram batang dan diagram titik perbandingan antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan kadar MDA jaringan payudara tikus yang diinduksi DMBA terdapat pada gambar 4.34 dan 4.35.



Gambar 4.35. Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan kadar MDA jaringan payudara tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA. Nilai kadar dinormalisasi terhadap kontrol (kontrol = 1).

Hasil analisis statistik regresi linier antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan kadar MDA jaringan payudara tikus yang diinduksi DMBA menunjukkan bahwa ada hubungan negatif yang kuat antara keduanya, dimana kadar MDA jaringan payudara meningkat sedangkan aktivitas MnSOD menurun. Bila dilihat pada diagram batang gambar 4.34 terlihat bahwa aktivitas enzim MnSOD mula-mula menurun pada kelompok 1 dibandingkan dengan kontrol sebelum akhirnya meningkat pada kelompok perlakuan berikutnya. Hal ini menunjukkan bahwa induksi karsinogenesis payudara tikus yang diinduksi dengan DMBA menyebabkan kerusakan PUFA. Mula-mula diatasi oleh enzim MnSOD dengan meningkatkan aktivitasnya, namun pada kerusakan yang lebih lanjut kemungkinan sudah diatasi oleh sistem antioksidan endogen lainnya. Hal ini sejalan dengan kadar katalase yang juga menurun.

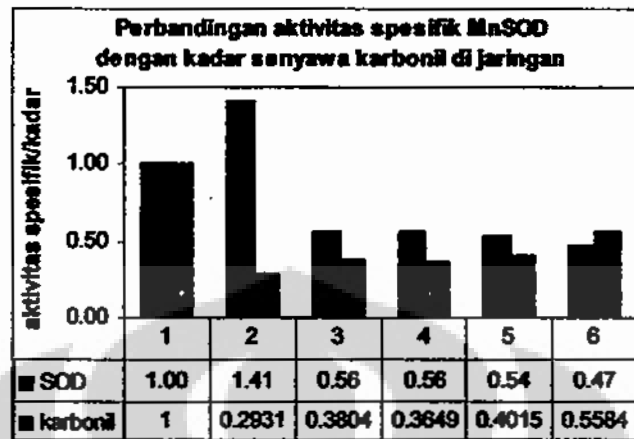


Gambar 4.36. Diagram titik hubungan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan kadar MDA jaringan payudara tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.

Nilai kadar dinormalisasi terhadap kontrol (kontrol = 1).

Nilai R = 0.875, berhubungan negatif kuat

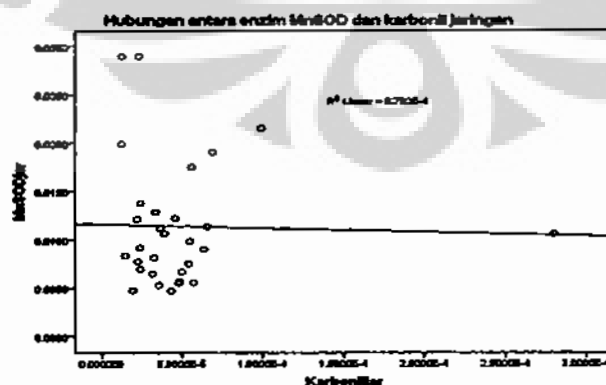
4.11. Hubungan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan senyawa karbonil



Gambar 4.37. Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan kadar senyawa karbonil jaringan payudara tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.

Nilai kadar dinormalisasi terhadap kontrol (kontrol = 1).

Aktivitas spesifik enzim MnSOD berhubungan negatif kuat dengan kadar senyawa karbonil ($p = 0,594$), yang berarti bahwa setiap kali kadar senyawa karbonil meningkat maka aktivitas spesifik enzim MnSOD menurun. Bila dilihat dari diagram batang pada gambar 4.36, pada awal induksi aktivitas enzim MnSOD meningkat, namun pada induksi yang lebih lanjut aktivitasnya menurun, sedangkan senyawa karbonil pada semua kelompok perlakuan kadarnya menurun. Hal ini menunjukkan bahwa makin besar dosis induksi DMBA, makin banyak terjadi kerusakan-kerusakan biomakromolekul dalam sel, baik molekul lemak, karbohidrat maupun protein.

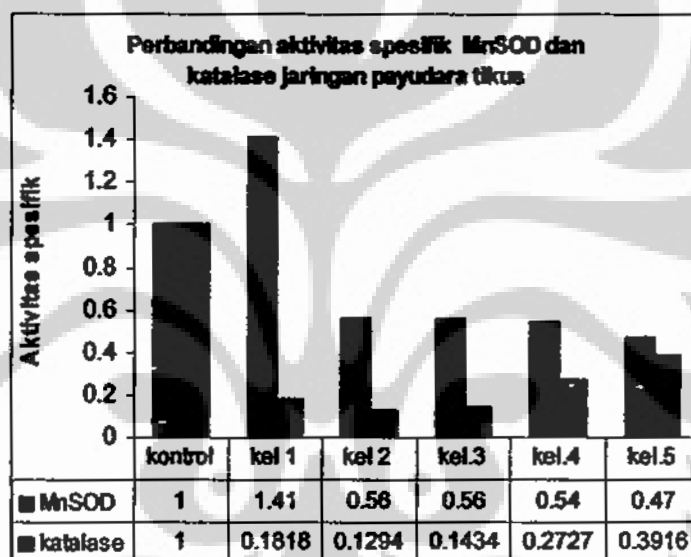


Gambar 4.38. Diagram titik hubungan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan kadar senyawa karbonil jaringan payudara tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.

Nilai $R = 0.594$, berhubungan negatif kuat

4.12. Hubungan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan enzim katalase

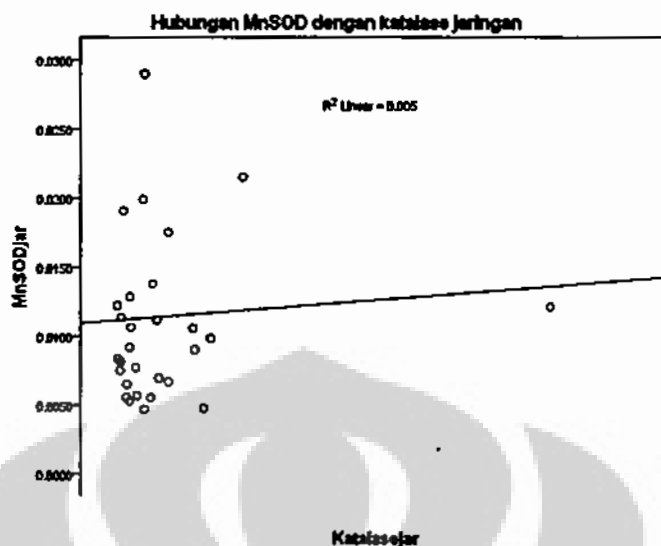
Dari hasil analisis regresi linier antara aktivitas spesifik MnSOD dengan katalase pada jaringan payudara tikus yang diinduksi DMBA diperoleh adanya hubungan positif kuat ($p = 0.758$), dimana aktivitas MnSOD pada awal induksi meningkat kemudian menurun, sedangkan enzim katalase menurun aktivitas spesifiknya pada semua kelompok perlakuan. Gambar diagram batang dan diagram titik perbandingan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan enzim katalase pada jaringan payudara tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA dapat dilihat pada gambar 4.38 dan gambar 4.39 di bawah ini.



Gambar 4.39. Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan enzim katalase pada jaringan payudara tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.

Nilai kadar dinormalisasi terhadap kontrol (kontrol = 1).

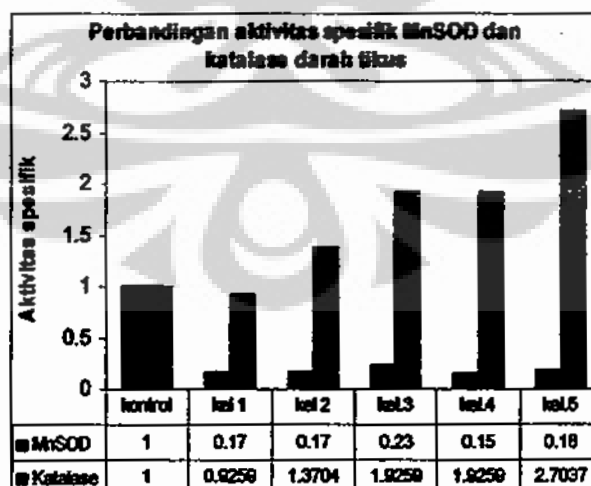
Aktivitas spesifik MnSOD dengan katalase pada darah tikus yang diinduksi DMBA berhubungan negatif sedang ($p = 0,313$) bila dianalisis dengan regresi linier. Bila dilihat dari diagram batang yang terdapat pada gambar 4.40, aktivitas spesifik enzim MnSOD mula-mula menurun sedikit kemudian meningkat dibandingkan kontrol, sedangkan aktivitas enzim katalase menurun pada semua kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol.



Gambar 4.40. Diagram titik hubungan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan enzim katalase pada jaringan payudara tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.

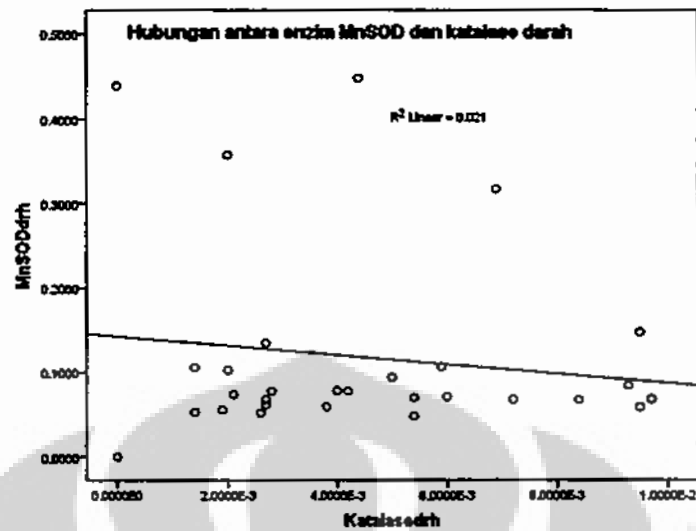
Nilai $R = 0.758$, berhubungan positif kuat

Perbandingan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan katalase pada darah tikus kelompok kontrol dan perlakuan diperlihatkan dengan diagram batang dan diagram titik pada gambar 4.40 dan 4.41. Ada hubungan terbalik/negatif antara keduanya, dimana aktivitas MnSOD menurun sedangkan katalase meningkat.



Gambar 4.41. Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan enzim katalase pada darah tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.

Nilai kadar dinormalisasi terhadap kontrol (kontrol = 1).



Gambar 4.42. Diagram titik hubungan aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan enzim katalase pada darah tikus kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA. Nilai R = 0.313, berhubungan negatif sedang

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

- Aktivitas spesifik enzim MnSOD darah pada karsinogenesis payudara tikus yang diinduksi dengan DMBA semua kelompok perlakuan menurun dibanding kelompok kontrol yang bermakna secara statistik ($p = 0.000$).
- Aktivitas spesifik MnSOD jaringan payudara tikus pada karsinogenesis payudara tikus yang diinduksi DMBA mula-mula meningkat secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p = 0.039$), kemudian menurun dan penurunannya bermakna secara statistik ($p = 0.000$).
- Ada hubungan positif lemah antara aktivitas spesifik enzim MnSOD pada darah dan jaringan payudara tikus yang diinduksi dengan DMBA ($R = 0.066$).
- Kadar asam sialat meningkat secara bermakna pada semua kelompok perlakuan, baik pada plasma darah maupun jaringan payudara ($p < 0.05$).
- Ada hubungan positif sedang antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan kadar asam sialat, baik pada plasma darah ($R = 0.405$) dan jaringan payudara ($R = 0.572$) sebagai penanda tumor pada karsinogenesis payudara tikus yang diinduksi dengan DMBA.
- Terjadi peningkatan skor histopatologi/derajat keganasan tumor pada semua kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol dan peningkatannya bermakna secara statistik ($p = 0.018$).
- Ada hubungan negatif sedang antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan derajat keganasan tumor di jaringan payudara pada karsinogenesis kimia tikus yang diinduksi dengan DMBA ($R = 0.428$).
- Terjadi peningkatan kadar MDA pada semua kelompok perlakuan, baik pada plasma darah ($p = 0.148$) maupun jaringan payudara ($p = 0.000$) sebagai tanda terjadinya stres oksidatif pada karsinogenesis payudara tikus yang diinduksi DMBA.

- Ada hubungan negatif sedang antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan kadar MDA pada darah ($R = 0.482$) dan hubungan negatif kuat di jaringan payudara ($R = 0.875$) pada karsinogenesis payudara tikus yang diinduksi DMBA.
- Terjadi penurunan kadar senyawa karbonil pada semua kelompok perlakuan di jaringan payudara tikus yang diinduksi DMBA, meskipun tidak bermakna secara statistik ($p = 0.338$) dan ada hubungan negatif kuat antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan kadar senyawa karbonil pada karsinogenesis kimia payudara tikus yang diinduksi DMBA ($R = 0.594$).
- Terjadi peningkatan aktivitas spesifik enzim katalase pada hampir semua kelompok perlakuan pada plasma darah ($p = 0.064$) dan terjadi penurunan yang bermakna pada jaringan payudara ($p = 0.004$) sebagai tanda terjadinya stres oksidatif pada karsinogenesis payudara tikus yang diinduksi DMBA.
- Ada hubungan negatif sedang antara aktivitas spesifik enzim MnSOD dengan enzim katalase plasma ($R = 0.313$) dan hubungan positif kuat dengan enzim katalase jaringan pada karsinogenesis kimia payudara tikus yang diinduksi DMBA ($R = 0.758$).

5.1. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian mengenai ekspresi gen dan aktivitas spesifik MnSOD pada karsinogenesis dengan melakukan penghambatan dan atau penambahan MnSOD.
2. Perlu dilakukan penelitian mengenai tanda-tanda kerusakan oksidatif pada biomakromolekul lain misalnya DNA.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hall, E., Giaccia, A. Radiobiology for radiologist. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006:11-300.
2. Cooper, G.M., Hausman, RE. The Cell A Molecular Approach. 3rd ed. Washington:ASM Press; 2003:631-80.
3. Halliwell, B & Gutteridge, J.C. Free Radicals in biology and medicine. 4th.ed. Oxford: Oxford University Press; 2007.
4. Gold LS et al. Compendim of Chemichal carcinogens by Target Organ: Result of Chronic Bioassay in Rats, Mice, Hamsters, Dogs, and Monkeys. Toxicol pathol 2001;29(6):639-52.
5. Okey AB, Harper PA, Grant DM, Hill RP. Chemical and radiation carcinogenesis. In: Tannock IF, Richard PH, Bristow RG, Harrington L (editor). The Basic science of onchology. 4thed. The McGraw-Hill Companies; 2005.
6. Mariana. Aktivitas enzim Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) pada penderita karsinoma serviks sebelum dan setelah minggu kedua pemberian terapi kemoradiasi: Hubungannya dengan Polimorfisme Gen MnSOD [tesis]. Univesitas Indonesia. Jakarta. 2006.
7. Moody JD, Fu PP, Freeman JP, Cerniglia CE. Regio and stereoselective metabolism of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. Appl and Environ Microb.2003;69(7):3924-31
8. Schutter EM, Visser JJ, van Kamp GJ, Mensdorff-Pouily S, van Dijk W, ilgers J, et al., The utility of lipid-associated sialic acid (LASA or LSA) as a serum marker for malignancy. A review of the literature. Tumor Biol.1992;13(3):121-32.
9. Handayani MD. Kemampuan Minyak buah merah (*Pandanus conoideus Lamk.*) dalam mencegah stress oksidatif pada tikus yang diinduksi 2-AAF. [tesis]. Univesitas Indonesia. Jakarta. 2006.
10. Ting AY, Kimler BF, Fabian CJ, Petroff BK. Characterization of preclinical model of simultaneous breast and ovarian cancer progression. Carcinogenesis. 2007;28(1):130-5.
11. Underwood JCE. Nucleolar organizer region in assessment of cell proliferation in clinical practice. Springer Verlag. Berlin.1992;161-75

12. Hakkak R, Holley AW, McLeod SL, Simpson PM, Fuchs GJ, Jo CH, et al. Obesity promotes 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumor development in female zucker rats. *Breast Cancer Res.* 2005;7:627-33.
13. Mathivadhani P, Shanthi P, Sachdanandam P. Hypoxia and its downstream targets in DMBA induced mammary carcinoma: Protective role of *Semecarpus anacardium* nut extract. *Chem-Biol Interact.* 2007;167:31-40.
14. Girolami F, Abbadessa G, Racca S, Spaccamiglio A, Piccione F, Dacasto M, et al. Time-dependent acetyl salicylic acid effects on liver CYP1A and antioxidant enzymes in rat model of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary. *Carcinogenesis.* 2008;181:87-92.
15. Victor Ginsburg. The role of sialic acids in biological recognition (review). Schauer, R., *Arch. Biochem Biophys.* 2004;426(2),132-141.
16. Schauer R. Achievements and challenges on sialic acid research. *Glycoconjugate J.* 2000;17:485-99.
17. Sinaga E. Perubahan kadar asam sialat pada serum dan jaringan hepar tikus yang diinduksi karsinogenesis dengan aflatoksin B1. [tesis]. Universitas Indonesia Jakarta. 1991.
18. Oberly TD. Oxidative damage and cancer. *Am J Pathol.* 2002;160(2):403-8.
19. Okezie IA, Susan L, editor. *Antioxidant Method. In vivo & In vitro Concepts.* Cuppet AOCs Press ; 1997
20. Thomas CE, Kalyanaram B, editor. *Oxygen Radicals and The Disease Process.* Harwood Academic Publishers. 1997. 237-77.
21. Jeong HG, You HJ, Park SJ, Moon AR, Chung YC, Kang SK, et al. Hepaprotective effects of 18 β -glychirretinic acid on carbon tetrachloride induce liver injury: inhibition of cytochrome P450 2E1 expression. *Pharmacol Res.* 2002;46(3):221-7.
22. Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species::role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinogenesis.* 2006;5:14-34.
23. Tjindarbumi D, Mangunkusumo R. Cancer in Indonesia, present and future Japan *J Clin Oncol.* 2002;32:17-21.
24. Brown NS, Bicknell R. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer: Oxidative stress: its effect on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast cancer Res.* 2000;3:323-7

24. Brown NS, Bicknell R. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer: Oxidative stress: its effect on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast cancer Res.*2000;3:323-7
25. James. Catalase-an extraordinary enzyme. [monograph on internet,cited 2003 July]. Diunduh dari :<http://www.catalase.com/cataext.htm>.
26. Hanafiah KA, Rancangan percobaan: teori dan aplikasi. ed. ke-6. PT Rajagrafindo Persada. Jakarta.2000;9.
27. .Waynforth HB. Experimental and surgical technique in the rat. Academic Press.1980
28. Warren L. The tiobarbituric acid assay of sialic acid. *J Biol Chem.*1959;234(9):1971-7.
29. Wills ED. Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissue. *Biochem J.*1986;99:667-76.
30. Winterbourn CC, Buss IH, Chan TP, Plank LD, Clark MA, Windsor JA. Protein carbonyl measurements show evidence of early oxidative stress in critically ill patients. *Crit care med.*2000;28(1):143-9.
31. Mates JM, Aledo JC, Gomes CP, Esteba del Valle A, Segura JM. Interrelationship between oxidative damage and antioxidant enzyme activities: an easy and rapid experimental approach.*Biochem edu.*2000;28(2):93-95.
32. Banerjee S, Ramos CB, Aggarwal BB. Suppression of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: Role Of nuclear factor κ B, cyclooxygenase-2 and matrix metalloprotease. *Cancer Res.*2002;62:4945-54.
33. Kaufmann Y, Luo S, Johnson A, babb K, Klimberg VS. Timing of oral glutamine on DMBA-induced tumorigenesis.*J Surg Res.*2003;111:158-65.
34. Meiyanto E, Tasmiatun S, Susilowati S, Murwanti R, Sugiyanto. Penghambatan karsinogenesis kanker payudara tikus terinduksi DMBA pada fase post inisiasi oleh ekstrak etanolik daun *Gynura procumbens* (Lour),Merr. *Majalah Farmasi Indonesia.*2007;18(4):169-75
35. Kennedy RO. Some observations on sialic acid determination by the Warren thiobarbituric acid method.*Irish J med.*2004;148:92-6.
36. Sobenin IF, Tirtov W, Orekhov AN. Optimization of the assay for sialic acid determination in low density lipoprotein.*J Lipid Res.*1998.39:2293-99.

37. Prijanti AR. Penetapan kedinian α -fetoprotein (AFP) dan asam sialat plasma tikus sebagai petanda tumor pada induksi kanker hati dengan aflatoxin B1. [tesis]. Universitas Indonesia. Jakarta. 1997.
38. Novrida. Hambatan karsinogenesis oleh emulsi tomat pada tikus putih yang diinduksi N-2-fluprenilasetamida (AAF). [tesis]. Universitas Indonesia. Jakarta. 2005.
39. Kurniawati R. Konsentrasi malondialdehid (MDA) tikus putih yang mengalami karsinogenesis sebagai akibat induksi N-2-luorenilasetamida (AAF). [skripsi]. Universitas Indonesia. Jakarta. 2004.
40. Wanandi SI, Syahrudin E, Paramita R, Margareth A. Expression and genotype of Manganese superoxide dismutase (MnSOD) in lung cancer cells of smoker patients. *Makara* 2009;13(2):87-91.
41. Ho JC, Zheng C, Conhair SA, Farvor C, Erzurum SC. Differential expression of MnSOD and Catalase in lung cancer. *Ca Res* .2001;61:8578-85.
42. Shimozawa N, Zhang Z, Imamura A, Suzuki Y, Fujiki Y, Tsukamoto T, et.al. Molecular mechanism of detectable catalase-containing particles, peroxisomes, in fibroblasts from a PEX2-defective patient. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;268(1):31-5.
43. Essau FS, Noem LR, Melchor CM, Equinoa JL, Jose FT, Arzave CV, et.al. MnSOD expression levels in prostatic cancer and benigns prostatic hyperplasia tissue. *Rev Mex Urol*.2009;69(4):159-62.
44. Duan H, Zhang HJ, Yang JQ, Oberley LW, Futscher bw, Domann FE. MnSOD up-regulates maspin tumor suppressor gene expression in human breast and prostate cancer cells. *Antioxid Redox Signal*.2003;5(5):677-88.
45. Oberley TD. Mithochondria, manganese superoxide dismutase and cancer. *Antioxid Redox Signal*.2004; 6(3): 483-7.

Lampiran 1. Surat persetujuan etik



Jl. Percetakan Negara No. 29
Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012
Telp. (021) 4261088

DEPARTEMEN KESEHATAN R.I.
BADAN PENELITIAN DAN
PENGEMBANGAN KESEHATAN



Faks. (021) 4243933
E-mail : sesban@litbang.depkes.go.id
Website : <http://www.litbang.depkes.go.id>

PERSETUJUAN ETIK (ETHICAL APPROVAL)

Nomor: LB.03.02/KE/4529/08

Yang bertanda tangan di bawah ini, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian, dengan ini memutuskan protokol penelitian yang berjudul:

**EKSPRESI GEN MANGANESE-SUPEROXIDE DISMUTASE (MnSOD) SELAMA
KARSINOGENESIS PAYUDARA TIKUS YANG DIINDUKSI
7,12-DIMETHYLBENZ(A)ANTHRACENE (DMBA)
(Revisi protokol tanggal 26 September 2008)**

yang menggunakan/memanfaatkan hewan percobaan sebagai subyek penelitian, dengan Ketua Pelaksana/ Peneliti Utama:

Dr.rer.physiol.dr. Septelia Inawati Wanandi

dapat disetujui pelaksanaannya. Persetujuan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian seperti tertera dalam protokol.

Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan kepada KEPK-BPPK. Jika ada perubahan protokol dan / atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol)

Jakarta, 12 November 2008

Ketua
Komisi Etik Penelitian Kesehatan
Badan Litbang Kesehatan,

Prof. Dr. M. Sudomo



Lampiran 2. Berat badan tikus (dalam gram) sebelum dan selama induksi DMBA.

sebelum	NO	INDUKSI										
		TIKUS	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
187	1	190	184	x	x	x	x	x	x	x	x	x
152	2	152.5	148	x	x	x	x	x	x	x	x	x
169	3	172	170	x	x	x	x	x	x	x	x	x
151	4	152	147,5	x	x	x	x	x	x	x	x	x
159	5	159	153	x	x	x	x	x	x	x	x	x
163.6	Rerata	165.1	163.75	x	x	x	x	x	x	x	x	x
163	6	172	174	183,5	141,5	x	x	x	x	x	x	x
143	7	165	149	160	119,5	x	x	x	x	x	x	x
166	8	180.5	183	191,5	155,5	x	x	x	x	x	x	x
152	9	166	143	163	115	x	x	x	x	x	x	x
154	10	159	166	171,5	140	x	x	x	x	x	x	x
155.6	Rerata	162.5	154.5	163	127.5	x	x	x	x	x	x	x
183	11	187	172	190,5	186	205,5	210	x	x	x	x	x
139	12	173	193,5	194	190,5	205	202,5	x	x	x	x	x
135	13	132	114	136,5	132	150	161	x	x	x	x	x
165,5	14	164	134	171	158	188	197,5	x	x	x	x	x
133	15	142.5	120	152,5	139	151	162,5	x	x	x	x	x
147.5	Rerata	159.7	135	182.5	153.75	173.5	185.5	x	x	x	x	x
122	16	125	129	141,5	139	148	150	150	129	x	x	x
148	17	157	161	169	173	183	184	185,5	165	x	x	x
150,5	18	131.5	157	172	160,5	188	189,5	184,5	166	x	x	x
171	19	153	175,5	187	198,5	208,5	209,5	207	181	x	x	x
150	20	126.5	151	166	172	170	183	176,5	152,5	X	x	x
147.75	Rerata	138.6	149.5	173.5	161.3	172.25	172.3	178.5	160.25	X	x	x
118	21	102	85,5	121,5	144	140	154	148	115,5	150,5	164,5	164,5
150	22	136.5	115	152	177	173	188,5	192	152	190,5	202	202
164	23	137.5	117,5	157,5	175	175	180	182,5	144,5	180	199	199
147	24	147.5	106,5	151,5	167	164,5	176	176	136	176,5	184,5	184,5
138	25	145	110	142	165	160,5	168	169	133,5	164,5	176	176
143.4	Rerata	133.7	112.5	147	165.6	162.7	169.5	171.25	144	180	192.3	192.3
162	K1	179	180	X	x	x	x	x	x	X	x	x
162	K2	180	187	191	194	x	x	x	x	X	x	x
162	K3	191	201	207.5	209	204	207	x	x	X	x	x
160	K4	182	182	189	190	200	209	215	221	X	x	x
140	K5	169	177	184	187	198	190	202	205	208	210	210

Lampiran 3. Berat badan selama karsinogenesis (setelah induksi).

NO TIKUS	KARSINOGENESIS				TERMINASI
	PEKAN I	PEKAN II	PEKAN III	PEKAN IV	PEKAN V
1	206,5	210,5	203	228	227
2	162	164,5	168	180	209
3	199	199	197	211,5	176
4	169	174,5	171	202	183
5	171	169,5	175,5	189	189
Rerata	175.25	199	184.75	199.75	196.8
6	193	177	177,5	173	190
7	165	168	200	206,5	220
8	207	197	210,5	225,5	243
9	192	179	211	221	244
10	186,5	181	195	205,5	233
Rerata	189.25	180.4	202	197	226
11	221,5	234	229	231	231
12	172	202,5	207,5	221	209
13	167	169,5	175	176	173
14	205	220	218,5	217	181.5
15	184,5	185,5	182,5	188	181
Rerata	181.3333	227	202	206.6	198.5
16	162	129	153	171,7	160.5
17	194	163,5	193	213	200
18	199	165	181	210,5	198
19	218,5	182	216	234	226
20	188,5	153,5	186	201,5	185
Rerata	185	158.6667	185.8	223.5	193.9
21	134	174	175	189	166
22	172	215	212,5	227	209
23	163	203	200	208	190
24	155	197	192	203	188
25	148	191	187	199	181
Rerata	154.4	196	188.5	205.2	186.8
K1	186	187	182	196	196
K2	192	190	203	211	233
K3	183	180	176	203	216
K4	223	223	233	246	249
K5	229	246	250	250	254,5
	202.6	205.2	202.75	215	223.5

Lampiran 4. Skor histopatologis Pulasan HE

Kelompok	Skor histopatologis	Rerata skor	Std. Dev
Kontrol	1		
	1		
	1	1.2	0.4472
	1		
I	2		
	1	1.4	0.5477
	2		
	1		
II	2		
	2	2.4	0.8944
	1		
	3		
III	3		
	3		
	4	2.2	1.0954
	2		
IV	2		
	1		
	2	2.6	0.5477
	3		
V	2		
	3		
	3		
	1	3.6	1.6733
	5		
	4		
	5		
	3		

Lampiran 5. Spektrum serapan maksimal dan kurva standar kadar asam sialat

Panjang gelombang	Serapan (nm)
500	0.02
520	0.045
530	0.067
540	0.118
546	0.163
547	0.167
548	0.171
549	0.173
550	0.173
551	0.172
553	0.166
555	0.155
560	0.11
570	0.03

Serapan kurva standar asam sialat

Kadar ($\mu\text{g/mL}$)	A1	A2	A rerata
50	0.128	0.142	0.135
75	0.177	0.173	0.175
100	0.238	0.224	0.231
150	0.352	0.404	0.378
200	0.581	0.507	0.544
300	0.769	0.774	0.7715
400	1.134	1.029	1.0815

Lampiran 6. Hasil pengukuran kadar asam sialat jaringan

Sampel	A rerata	Kadar Asam Sialat (mg/mL homogenat jaringan)	Kadar Asam Sialat ($\mu\text{g}/\text{mg}$ homogenat jaringan)
K1	0.008	65.5	0.319
K2	0.01	78	0.3008
K3	0.0115	68	0.2694
K4	0.0065	68	0.2937
K5	0.002	60.5	0.235
Rerata		68	0.28358
1	0.004	70.5	0.3004
2	0.0045	73	0.3556
3	0.002	60.5	0.2642
4	0.0085	93	0.3509
5	0.035	68	0.2835
Rerata		73	0.3109
6	0.018	140.5	0.7318
7	0.0055	78	0.3351
8	0.0185	143	0.5586
9	0.013	115.5	0.4517
10	0.027	185.5	0.7703
Rerata		132.5	0.5695
11	0.012	110.5	0.4315
12	0.017	135.5	0.6718
13	0.015	125.5	0.5488
14	0.0145	123	0.5051
15	0.0265	183	0.6716
Rerata		135.5	0.5658
16	0.019	145.5	0.733
17	0.026	180.5	0.7255
18	0.015	125.5	0.5175
19	0.027	185.5	0.6961
20	0.02	150.5	0.7462
Rerata		157.5	0.6837
21	0.0215	158	0.5667
22	0.0235	168	0.8065
23	0.04	250.5	0.9683
24	0.03	200.5	0.9435
25	0.025	175.5	0.6455
Rerata		190.5	0.7861

Lampiran 7. Hasil pengukuran kadar asam sialat plasma.

Sampel	A rerata	Kadar Asam Sialat ($\mu\text{g/mL}$ plasma)
K1	0.3325	415.8621
K2	0.2665	404.8464
K3	0.2565	389.6552
K4	0.2950	402.931
K5	0.4214	446.5172
Rerata	0.3375	411.9623872
1	0.2745	481.9643
2	0.2735	480.1786
3	0.3155	555.1786
4	0.332	584.6429
5	0.246	431.0714
Rerata	0.2883	506.60716
6	0.319	561.4286
7	0.3295	580.1786
8	0.25	438.2143
9	0.2805	492.6786
10	0.2665	467.6786
Rerata	0.2891	508.0357
11	0.271	475.7143
12	0.269	472.1429
13	0.2955	519.4643
14	0.2765	485.5357
15	0.3365	592.6786
Rerata	0.2897	509.1072
16	0.244	427.5
17	0.335	590
18	0.194	338.2143
19	0.4385	774.8214
20	0.26	456.0714
Rerata	0.2943	517.3214
21	0.259	454.2857
22	0.3165	556.9643
23	0.2755	483.75
24	0.377	665
25	0.277	486.4286
Rerata	0.301	529.2857

Lampiran 8. Data mentah hasil pengukuran MDA jaringan payudara tikus.

sampel	MDA(nmol/mL)	jar.(mg)	MDA (nmol/mg jar)
K1	7.3684	278.8	0.0264
K2	10.7368	208.3	0.0515
K3	4.9474	258.7	0.0191
K4	11.8421	212.5	0.0557
K5	5.3684	272.3	0.0197
	8.0526		0.0345
1	65.4737	205.5	0.3186
2	57.3684	223.4	0.2568
3	37.0526	198.2	0.1869
4	4.4211	198.5	0.0223
5	54.2105	213.6	0.2538
	43.7053		0.2077
6	39.7368	205.3	0.1936
7	40.8947	259.3	0.1577
8	43.1579	231.5	0.1864
9	67.1053	252.4	0.2659
10	46.8947	257.5	0.1821
	47.5579		0.1971
11	36.0000	192.0	0.1875
12	63.7368	232.8	0.2738
13	34.0526	256.0	0.1330
14	39.8000	255.7	0.1557
15	44.0526	240.8	0.1829
	43.5284		0.1866
16	47.3158	198.5	0.2384
17	50.1053	248.8	0.2014
18	25.3684	242.5	0.1046
19	52.0000	266.5	0.1951
20	31.3158	201.7	0.1553
	41.2211		0.1789
21	80.1053	256.1	0.3128
22	66.8421	201.7	0.3314
23	90.1053	228.7	0.3940
24	57.5789	243.5	0.2365
25	90.9474	272.5	0.3338
	77.1158		0.3217

Lampiran 9. Data mentah hasil pengukuran MDA plasma.

SAMPEL	A1	A2	A RERATA	koreksi	A RATA2	KADAR (nmol/mL)
K1					0.015	2.6122
K2					0.007	1.3061
K3					0.006	1.1429
K4					0.06	9.9592
K5					0.043	7.1837
						4.4408
1	0.059	0.058	0.0585	0.006	0.0525	4.3673
2	0.079	0.088	0.0835	0.006	0.0775	6.4082
3	0.069	0.061	0.065	0.006	0.059	4.8980
4	0.069	0.066	0.0675	0.006	0.0615	5.1020
5	0.086	0.076	0.081	0.006	0.075	6.2041
						5.3959
6	0.118	0.121	0.1195	0.006	0.1135	9.3469
7	0.115	0.118	0.1165	0.006	0.1105	9.1020
8	0.089	0.075	0.082	0.006	0.076	6.2857
9	0.1	0.105	0.1025	0.006	0.0965	7.9592
10	0.15	0.13	0.14	0.006	0.134	11.0204
						8.7429
11	0.103	0.097	0.1		0.1	8.2449
12	0.071	0.042	0.0565		0.0565	4.6939
13	0.05	0.075	0.0625		0.0625	5.1837
14	0.036	0.057	0.0465		0.0465	3.8776
15	0.136	0.101	0.1185		0.1185	9.7551
						6.3510
16	0.034	0.029	0.0315		0.0315	2.6531
17	0.104	0.079	0.0915		0.0915	7.5510
18	0.067	0.071	0.069		0.069	5.7143
19	0.095	0.121	0.108		0.108	8.8980
20	0.077	0.069	0.073		0.073	6.0408
						6.1714
21	0.096	0.099	0.0975		0.0975	8.0408
22	0.086	0.081	0.0835		0.0835	6.8980
23	0.067	0.054	0.0605		0.0605	5.0204
24	0.119	0.092	0.1055		0.1055	8.6939
25	0.019	0.022	0.0205		0.0205	1.7551

Lampiran 10. Data mentah hasil pengukuran kadar karbonil

NOMOR SAMPEL	Konstr.prot. (mg/mL)	KARBONIL nmol/mg prot
K1	0.2266	9.94061E-05
K2	0.1619	4.60525E-05
K3	0.0743	5.59514E-05
K4	0.2242	2.40774E-05
K5	0.1775	2.20283E-05
		9.63002E-05
1	0.0983	6.90788E-05
2	0.1079	2.37861E-05
3	0.1223	1.26364E-05
4	0.1079	1.24478E-05
5	0.1607	2.31981E-05
	I	2.82294E-05
6	0.1559	4.79096E-05
7	0.1954	3.56791E-05
8	0.1631	1.4711E-05
9	0.1607	3.91453E-05
10	0.2206	4.57381E-05
	II	3.66366E-05
11	0.1523	3.24935E-05
12	0.1559	2.40693E-05
13	0.1595	3.14717E-05
14	0.1511	5.41558E-05
15	0.1271	3.35108E-05
	III	3.51402E-05
16	0.2170	1.94533E-05
17	0.2602	6.59289E-05
18	0.1823	4.87403E-05
19	0.1930	2.26042E-05
20	0.1679	3.66019E-05
	IV	3.86657E-05
21	0.1739	5.47848E-05
22	0.2038	5.71383E-05
23	0.1859	4.9889E-05
24	0.1655	6.37312E-05
25	0.2770	4.33247E-05
	V	5.37736E-05

Lampiran 11. Data mentah hasil pengukuran aktivitas spesifik katalase jaringan.

JARINGAN	T 30"	T 3'	dA	Aktivitas (U/mL)	Konstr. Prot. (mg/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg Prot.)
Blanko	0.36	0.36	0			
K1	0.236	0.232	0.0013	0.1225	4.8544	0.0252
K2	0.269	0.266	0.0010	0.0919	5.8252	0.0158
K3	0.311	0.308	0.0010	0.0919	8.2524	0.0111
K4	0.338	0.335	0.0010	0.0919	11.3269	0.0081
K5	0.264	0.25	0.0047	0.4289	5.178	0.0828
			0.0018	0.1654		0.0286
1	0.295	0.294	0.0003	0.0306	12.2977	0.0025
2	0.392	0.39	0.0007	0.0613	16.3430	0.0037
3	0.297	0.292	0.0017	0.1532	22.8155	0.0067
4	0.295	0.289	0.0020	0.1838	29.1262	0.0063
5	0.241	0.236	0.0017	0.1532	23.1392	0.0066
			0.0013	0.1164		0.0052
6	0.347	0.342	0.0017	0.1532	19.9029	0.0077
7	0.224	0.222	0.0007	0.0613	16.6667	0.0037
8	0.181	0.18	0.0003	0.0306	20.0065	0.0015
9	0.334	0.33	0.0013	0.1225	30.9061	0.0040
10	0.295	0.294	0.0003	0.0306	21.1974	0.0014
			0.0009	0.0797		0.0037
11	0.298	0.297	0.0003	0.0306	15.3722	0.0020
12	0.324	0.318	0.0020	0.1838	19.7411	0.0093
13	0.309	0.307	0.0007	0.0613	19.0939	0.0032
14	0.353	0.352	0.0003	0.0306	16.0194	0.0019
15	0.373	0.37	0.0010	0.0919	23.9482	0.0038
			0.0009	0.0797		0.0041
16	0.27	0.262	0.0027	0.2451	13.7540	0.0178
17	0.258	0.257	0.0003	0.0306	14.7249	0.0021
18	0.316	0.312	0.0013	0.1225	23.9482	0.0051
19	0.217	0.214	0.0010	0.0919	18.6084	0.0049
20	0.254	0.248	0.0020	0.1838	20.5502	0.0089
			0.0015	0.1348		0.0078
21	0.369	0.36	0.0030	0.2757	14.4013	0.0191
22	0.284	0.282	0.0007	0.0613	20.0647	0.0031
23	0.302	0.298	0.0013	0.1225	11.0032	0.0111
24	0.325	0.321	0.0013	0.1225	7.6052	0.0161
25	0.295	0.292	0.0010	0.0919	14.2395	0.0065
			0.0015	0.1348		0.0112

Lampiran 12. Data mentah hasil pengukuran katalase plasma.

DARAH	T 30"	T 10'	dA	Aktivitas (U/mL)	Konstr. Prot. (mg/mL)	Aktivitas spesifik (U/mg Prot.)
Blanko	0.36	0.36	0			
K1	0.57	0.57	0	0.0000	46.1538	0.0000
K2	0.425	0.421	0.001333	0.4902	71.5100	0.0069
K3	0.327	0.327	0.000000	0.0000	56.9801	0.0000
K4	0.356	0.355	0.000333	0.1225	60.9687	0.0020
K5	0.384	0.382	0.000667	0.2451	55.8405	0.0044
				0.1716		0.0027
1	0.582	0.578	0.001333	0.1225	89.4587	0.0014
2	0.638	0.633	0.001667	0.1532	82.6211	0.0019
3	0.662	0.653	0.003000	0.2757	73.5043	0.0038
4	0.641	0.634	0.002333	0.2145	78.0627	0.0027
5	0.348	0.34	0.002667	0.2451	92.3077	0.0027
			0.002200	0.0160		0.0025
6	0.278	0.277	0.000333	0.1225	90.5983	0.0014
7	0.536	0.53	0.002000	0.1838	86.6097	0.0021
8	0.528	0.52	0.002667	0.2451	90.5983	0.0027
9	0.498	0.49	0.002667	0.2451	92.8775	0.0026
10	0.347	0.339	0.002667	0.9804	101.4245	0.0097
				0.0082		0.0037
11	0.334	0.328	0.002000	0.7353	77.4929	0.0095
12	0.303	0.301	0.000667	0.2451	87.4644	0.0028
13	0.382	0.381	0.000333	0.1225	62.1083	0.0020
14	0.435	0.43	0.001667	0.6127	103.9886	0.0059
15	0.365	0.361	0.001333	0.4902	81.1966	0.0060
				0.4412		0.0052
16	0.333	0.33	0.001000	0.3676	92.0228	0.0040
17	0.42	0.416	0.001333	0.4902	91.4530	0.0054
18	0.306	0.298	0.002667	0.9804	103.1339	0.0095
19	0.355	0.351	0.001333	0.4902	90.0285	0.0054
20	0.381	0.376	0.001667	0.6127	84.9003	0.0072
				0.5882		0.0063
21	0.668	0.642	0.008667	0.7966	86.0399	0.0093
22	0.364	0.356	0.002667	0.9804	100.5698	0.0097
23	0.41	0.406	0.001333	0.4902	97.7208	0.0050
24	0.372	0.365	0.002333	0.8578	102.5641	0.0084
25	0.25	0.24	0.003333	0.3064	73.5043	0.0042
				0.6863		0.0073

Lampiran 13. Data kasar pengukuran aktivitas spesifik MnSOD

Serapan standar

Standar	A1	A2	dA	dA/mnt	% inhibisi	konsentrasi (U/mL)	log.konsentrasi
S1	0.048	0.117	0.07	0.023		(U/mL)	
S2	0.049	0.11	0.06	0.0203333	11.5942029	0.1475	-0.831
S3	0.048	0.097	0.05	0.0163333	28.98550725	0.4425	-0.354
S4	0.048	0.083	0.04	0.0116667	49.27536232	0.885	-0.053
S5	0.044	0.071	0.03	0.009	60.86956522	1.77	0.248
S6	0.043	0.06	0.02	0.0056667	75.36231884	3.54	0.549

Serapan sample

Sampel jaringan	dA	dA/mnt	% inhibisi	log.konsent.	MnSOD (U/mL)	Kadar protein (mg/mL)	Kdr. MnSOD (U/mg prot)
K1	0.08	0.0267	29.8246	0.2109	1.6252	4.8544	0.3348
K2	0.084	0.0280	26.3158	0.1688	1.4750	5.8252	0.2532
K3	0.0775	0.0258	32.0175	0.2372	1.7267	8.2524	0.2092
K4	0.065	0.0217	42.9825	0.3688	2.3377	11.3269	0.2064
K5	0.09	0.0300	21.0526	0.1056	1.2754	5.178	0.2463
1	0.071	0.0237	37.7193	0.3056	2.0213	12.2977	0.1644
2	0.0715	0.0238	37.2807	0.3004	1.9970	16.3430	0.1222
3	0.071	0.0237	37.7193	0.3056	2.0213	22.8155	0.0886
4	0.07	0.0233	38.5965	0.3162	2.0709	29.1262	0.0711
5	0.068	0.0227	40.3509	0.3372	2.1738	23.1392	0.0939
6	0.01025	0.0034	87.2035	0.8994	7.9331	19.9029	0.3986
7	0.01	0.0033	91.2281	0.9477	8.8662	16.6667	0.5320
8	0.0091	0.0030	92.0175	0.9572	9.0617	20.0065	0.4529
9	0.00985	0.0033	91.3596	0.9493	8.8985	30.9061	0.2879
10	0.00965	0.0032	91.5351	0.9514	8.9417	21.1974	0.4218
11	0.0205	0.0068	70.2899	0.4371	2.7358	15.3722	0.0472
12	0.01	0.0033	85.5072	0.7567	5.7102	19.7411	0.2893
13	0.0255	0.0085	63.0435	0.2849	1.9271	19.0939	0.1009
14	0.0105	0.0035	84.7826	0.7414	5.5136	16.0194	0.3442
15	0.012	0.0040	82.6087	0.6958	4.9634	23.9482	0.2073
16	0.032	0.0107	53.6232	0.0871	1.2220	13.7540	0.0889
17	0.01905	0.0064	72.3913	0.4812	3.0284	14.7249	0.2057
18	0.0245	0.0082	64.4928	0.3153	2.0670	23.9482	0.0863
19	0.02	0.0067	71.0145	0.4523	2.8334	18.6084	0.1523
20	0.0235	0.0078	65.9420	0.3458	2.2171	20.5502	0.1079
21	0.0175	0.0058	74.6377	0.5284	3.3759	14.4013	0.2344
22	0.019	0.0063	72.4638	0.4827	3.0391	20.0647	0.1515
23	0.013	0.0043	81.1594	0.6653	4.6275	11.0032	0.4206
24	0.012	0.0040	82.6087	0.6958	4.9634	7.6052	0.6526
25	0.0185	0.0062	73.1884	0.4980	3.1474	14.2395	0.2210

Lampiran 14. Data kasar pengukuran kadar aktivitas spesifik MnSOD darah

Sampel darah	dA	dA/mnt	% inhibisi	log.konsent.	MnSOD (U/mL)	Protein (mg/mL)	MnSOD (U/mg prot.)
K1	0.0125	0.0042	89.0351	0.9214	8.3449	13.5922	0.6139
K2	0.01	0.0033	91.2281	0.9477	8.8662	27.9935	0.3167
K3	0.011	0.0037	90.3509	0.9372	8.6539	19.7411	0.4384
K4	0.015	0.0050	86.8421	0.8951	7.8543	22.0065	0.3569
K5	0.0115	0.0038	89.9123	0.9319	8.5496	19.0939	0.4478
1	0.0135	0.0045	80.4348	0.65013	4.4682	84.4660	0.0529
2	0.0125	0.0042	81.8841	0.68057	4.7925	85.9223	0.0558
3	0.0095	0.0032	86.2319	0.77187	5.9138	100.0000	0.0591
4	0.0105	0.0035	84.7826	0.74143	5.5136	40.9385	0.1347
5	0.011	0.0037	84.0580	0.72622	5.3237	86.0841	0.0618
6	0.007	0.0023	89.8551	0.84796	7.0462	66.6667	0.1057
7	0.009	0.0030	86.9565	0.78709	6.1247	82.8479	0.0739
8	0.0085	0.0028	87.6812	0.80230	6.3431	93.8511	0.0676
9	0.0125	0.0042	81.8841	0.68057	4.7925	91.9094	0.0521
10	0.011	0.0037	84.0580	0.72622	5.3237	78.6408	0.0677
11	0.012	0.0040	82.6087	0.69578	4.9634	33.6570	0.1475
12	0.006	0.0020	91.3043	0.87839	7.5577	97.2492	0.0777
13	0.0105	0.0035	84.7826	0.74143	5.5136	53.7217	0.1026
14	0.0085	0.0028	87.6812	0.80230	6.3431	59.5469	0.1065
15	0.01	0.0033	85.5072	0.75665	5.7102	80.4207	0.0710
16	0.008	0.0027	88.4058	0.81752	6.5693	83.8188	0.0784
17	0.0105	0.0035	84.7826	0.74143	5.5136	115.3722	0.0478
18	0.011	0.0037	84.0580	0.72622	5.3237	90.7767	0.0586
19	0.00905	0.0030	86.8841	0.78557	6.1033	86.8932	0.0702
20	0.0085	0.0028	87.6812	0.80230	6.3431	93.5275	0.0678
21	0.007	0.0023	89.8551	0.84796	7.0462	83.4951	0.0844
22	0.005	0.0017	92.7536	0.90883	8.1064	118.4466	0.0684
23	0.0065	0.0022	90.5797	0.86317	7.2975	77.5081	0.0942
24	0.009	0.0030	86.9565	0.78709	6.1247	90.9385	0.0674
25	0.005	0.0017	92.7536	0.90883	8.1064	103.8835	0.0780

Lampiran 15. Data kasar pengukuran kadar protein

Kurva standar

NO	KONSENTRASI (mg/mL)	A1	A2	A Rerata
1	0.2	0.036	0.024	0.03
2	0.4	0.101	0.103	0.102
3	0.6	0.182	0.164	0.173
4	0.8	0.252	0.241	0.2465
5	1	0.321	0.298	0.3095

Kadar protein

Nomor Sampel	Serapan jaringan			Protein jaringan (mg/mL)	Protein darah (mg/mL)	Serapan darah		
	1	2	rata-rata			1	2	Rerata
K1	0.012	0.02	0.016	4.8544	13.5922	0.043	0.043	0.043
K2	0.033	0.005	0.019	5.8252	27.9935	0.087	0.088	0.0875
K3	0.029	0.024	0.0265	8.2524	19.7411	0.059	0.065	0.062
K4	0.039	0.033	0.036	11.3269	22.0065	0.076	0.062	0.069
K5	0.018	0.016	0.017	5.1780	19.0939	0.06	0.06	0.06
1	0.077	0.077	0.077	12.2977	84.4660	0.302	0.222	0.262
2	0.082	0.021	0.0515	16.3430	85.9223	0.281	0.252	0.2665
3	0.063	0.08	0.0715	22.8155	100.0000	0.313	0.307	0.31
4	0.091		0.091	29.1262	40.9385	0.059	0.196	0.1275
5	0.06	0.085	0.0725	23.1392	86.0841	0.301	0.233	0.267
6	0.028	0.097	0.0625	19.9029	66.6667	0.282	0.207	0.207
7	0.056	0.049	0.0525	16.6667	82.8479	0.182	0.257	0.257
8	0.071	0.067	0.069	22.0065	93.8511	0.247	0.291	0.291
9	0.094	0.099	0.0965	30.9061	91.9094	0.360	0.285	0.285
10	0.065	0.068	0.0665	21.1974	78.6408	0.210	0.244	0.244
11	0.042	0.055	0.0485	15.3722	33.6570	0.101	0.109	0.105
12	0.041	0.083	0.062	19.7411	97.2492	0.327	0.276	0.3015
13	0.058	0.062	0.06	19.0939	53.7217	0.185	0.149	0.167
14	0.032	0.069	0.0505	16.0194	59.5469	0.206	0.164	0.185
15	0.081	0.069	0.075	23.9482	80.4207	0.273	0.226	0.2495
16	0.052	0.035	0.0435	13.7540	83.8188	0.247	0.273	0.26
17	0.049	0.044	0.0465	14.7249	115.3722	0.3	0.415	0.3575
18	0.079	0.071	0.075	23.9482	90.7767	0.236	0.327	0.2815
19	0.082	0.035	0.0585	18.6084	86.8932	0.28	0.259	0.2695
20	0.062	0.067	0.0645	20.5502	93.5275	0.257	0.323	0.29
21	0.036	0.055	0.0455	14.4013	83.4951	0.268	0.25	0.259
22	0.063	0.071	0.063	20.0647	118.4466	0.378	0.356	0.367
23	0.03	0.04	0.035	11.0032	77.5081	0.332	0.149	0.2405
24	0.014	0.035	0.0245	7.6052	90.9385	0.272	0.292	0.282
25	0.074	0.016	0.045	14.2395	103.8835	0.322	0.322	0.322

Lampiran 16. Analisis statistik

Tests of Normality

sampel	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk	
	Statistic	df	Sig.	Statistic	
log_katalasejar1000	kontrol	.196	5	.200	.923
	kel.1	.329	5	.081	.810
	kel.2	.231	5	.200	.904
	kel.3	.224	5	.200	.889
	kel.4	.193	5	.200	.977
	kel.5	.196	5	.200	.932
MnSOD Jar. U/mg protein	kontrol	.216	5	.200	.942
	kel.1	.227	5	.200	.890
	kel.2	.226	5	.200	.909
	kel.3	.336	5	.067	.773
	kel.4	.240	5	.200	.877
	kel.5	.200	5	.200	.929
Karbonil Jar. nmol/mg protein	kontrol	.219	5	.200	.886
	kel.1	.375	5	.020	.737
	kel.2	.271	5	.200	.860
	kel.3	.358	5	.036	.828
	kel.4	.198	5	.200	.937
	kel.5	.152	5	.200	.995
MDA Jar. nmol/mg jaringan	kontrol	.276	5	.200	.813
	kel.1	.258	5	.200	.885
	kel.2	.335	5	.070	.840
	kel.3	.293	5	.185	.896
	kel.4	.224	5	.200	.964
	kel.5	.238	5	.200	.941
As. Sialat ug/mg jaringan	kontrol	.222	5	.200	.954
	kel.1	.237	5	.200	.893
	kel.2	.211	5	.200	.939
	kel.3	.242	5	.200	.899
	kel.4	.352	5	.042	.722
	kel.5	.212	5	.200	.909

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Tests of Normality

	sampel	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk
		Statistic	df	Sig.	Statistic
MnSOD darah U/mg protein	kontrol	.255	5	.200	.921
	kel.1	.425	5	.004	.646
	kel.2	.290	5	.197	.883
	kel.3	.228	5	.200	.918
	kel.4	.209	5	.200	.973
	kel.5	.215	5	.200	.927
Katalase darah U/mg protein	kontrol	.214	5	.200	.896
	kel.1	.213	5	.200	.957
	kel.2	.416	5	.005	.696
	kel.3	.199	5	.200	.931
	kel.4	.264	5	.200	.931
	kel.5	.264	5	.200	.852
MDA plasma nmol/ml	kontrol	.279	5	.200	.854
	kel.1	.231	5	.200	.910
	kel.2	.181	5	.200	.983
	kel.3	.278	5	.200	.893
	kel.4	.223	5	.200	.962
	kel.5	.215	5	.200	.915
Sialat Plasma ug/ml	kontrol	.230	5	.200	.910
	kel.1	.254	5	.200	.934
	kel.2	.210	5	.200	.925
	kel.3	.280	5	.200	.812
	kel.4	.241	5	.200	.940
	kel.5	.293	5	.184	.866

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Descriptives

MnSOD Jar. U/mg protein

	Minimum	Maximum
kontrol	.0106	.0215
kel.1	.0092	.0290
kel.2	.0053	.0122
kel.3	.0065	.0129
kel.4	.0048	.0114
kel.5	.0047	.0098
Total	.0047	.0290

Test of Homogeneity of Variances

MnSOD Jar. U/mg protein

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.753	5	24	.042

ANOVA

MnSOD Jar. U/mg protein

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	5	.000	7.993	.000
Within Groups	.000	24	.000		
Total	.001	29			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons
MnSOD Jar. U/mg protein
LSD

(I) sampel	(J) sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	kel.1	-.0061292	.0028009	.039	-.011910	-.000349
	kel.2	.0066852	.0028009	.025	.000904	.012466
	kel.3	.0066982	.0028009	.025	.000918	.012479
	kel.4	.0069582	.0028009	.020	.001177	.012739
	kel.5	.0079366	.0028009	.009	.002156	.013717
kel.1	kontrol	.0061292	.0028009	.039	.000349	.011910
	kel.2	.0128143	.0028009	.000	.007034	.018595
	kel.3	.0128274	.0028009	.000	.007047	.018608
	kel.4	.0130874	.0028009	.000	.007307	.018868
	kel.5	.0140658	.0028009	.000	.008285	.019846
kel.2	kontrol	-.0066852	.0028009	.025	-.012466	-.000904
	kel.1	-.0128143	.0028009	.000	-.018595	-.007034
	kel.3	.0000131	.0028009	.996	-.005768	.005794
	kel.4	.0002730	.0028009	.923	-.005508	.006054
	kel.5	.0012515	.0028009	.659	-.004529	.007032
kel.3	kontrol	-.0066982	.0028009	.025	-.012479	-.000918
	kel.1	-.0128274	.0028009	.000	-.018608	-.007047
	kel.2	-.0000131	.0028009	.996	-.005794	.005768
	kel.4	.0002599	.0028009	.927	-.005521	.006041
	kel.5	.0012384	.0028009	.662	-.004542	.007019
kel.4	kontrol	-.0069582	.0028009	.020	-.012739	-.001177
	kel.1	-.0130874	.0028009	.000	-.018868	-.007307
	kel.2	-.0002730	.0028009	.923	-.006054	.005508
	kel.3	-.0002599	.0028009	.927	-.006041	.005521
	kel.5	.0009785	.0028009	.730	-.004802	.006759
kel.5	kontrol	-.0079366	.0028009	.009	-.013717	-.002156
	kel.1	-.0140658	.0028009	.000	-.019846	-.008285
	kel.2	-.0012515	.0028009	.659	-.007032	.004529
	kel.3	-.0012384	.0028009	.662	-.007019	.004542
	kel.4	-.0009785	.0028009	.730	-.006759	.004802

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

```

ONEWAY log_katalasejar1000 BY sampel
/STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY
/MISSING ANALYSIS
/POSTHOC=LSD ALPHA(0.05).
    
```

Descriptives

log_katalasejar1000

	Minimum	Maximum
kontrol	.91	1.92
kel.1	.40	.83
kel.2	.15	.89
kel.3	.28	.97
kel.4	.32	1.25
kel.5	.49	1.28
Total	.15	1.92

Test of Homogeneity of Variances

log_katalasejar1000

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.418	5	24	.833

ANOVA

log_katalasejar1000

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.328	5	.466	4.745	.004
Within Groups	2.355	24	.098		
Total	4.683	29			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

log_katalasejar1000
LSD

(I) sampel	(J) sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	kel.1	.61216	.19812	.005	.2033	1.0211
	kel.2	.81858	.19812	.000	.4097	1.2275
	kel.3	.76774	.19812	.001	.3588	1.1766
	kel.4	.51042	.19812	.017	.1015	.9193
	kel.5	.32689	.19812	.112	-.0820	.7358
kel.1	kontrol	-.61216	.19812	.005	-1.0211	-.2033
	kel.2	.20643	.19812	.308	-.2025	.6153
	kel.3	.15558	.19812	.440	-.2533	.5645
	kel.4	-.10174	.19812	.612	-.5106	.3072
	kel.5	-.28527	.19812	.163	-.6942	.1236
kel.2	kontrol	-.81858	.19812	.000	-1.2275	-.4097
	kel.1	-.20643	.19812	.308	-.6153	.2025
	kel.3	-.05085	.19812	.800	-.4597	.3581
	kel.4	-.30816	.19812	.133	-.7171	.1007
	kel.5	-.49170	.19812	.020	-.9006	-.0828
kel.3	kontrol	-.76774	.19812	.001	-1.1766	-.3588
	kel.1	-.15558	.19812	.440	-.5645	.2533
	kel.2	.05085	.19812	.800	-.3581	.4597
	kel.4	-.25732	.19812	.206	-.6662	.1516
	kel.5	-.44085	.19812	.036	-.8498	-.0319
kel.4	kontrol	-.51042	.19812	.017	-.9193	-.1015
	kel.1	.10174	.19812	.612	-.3072	.5106
	kel.2	.30816	.19812	.133	-.1007	.7171
	kel.3	.25732	.19812	.206	-.1516	.6662
	kel.5	-.18353	.19812	.363	-.5924	.2254
kel.5	kontrol	-.32689	.19812	.112	-.7358	.0820
	kel.1	.28527	.19812	.163	-.1236	.6942
	kel.2	.49170	.19812	.020	.0628	.9006
	kel.3	.44085	.19812	.036	.0319	.8498
	kel.4	.18353	.19812	.363	-.2254	.5924

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

```

ONEWAY Karboniljar BY sampel
/STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY
/MISSING ANALYSIS
/POSTHOC=LSD ALPHA(0.05).

```

Descriptives

Karbonil Jar. nmol/mg protein

	Minimum	Maximum
kontrol	2.2028	9.9406
kel.1	1.2448	6.9079
kel.2	1.4711	4.7910
kel.3	2.4069	5.4156
kel.4	1.9453	6.5929
kel.5	4.3325	6.3731
Total	1.2448	9.9406

Test of Homogeneity of Variances

Karbonil Jar. nmol/mg protein

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.514	5	24	.223

ANOVA

Karbonil Jar. nmol/mg protein

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	22.732	5	4.546	1.203	.338
Within Groups	90.681	24	3.778		
Total	113.413	29			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons
Karbonil Jar. nmol/mg protein
LSD

(I) sampel	(J) sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	kel.1	2.1273598	1.2293693	.096	-.409934	4.664653
	kel.2	1.2866383	1.2293693	.306	-1.250655	3.823932
	kel.3	1.4362797	1.2293693	.254	-1.101014	3.973573
	kel.4	1.0837315	1.2293693	.387	-1.453562	3.621025
	kel.5	-.4270583	1.2293693	.731	-2.964352	2.110235
kel.1	kontrol	-2.1273598	1.2293693	.096	-4.664653	.409934
	kel.2	-.8407215	1.2293693	.501	-3.378015	1.696572
	kel.3	-.6910800	1.2293693	.579	-3.228374	1.846213
	kel.4	-1.0436283	1.2293693	.404	-3.580922	1.493665
	kel.5	-2.5544180	1.2293693	.049	-5.091712	-.017125
kel.2	kontrol	-1.2866383	1.2293693	.306	-3.823932	1.250655
	kel.1	.8407215	1.2293693	.501	-1.696572	3.378015
	kel.3	.1496414	1.2293693	.904	-2.387652	2.686935
	kel.4	-.2029068	1.2293693	.870	-2.740200	2.334387
	kel.5	-1.7136966	1.2293693	.176	-4.250990	.823597
kel.3	kontrol	-1.4362797	1.2293693	.254	-3.973573	1.101014
	kel.1	.6910800	1.2293693	.579	-1.846213	3.228374
	kel.2	-.1496414	1.2293693	.904	-2.686935	2.387652
	kel.4	-.3525482	1.2293693	.777	-2.889842	2.184745
	kel.5	-1.8633380	1.2293693	.143	-4.400631	.673955
kel.4	kontrol	-1.0837315	1.2293693	.387	-3.621025	1.453562
	kel.1	1.0436283	1.2293693	.404	-1.493665	3.580922
	kel.2	.2029068	1.2293693	.870	-2.334387	2.740200
	kel.3	.3525482	1.2293693	.777	-2.184745	2.889842
	kel.5	-1.5107898	1.2293693	.231	-4.048083	1.026504
kel.5	kontrol	.4270583	1.2293693	.731	-2.110235	2.964352
	kel.1	2.5544180	1.2293693	.049	.017125	5.091712
	kel.2	1.7136966	1.2293693	.176	-.823597	4.250990
	kel.3	1.8633380	1.2293693	.143	-.673955	4.400631
	kel.4	1.5107898	1.2293693	.231	-1.026504	4.048083

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

ONEWAY MDAjar BY sampel
/STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY
/MISSING ANALYSIS
/POSTHOC=LSD ALPHA(0.05).

Page 10

Descriptives

MDA Jar. nmol/mg jaringan

	Minimum	Maximum
kontrol	.0191	.0557
kel.1	.0223	.3186
kel.2	.1577	.2659
kel.3	.1330	.2738
kel.4	.1046	.2384
kel.5	.2365	.3940
Total	.0191	.3940

Test of Homogeneity of Variances

MDA Jar. nmol/mg jaringan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.821	5	24	.147

ANOVA

MDA Jar. nmol/mg jaringan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.210	5	.042	10.703	.000
Within Groups	.094	24	.004		
Total	.304	29			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons
MDA Jar. nmol/mg jaringan
LSD

(I) sampel	(J) sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	kel.1	-.1732000	.0396184	.000	-.254968	-.091432
	kel.2	-.1626600	.0396184	.000	-.244428	-.080892
	kel.3	-.1521000	.0396184	.001	-.233868	-.070332
	kel.4	-.1444800	.0396184	.001	-.226248	-.062712
	kel.5	-.2872200	.0396184	.000	-.368988	-.205452
kel.1	kontrol	.1732000	.0396184	.000	.091432	.254968
	kel.2	.0105400	.0396184	.792	-.071228	.092308
	kel.3	.0211000	.0396184	.599	-.060668	.102868
	kel.4	.0287200	.0396184	.476	-.053048	.110488
	kel.5	-.1140200	.0396184	.008	-.195788	-.032252
kel.2	kontrol	.1626600	.0396184	.000	.080892	.244428
	kel.1	-.0105400	.0396184	.792	-.092308	.071228
	kel.3	.0105600	.0396184	.792	-.071208	.092328
	kel.4	.0181800	.0396184	.650	-.063588	.099948
	kel.5	-.1245600	.0396184	.004	-.206328	-.042792
kel.3	kontrol	.1521000	.0396184	.001	.070332	.233868
	kel.1	-.0211000	.0396184	.599	-.102868	.060668
	kel.2	-.0105600	.0396184	.792	-.092328	.071208
	kel.4	.0076200	.0396184	.849	-.074148	.089388
	kel.5	-.1351200	.0396184	.002	-.216888	-.053352
kel.4	kontrol	.1444800	.0396184	.001	.062712	.226248
	kel.1	-.0287200	.0396184	.476	-.110488	.053048
	kel.2	-.0181800	.0396184	.650	-.099948	.063588
	kel.3	-.0076200	.0396184	.849	-.089388	.074148
	kel.5	-.1427400	.0396184	.001	-.224508	-.060972
kel.5	kontrol	.2872200	.0396184	.000	.205452	.368988
	kel.1	.1140200	.0396184	.008	.032252	.195788
	kel.2	.1245600	.0396184	.004	.042792	.206328
	kel.3	.1351200	.0396184	.002	.053352	.216888
	kel.4	.1427400	.0396184	.001	.060972	.224508

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

```
ONEWAY ASjar BY sampel
/STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY
/MISSING ANALYSIS
/POSTHOC=LSD ALPHA(0.05).
```

Descriptives

As. Sialat ug/mg jaringan

	Minimum	Maximum
kontrol	.2350	.3190
kel.1	.2642	.3556
kel.2	.3351	.7703
kel.3	.4315	.6718
kel.4	.5175	.7462
kel.5	.5667	.9683
Total	.2350	.9683

Test of Homogeneity of Variances

As. Sialat ug/mg jaringan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.250	5	24	.007

ANOVA

As. Sialat ug/mg jaringan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.003	5	.201	13.643	.000
Within Groups	.353	24	.015		
Total	1.357	29			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons
As. Sialat ug/mg jaringan
LSD

(I) sampel	(J) sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	kel.1	-.0273400	.0767081	.725	-.185658	.130978
	kel.2	-.2859200	.0767081	.001	-.444238	-.127602
	kel.3	-.2821800	.0767081	.001	-.440498	-.123862
	kel.4	-.4000800	.0767081	.000	-.558398	-.241762
	kel.5	-.5025200	.0767081	.000	-.660838	-.344202
kel.1	kontrol	.0273400	.0767081	.725	-.130978	.185658
	kel.2	-.2585800	.0767081	.003	-.416898	-.100262
	kel.3	-.2548400	.0767081	.003	-.413158	-.096522
	kel.4	-.3727400	.0767081	.000	-.531058	-.214422
	kel.5	-.4751800	.0767081	.000	-.633498	-.316862
kel.2	kontrol	.2859200	.0767081	.001	.127602	.444238
	kel.1	.2585800	.0767081	.003	.100262	.416898
	kel.3	.0037400	.0767081	.962	-.154578	.162058
	kel.4	-.1141600	.0767081	.150	-.272478	.044158
	kel.5	-.2166000	.0767081	.009	-.374918	-.058282
kel.3	kontrol	.2821800	.0767081	.001	.123862	.440498
	kel.1	.2548400	.0767081	.003	.096522	.413158
	kel.2	-.0037400	.0767081	.962	-.162058	.154578
	kel.4	-.1179000	.0767081	.137	-.276218	.040418
	kel.5	-.2203400	.0767081	.008	-.378658	-.062022
kel.4	kontrol	.4000800	.0767081	.000	.241762	.558398
	kel.1	.3727400	.0767081	.000	.214422	.531058
	kel.2	.1141600	.0767081	.150	-.044158	.272478
	kel.3	.1179000	.0767081	.137	-.040418	.276218
	kel.5	-.1024400	.0767081	.194	-.260758	.055878
kel.5	kontrol	.5025200	.0767081	.000	.344202	.660838
	kel.1	.4751800	.0767081	.000	.316862	.633498
	kel.2	.2166000	.0767081	.009	.058282	.374918
	kel.3	.2203400	.0767081	.008	.062022	.378658
	kel.4	.1024400	.0767081	.194	-.055878	.260758

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

ONEWAY skorhisto BY sampel
/STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY
/MISSING ANALYSIS
/POSTHOC=LSD ALPHA(0.05).

Descriptives

skorhisto

	Minimum	Maximum
kontrol	1.0	2.0
kel.1	1.0	2.0
kel.2	1.0	3.0
kel.3	1.0	4.0
kel.4	2.0	3.0
kel.5	1.0	5.0
Total	1.0	5.0

Test of Homogeneity of Variances

skorhisto

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.210	5	24	.087

ANOVA

skorhisto

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	17.467	5	3.493	3.743	.012
Within Groups	22.400	24	.933		
Total	39.867	29			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

skorhisto
LSD

(I) sampel	(J) sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	kel.1	-.4000	.6110	.519	-1.661	.861
	kel.2	-1.2000	.6110	.061	-2.461	.061
	kel.3	-1.0000	.6110	.115	-2.261	.261
	kel.4	-1.4000	.6110	.031	-2.661	-.139
	kel.5	-2.4000	.6110	.001	-3.661	-1.139
kel.1	kontrol	.4000	.6110	.519	-.861	1.661
	kel.2	-.8000	.6110	.203	-2.061	.461
	kel.3	-.6000	.6110	.336	-1.861	.661
	kel.4	-1.0000	.6110	.115	-2.261	.261
	kel.5	-2.0000	.6110	.003	-3.261	-.739
kel.2	kontrol	1.2000	.6110	.061	-.061	2.461
	kel.1	.8000	.6110	.203	-.461	2.061
	kel.3	.2000	.6110	.746	-1.061	1.461
	kel.4	-.2000	.6110	.746	-1.461	1.061
	kel.5	-1.2000	.6110	.061	-2.461	.061
kel.3	kontrol	1.0000	.6110	.115	-.261	2.261
	kel.1	.6000	.6110	.336	-.661	1.861
	kel.2	-.2000	.6110	.746	-1.461	1.061
	kel.4	-.4000	.6110	.519	-1.661	.861
	kel.5	-1.4000	.6110	.031	-2.661	-.139
kel.4	kontrol	1.4000	.6110	.031	.139	2.661
	kel.1	1.0000	.6110	.115	-.261	2.261
	kel.2	.2000	.6110	.746	-1.061	1.461
	kel.3	-.4000	.6110	.519	-.861	1.661
	kel.5	-1.0000	.6110	.115	-2.261	.261
kel.5	kontrol	2.4000	.6110	.001	1.139	3.661
	kel.1	2.0000	.6110	.003	.739	3.261
	kel.2	1.2000	.6110	.061	-.061	2.461
	kel.3	1.4000	.6110	.031	.139	2.661
	kel.4	1.0000	.6110	.115	-.261	2.261

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

REGRESSION

/MISSING LISTWISE

/STATISTICS COEFF OUTS CI(95) R ANOVA CHANGE

/CRITERIA=PIN(.05) POUT(.10)

/NOORIGIN

Descriptives

MnSOD darah U/mg protein

	Minimum	Maximum
kontrol	.3167	.6139
kel.1	.0529	.1347
kel.2	.0521	.1057
kel.3	.0710	.1475
kel.4	.0478	.0784
kel.5	.0674	.0942
Total	.0478	.6139

Test of Homogeneity of Variances

MnSOD darah U/mg protein

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.287	5	24	.021

ANOVA

MnSOD darah U/mg protein

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.534	5	.107	40.444	.000
Within Groups	.063	24	.003		
Total	.597	29			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons
MnSOD darah U/mg protein
LSD

(I) sampel	(J) sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	kel.1	.3618800	.0324957	.000	.294812	.428948
	kel.2	.3613400	.0324957	.000	.294272	.428408
	kel.3	.3336800	.0324957	.000	.266612	.400748
	kel.4	.3701800	.0324957	.000	.303112	.437248
	kel.5	.3562600	.0324957	.000	.289192	.423328
kel.1	kontrol	-.3618800	.0324957	.000	-.428948	-.294812
	kel.2	-.0005400	.0324957	.987	-.067608	.066528
	kel.3	-.0282000	.0324957	.394	-.095268	.038868
	kel.4	.0083000	.0324957	.801	-.058768	.075368
	kel.5	-.0056200	.0324957	.864	-.072688	.061448
kel.2	kontrol	-.3613400	.0324957	.000	-.428408	-.294272
	kel.1	.0005400	.0324957	.987	-.066528	.067608
	kel.3	-.0276600	.0324957	.403	-.094728	.039408
	kel.4	.0088400	.0324957	.788	-.058228	.075908
	kel.5	-.0050800	.0324957	.877	-.072148	.061988
kel.3	kontrol	-.3336800	.0324957	.000	-.400748	-.266612
	kel.1	.0282000	.0324957	.394	-.038868	.095268
	kel.2	.0276600	.0324957	.403	-.039408	.094728
	kel.4	.0365000	.0324957	.272	-.030568	.103568
	kel.5	.0225800	.0324957	.494	-.044488	.089648
kel.4	kontrol	-.3701800	.0324957	.000	-.437248	-.303112
	kel.1	-.0083000	.0324957	.801	-.075368	.058768
	kel.2	-.0088400	.0324957	.788	-.075908	.058228
	kel.3	-.0365000	.0324957	.272	-.103568	.030568
	kel.5	-.0139200	.0324957	.672	-.080988	.053148
kel.5	kontrol	-.3562600	.0324957	.000	-.423328	-.289192
	kel.1	.0056200	.0324957	.864	-.061448	.072688
	kel.2	.0050800	.0324957	.877	-.061988	.072148
	kel.3	-.0225800	.0324957	.494	-.089648	.044488
	kel.4	.0139200	.0324957	.672	-.053148	.080988

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

ONEWAY Katalasedrh BY sampel
/STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY
/MISSING ANALYSIS
/POSTHOC=LSD ALPHA(0.05) .

Descriptives

Katalase darah U/mg protein

	Minimum	Maximum
kontrol	.0000	.0069
kel.1	.0014	.0038
kel.2	.0014	.0097
kel.3	.0020	.0095
kel.4	.0040	.0095
kel.5	.0042	.0097
Total	.0000	.0097

Test of Homogeneity of Variances

Katalase darah U/mg protein

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.297	5	24	.298

ANOVA

Katalase darah U/mg protein

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	5	.000	2.872	.036
Within Groups	.000	24	.000		
Total	.000	29			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons
Katalase darah U/mg protein
LSD

(I) sampel	(J) sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	kel.1	.0001600	.0016555	.924	-.003257	.003577
	kel.2	-.0010400	.0016555	.536	-.004457	.002377
	kel.3	-.0025800	.0016555	.132	-.005997	.000837
	kel.4	-.0036400	.0016555	.038	-.007057	-.000223
	kel.5	-.0046600	.0016555	.010	-.008077	-.001243
kel.1	kontrol	-.0001600	.0016555	.924	-.003577	.003257
	kel.2	-.0012000	.0016555	.476	-.004617	.002217
	kel.3	-.0027400	.0016555	.111	-.006157	.000677
	kel.4	-.0038000	.0016555	.031	-.007217	-.000383
	kel.5	-.0048200	.0016555	.008	-.008237	-.001403
kel.2	kontrol	.0010400	.0016555	.536	-.002377	.004457
	kel.1	.0012000	.0016555	.476	-.002217	.004617
	kel.3	-.0015400	.0016555	.362	-.004957	.001877
	kel.4	-.0026000	.0016555	.129	-.006017	.000817
	kel.5	-.0036200	.0016555	.039	-.007037	-.000203
kel.3	kontrol	.0025800	.0016555	.132	-.000837	.005997
	kel.1	.0027400	.0016555	.111	-.000677	.006157
	kel.2	.0015400	.0016555	.362	-.001877	.004957
	kel.4	-.0010600	.0016555	.528	-.004477	.002357
	kel.5	-.0020800	.0016555	.221	-.005497	.001337
kel.4	kontrol	.0036400	.0016555	.038	.000223	.007057
	kel.1	.0038000	.0016555	.031	.000383	.007217
	kel.2	.0026000	.0016555	.129	-.000817	.006017
	kel.3	.0010600	.0016555	.528	-.002357	.004477
	kel.5	-.0010200	.0016555	.544	-.004437	.002397
kel.5	kontrol	.0046600	.0016555	.010	.001243	.008077
	kel.1	.0048200	.0016555	.008	.001403	.008237
	kel.2	.0036200	.0016555	.039	.000203	.007037
	kel.3	.0020800	.0016555	.221	-.001337	.005497
	kel.4	.0010200	.0016555	.544	-.002397	.004437

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

```

ONEWAY MDaplasma BY sampel
/STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY
/MISSING ANALYSIS
/POSTHOC=LSD ALPHA(0.05).

```

Descriptives

MDA plasma nmol/ml

	Minimum	Maximum
kontrol	1.1429	9.9592
kel.1	4.3673	6.4082
kel.2	6.2857	11.0204
kel.3	3.8776	9.7551
kel.4	2.6531	8.8980
kel.5	1.7551	8.6939
Total	1.1429	11.0204

Test of Homogeneity of Variances

MDA plasma nmol/ml

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.995	5	24	.031

ANOVA

MDA plasma nmol/ml

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	51.224	5	10.245	1.577	.205
Within Groups	155.934	24	6.497		
Total	207.158	29			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

MDA plasma nmol/ml
LSD

(I) sampel	(J) sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	kel.1	-.9551000	1.6121126	.559	-4.282337	2.372137
	kel.2	-4.3020200*	1.6121126	.013	-7.629257	-.974783
	kel.3	-1.9102200	1.6121126	.248	-5.237457	1.417017
	kel.4	-1.7306200	1.6121126	.294	-5.057857	1.596617
	kel.5	-1.6415800	1.6121126	.319	-4.968817	1.685657
kel.1	kontrol	.9551000	1.6121126	.559	-2.372137	4.282337
	kel.2	-3.3469200*	1.6121126	.049	-6.674157	-.019683
	kel.3	-.9551200	1.6121126	.559	-4.282357	2.372117
	kel.4	-.7755200	1.6121126	.635	-4.102757	2.551717
	kel.5	-.6864800	1.6121126	.674	-4.013717	2.640757
kel.2	kontrol	4.3020200	1.6121126	.013	.974783	7.629257
	kel.1	3.3469200*	1.6121126	.049	.019683	6.674157
	kel.3	2.3918000	1.6121126	.151	-.935437	5.719037
	kel.4	2.5714000	1.6121126	.124	-.755837	5.898637
	kel.5	2.6604400	1.6121126	.112	-.666797	5.987677
kel.3	kontrol	1.9102200	1.6121126	.248	-1.417017	5.237457
	kel.1	.9551200	1.6121126	.559	-2.372117	4.282357
	kel.2	-2.3918000	1.6121126	.151	-5.719037	.935437
	kel.4	.1796000	1.6121126	.912	-3.147637	3.506837
	kel.5	.2686400	1.6121126	.869	-3.058597	3.595877
kel.4	kontrol	1.7306200	1.6121126	.294	-1.596617	5.057857
	kel.1	.7755200	1.6121126	.635	-2.551717	4.102757
	kel.2	-2.5714000	1.6121126	.124	-5.898637	.755837
	kel.3	-.1796000	1.6121126	.912	-3.506837	3.147637
	kel.5	.0890400	1.6121126	.956	-3.238197	3.416277
kel.5	kontrol	1.6415800	1.6121126	.319	-1.685657	4.968817
	kel.1	.6864800	1.6121126	.674	-2.640757	4.013717
	kel.2	-2.6604400	1.6121126	.112	-5.987677	.666797
	kel.3	-.2686400	1.6121126	.869	-3.595877	3.058597
	kel.4	-.0890400	1.6121126	.956	-3.416277	3.238197

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

```

ONEWAY ASPlasma BY sampel
/STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY
/MISSING ANALYSIS
/POSTHOC=LSD ALPHA(0.05) .

```

Descriptives

Sialat Plasma ug/ml

	Minimum	Maximum
kontrol	389.6552	446.5172
kel.1	431.0714	584.6429
kel.2	438.2143	580.1786
kel.3	472.1429	592.6786
kel.4	338.2143	774.8214
kel.5	454.2857	665.0000
Total	338.2143	774.8214

Test of Homogeneity of Variances

Sialat Plasma ug/ml

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.284	5	24	.006

ANOVA

Sialat Plasma ug/ml

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	45236.880	5	9047.376	1.165	.355
Within Groups	186429.617	24	7767.901		
Total	231666.497	29			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Sialat Plasma ug/ml
LSD

(I) sampel	(J) sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	kel.1	-94.6447800	55.7419078	.102	-209.690423	20.400863
	kel.2	-96.0733600	55.7419078	.098	-211.119003	18.972283
	kel.3	-97.1447800	55.7419078	.094	-212.190423	17.900863
	kel.4	-105.3590400	55.7419078	.071	-220.404683	9.686603
	kel.5	-117.3233400	55.7419078	.046	-232.368983	-2.277697
kel.1	kontrol	94.6447800	55.7419078	.102	-20.400863	209.690423
	kel.2	-1.4285800	55.7419078	.980	-116.474223	113.617063
	kel.3	-2.5000000	55.7419078	.965	-117.545643	112.545643
	kel.4	-10.7142600	55.7419078	.849	-125.759903	104.331383
	kel.5	-22.6785600	55.7419078	.688	-137.724203	92.367083
kel.2	kontrol	96.0733600	55.7419078	.098	-18.972283	211.119003
	kel.1	1.4285800	55.7419078	.980	-113.617063	116.474223
	kel.3	-1.0714200	55.7419078	.985	-116.117063	113.974223
	kel.4	-9.2856800	55.7419078	.869	-124.331323	105.759963
	kel.5	-21.2499800	55.7419078	.706	-136.295623	93.795663
kel.3	kontrol	97.1447800	55.7419078	.094	-17.900863	212.190423
	kel.1	2.5000000	55.7419078	.965	-112.545643	117.545643
	kel.2	1.0714200	55.7419078	.985	-113.974223	116.117063
	kel.4	-8.2142600	55.7419078	.884	-123.259903	106.831383
	kel.5	-20.1785600	55.7419078	.721	-135.224203	94.867083
kel.4	kontrol	105.3590400	55.7419078	.071	-9.686603	220.404683
	kel.1	10.7142600	55.7419078	.849	-104.331383	125.759903
	kel.2	9.2856800	55.7419078	.869	-105.759963	124.331323
	kel.3	8.2142600	55.7419078	.884	-106.831383	123.259903
	kel.5	-11.9643000	55.7419078	.832	-127.009943	103.081343
kel.5	kontrol	117.3233400	55.7419078	.046	2.277697	232.368983
	kel.1	22.6785600	55.7419078	.688	-92.367083	137.724203
	kel.2	21.2499800	55.7419078	.706	-93.795663	136.295623
	kel.3	20.1785600	55.7419078	.721	-94.867083	135.224203
	kel.4	11.9643000	55.7419078	.832	-103.081343	127.009943

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

REGRESSION

/MISSING LISTWISE

/STATISTICS COEFF OUTS CI(95) R ANOVA CHANGE

/CRITERIA=PIN(.05) POUT(.10)

/NOORIGIN

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.342 ^a	.117	.086	.1372145

a. Predictors: (Constant), Katalase darah U/mg protein

Model Summary

Model	Change Statistics				
	R Square Change	F Change	df1	df2	Sig. F Change
1	.117	3.720	1	28	.064

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.070	1	.070	3.720	.064 ^a
	Residual	.527	28	.019		
	Total	.597	29			

a. Predictors: (Constant), Katalase darah U/mg protein

b. Dependent Variable: MnSOD darah U/mg protein

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients
		B	Std. Error	Beta
1	(Constant)	.213	.046	
	Katalase darah U/mg protein	-16.323	8.464	-.342

a. Dependent Variable: MnSOD darah U/mg protein

Coefficients^a

Model		t	Sig.	95.0% Confidence Interval for B	
				Lower Bound	Upper Bound
1	(Constant)	4.585	.000	.118	.308
	Katalase darah U/mg protein	-1.929	.064	-33.661	1.014

a. Dependent Variable: MnSOD darah U/mg protein

REGRESSION

/MISSING LISTWISE

/STATISTICS COEFF OUTS CI(95) R ANOVA CHANGE

/CRITERIA=PIN(.05) POUT(.10)

/NOORIGIN

/DEPENDENT MnSODdrh

/METHOD=ENTER MDAprasma.

Regression

Notes

Output Created	22-Jun-2010 11:30:33	
Comments		
Input	Data	C:\Users\ayfu\Documents\jaringan.sav26 mei.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	30
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics are based on cases with no missing values for any variable used.
Syntax	<pre>REGRESSION /MISSING LISTWISE /STATISTICS COEFF OUTS CI(95) R ANOVA CHANGE /CRITERIA=PIN(.05) POUT(.10) /NOORIGIN /DEPENDENT MnSODdrh /METHOD=ENTER MDAPlasma.</pre>	
Resources	Processor Time	00:00:00.140
	Elapsed Time	00:00:00.141
	Memory Required	1580 bytes
	Additional Memory Required for Residual Plots	0 bytes

[DataSet1] C:\Users\ayfu\Documents\jaringan.sav26 mei.sav

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	MDA plasma nmol/ml ^a		Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: MnSOD darah U/mg protein

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.322 ^a	.104	.072	.1382731

a. Predictors: (Constant), MDA plasma nmol/ml

Model Summary

Model	Change Statistics				
	R Square Change	F Change	df1	df2	Sig. F Change
1	.104	3.236	1	28	.083

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.062	1	.062	3.236	.083 ^a
	Residual	.535	28	.019		
	Total	.597	29			

a. Predictors: (Constant), MDA plasma nmol/ml

b. Dependent Variable: MnSOD darah U/mg protein

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	.245	.065		3.783	.001
	MDA plasma nmol/ml	-.017	.010	-.322	-1.799	.083

a. Dependent Variable: MnSOD darah U/mg protein

Coefficients^a

Model		95.0% Confidence Interval for B	
		Lower Bound	Upper Bound
1	(Constant)	.112	.377
	MDA plasma nmol/ml	-.037	.002

a. Dependent Variable: MnSOD darah U/mg protein

REGRESSION

/MISSING LISTWISE

/STATISTICS COEFF OUTS CI(95) R ANOVA CHANGE

/CRITERIA=PIN(.05) POUT(.10)

/NOORIGIN

/DEPENDENT MnSODdrh

/METHOD=ENTER ASPlasma.

Regression

Notes

Output Created	22-Jun-2010 11:30:47	
Comments		
Input	Data	C:\Users\ayfu\Documents\jaringan.sav26 mei.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	30
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics are based on cases with no missing values for any variable used.
Syntax	<pre>REGRESSION /MISSING LISTWISE /STATISTICS COEFF OUTS CI(95) R ANOVA CHANGE /CRITERIA=PIN(.05) POUT(.10) /NOORIGIN /DEPENDENT MnSODdrh /METHOD=ENTER ASPlasma.</pre>	
Resources	Processor Time	00:00:00.078
	Elapsed Time	00:00:00.125
	Memory Required	1580 bytes
	Additional Memory Required for Residual Plots	0 bytes

[DataSet1] C:\Users\ayfu\Documents\jaringan.sav26 mei.sav

Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Sialat Plasma ug/ml ^a	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: MnSOD darah U/mg protein

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.396 ^a	.157	.127	.1341089

a. Predictors: (Constant), Sialat Plasma ug/ml

Model Summary

Model	Change Statistics				
	R Square Change	F Change	df1	df2	Sig. F Change
1	.157	5.206	1	28	.030

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.094	1	.094	5.206	.030 ^a
	Residual	.504	28	.018		
	Total	.597	29			

a. Predictors: (Constant), Sialat Plasma ug/ml

b. Dependent Variable: MnSOD darah U/mg protein

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	.454	.141		3.225	.003
	Sialat Plasma ug/ml	-.001	.000	-.396	-2.282	.030

a. Dependent Variable: MnSOD darah U/mg protein

Coefficients^a

Model		95.0% Confidence Interval for B	
		Lower Bound	Upper Bound
1	(Constant)	.165	.742
	Sialat Plasma ug/ml	-.001	.000

a. Dependent Variable: MnSOD darah U/mg protein

REGRESSION

```

/MISSING LISTWISE
/STATISTICS COBPF OUTS CI(95) R ANOVA CHANGE
/CRITERIA=PIN(.05) POUT(.10)
/NOORIGIN
/DEPENDENT MnSODdrh
/METHOD=ENTER MnSODjar.

```

* Chart Builder.

GGRAPH

```

/GRAPHDATASET NAME="graphdataset" VARIABLES=sampel MEAN(MnSODjar) MEAN(MnSODdrh) MISSING=LISTWISE REPORTMISSING=NO
TRANSFORM=VARSTOCASES(SUMMARY="#SUMMARY" INDEX="#INDEX")
/GRAPHSPEC SOURCE=INLINE.
BEGIN GPL

```


Hubungan Jaringan dan darah

Test of Homogeneity of Variances	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
As. Sialat (Ug/mg jar.)	4.250	5	24	.007
As._Sialat_Ug/mL	2.146	5	24	.094

ANOVA		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
As. Sialat (Ug/mg jar.)	Between Groups	1.003	5	.201	13.643	.000
	Within Groups	.353	24	.015		
	Total	1.357	29			
As._Sialat_Ug/mL	Between Groups	103788.057	5	20757.611	1.998	.115
	Within Groups	249369.181	24	10390.383		
	Total	353157.238	29			

Test of Homogeneity of Variances	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
MDA (nmol/mg jar)	9.276	5	24	.000
MDA__nmol/mL	2.996	5	24	.031

ANOVA		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
MDA (nmol/mg jar)	Between Groups	.025	5	.005	4.329	.006
	Within Groups	.027	24	.001		
	Total	.052	29			
MDA__nmol/mL	Between Groups	51.224	5	10.245	1.577	.205
	Within Groups	155.942	24	6.498		
	Total	207.167	29			

Test of Homogeneity of Variances	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Cat (U/mg protein)	4.490	5	24	.005
Cat_Umg_protein	1.297	5	24	.298

ANOVA		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Cat (U/mg protein)	Between Groups	.002	5	.000	2.555	.055
	Within Groups	.004	24	.000		
	Total	.006	29			
Cat_Umg_protein	Between Groups	.000	5	.000	2.872	.036
	Within Groups	.000	24	.000		
	Total	.000	29			

Test of Homogeneity of Variances	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
MnSOD (U/mg protein)	4.363	5	24	.006
MnSOD_Umg_protein	3.287	5	24	.021

ANOVA		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
MnSOD (U/mg protein)	Between Groups	.356	5	.071	6.602	.001
	Within Groups	.259	24	.011		
	Total	.616	29			
MnSOD_Umg_protein	Between Groups	.534	5	.107	40.444	.000
	Within Groups	.063	24	.003		
	Total	.597	29			



DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Nama lengkap : Khairun Nida

NPM : 0706170740

Tempat, tanggal lahir : Tangerang, 10 Juni 1969

Alamat : Jl. H. Usman no.13 RT 005/06 Rempoa Ciputat 15412

Riwayat pendidikan :

1994 – 1995 : Program profesi apoteker Jurusan Farmasi FMIPA-UI

1987 -1994 : S1 Farmasi FMIPA-UI

1984 -1987 : SMAN 6 Jakarta

1981 -1984 : SMPN 19 Jakarta

1975 – 1981 : SDN 1 Ciputat, Tangerang

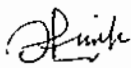
Riwayat pekerjaan :

1995–sekarang: Apoteker Pengelola Apotek

2000-sekarang: Dosen Politeknik Kesehatan Jakarta II

Penelitian Risbinakes : Uji komparasi aktivitas diuretik jamu “X” yang mengandung mahkota dewa dan sidaguri dengan furosemid pada mencit jantan Swiss Webster.

Sumber dana penelitian: Hibah Bersaing


(Khairun Nida)

Universitas Indonesia

STRES OKSIDATIF PADA KARSINOGENESIS PAYUDARA TIKUS YANG DIINDUKSI DENGAN DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene)

Khairun Nida

Abstrak

Tujuan: menganalisis parameter-parameter stres oksidatif pada karsinogenesis payudara tikus yang diinduksi DMBA. **Disain:** penelitian eksperimental in vivo dengan menggunakan hewan coba **Metode:** Sampel penelitian ini adalah darah dan jaringan payudara tikus betina Sprague Dawley (*Rattus norvegicus L.*), yang diinduksi dengan 20 mg/kg BB DMBA dalam minyak jagung sebanyak 2, 4, 6, 8 dan 10 kali serta kelompok kontrol yang hanya diberikan minyak jagung secara oral. Dari sampel darah dan jaringan payudara diukur aktivitas MnSOD dengan kit RanSOD[®], enzim katalase, dan kadar MDA.

Hasil: Penurunan aktivitas spesifik enzim MnSOD pada darah secara bermakna, peningkatan yang tidak bermakna pada jaringan kemudian menurun bermakna, dan ada hubungan positif lemah antara aktivitas MnSOD di darah dan jaringan. Aktivitas enzim katalase plasma turun kemudian meningkat secara bermakna, dan menurun secara bermakna pada jaringan. Kadar MDA plasma darah mula-mula meningkat kemudian turun, pada jaringan payudara meningkat secara bermakna pada semua kelompok perlakuan.

Kesimpulan: Aktivitas spesifik enzim MnSOD pada karsinogenesis kimia payudara tikus yang diinduksi dengan DMBA menurun bermakna pada darah dan jaringan. Ada hubungan antara aktivitas spesifik enzim MnSOD di darah dan jaringan dengan kadar MDA dan aktivitas katalase.

Kata kunci: karsinogenesis kimia, stres oksidatif

Latar Belakang

Karsinogenesis adalah proses transformasi sel normal menjadi ganas. Karsinogenesis merupakan proses yang kompleks dan bertingkat, dimulai dari terbentuknya suatu populasi sel yang abnormal, kemudian abnormalitas ini meningkat akibat serangkaian mutasi dan perubahan pola ekspresi gen. Proses transformasi sel hingga menjadi ganas membutuhkan waktu yang lama. Karsinogenesis dapat diinisiasi oleh karsinogen kimia, (zat kimia lingkungan, makanan dan lain-lain), fisik (radiasi uv, sinar X dan lain-lain) atau biologis (virus) yang menyebabkan kerusakan DNA hingga terjadi mutasi. Sel-sel yang telah terinisiasi kemudian berkembang menjadi sel kanker melalui tahap promosi dan progresi yaitu proliferasi, infiltrasi dan metastasis.¹⁻⁵

Karsinogenesis kimia diawali oleh stres oksidatif dan dapat dicegah secara dini oleh antioksidan. Stres oksidatif adalah ketidakseimbangan antara radikal bebas (prooksidan) dan antioksidan yang dipicu oleh adanya dua kondisi umum yaitu kurangnya antioksidan serta kelebihan produksi radikal bebas. Stres oksidatif membawa kepada kerusakan oksidatif mulai dari tingkat sel,

jaringan hingga ke organ tubuh, menyebabkan terjadinya percepatan proses penuaan dan munculnya penyakit. Berbagai penyakit yang telah diteliti dan diduga kuat berkaitan dengan aktivitas radikal bebas mencakup lebih dari 50, diantaranya adalah kanker. Kanker dan tumor banyak disepakati para ilmuwan sebagai penyakit yang berawal dari mutasi gen atau DNA sel. Radikal bebas oksigen atau sering juga disebut ROS (*Reactive Oxygen Species*) dan reaksi oksidasi berantai yang dihasilkan jelas berperan pada proses mutasi ini.^{3,5}

ROS dibentuk sebagai hasil samping metabolisme seluler aerobik dan produksinya diamplifikasi oleh beberapa kondisi stres, kadar ROS yang tinggi dapat merusak sel. ROS meliputi radikal superoksida, hidroksil, peroksil, dan molekul hydrogen peroksida (H₂O₂). ROS dapat memodifikasi protein seluler, lipid dan DNA sehingga mengubah fungsi sel. Beberapa penelitian melaporkan bahwa ROS dalam kadar tinggi adalah kunci utama dalam mekanisme inisiasi dan progresi penyakit seperti karsinogenesis.^{3,5}

Enzim antioksidan utama yang menetralkan ROS adalah superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT) dan glutathion peroksidase

(GPx). SOD mengkatalisis dismutase superoksida menjadi H_2O_2 dan oksigen, sedangkan CAT dan GPx menetralkan H_2O_2 . Mitokondria mengkonsumsi lebih dari 95% oksigen sel sehingga rantai transport oksigen mitokondria diyakini sebagai sumber utama pembentukan ROS endogen.³

MnSOD memiliki beberapa kelebihan yang membuatnya lebih cocok untuk penggunaan medis, misalnya karena MnSOD tidak dihambat oleh hidrogen peroksida dan memiliki waktu paruh 5-6 jam. Waktu paruh ini jauh lebih besar dari waktu paruh Cu/ZnSOD yang hanya 6-10 menit. MnSOD menetralkan anion superoksida yang sangat reaktif melalui dua langkah reaksi dismutase, dimana Mn^{3+} direduksi lalu direoksidasi.⁶

Karsinogenesis kimia merupakan model yang paling erat hubungannya dengan peran enzim-enzim antioksidan. Karsinogen kimia dianggap agen terbesar dalam terjadinya kanker dan memiliki struktur yang beragam dengan karakter reaktifitas elektofilik yang beragam pula. Secara umum karsinogen kimia dibagi menjadi dua golongan besar yaitu karsinogen kimia yang bekerja langsung, merupakan senyawa yang sangat elektrofil sehingga dapat langsung bereaksi dengan molekul sel yang bermuatan negatif dan yang tidak langsung, yaitu senyawa yang mengalami metabolisme sebelum bereaksi dengan molekul sel.

DMBA (7,12 dimethylbenz-(a)anthracene) telah banyak digunakan terutama sebagai induktor kanker payudara dan kulit. DMBA dapat menyebabkan karsinogenesis dengan cara tidak langsung. Yaitu melalui bioaktivasi dalam sitokrom P450 membentuk DMBA-5,6-dihidrodiol dan 7,12-epoxid yang akan bereaksi dengan DNA membentuk *adduct*, menyebabkan inisiasi tumor. Mekanisme lain dengan mengaktifkan metabolit rantai alkil samping membentuk turunan hidroksi metil, diikuti dengan katalisis sulfontransferase yang akan mengaktifkan DMBA untuk membentuk ester asam sulfat yang elektrofilik dan mengikat DNA.^{3,6-10}

Data penelitian yang ada mengenai aktivitas enzim antioksidan pada sel kanker sudah banyak diteliti. Sebagian besar penelitian mengenai enzim antioksidan adalah pada sel kanker dan belum ada penelitian mengenai peran MnSOD pada proses karsinogenesis kimia mulai

dari induksi hingga terjadinya kanker. Karsinogenesis pada penelitian ini akan diinduksi dengan pemberian zat kimia DMBA (7,12-Dimetil benz(a)antrasen).

Parameter stres oksidatif yang diuji adalah kadar MDA (malondialdehid) dan senyawa karbonil yang mencerminkan tingkat peroksidasi lipid dan kerusakan protein serta aktivitas spesifik enzim katalase sebagai salah satu enzim antioksidan penetral ROS.^{3,11} Sampel diambil dari jaringan payudara dan plasma karena payudara merupakan target utama DMBA dan proses kerusakan yang berlangsung di jaringan lain akan tercermin di dalam plasma.

1.2. Rumusan Masalah dan Pertanyaan Penelitian

Hingga saat ini belum ada penelitian mengenai peran antioksidan proses karsinogenesis kimia yang diinduksi dengan DMBA sehingga timbul pertanyaan penelitian sebagai berikut:

- Bagaimanakah aktivitas spesifik enzim katalase pada karsinogenesis payudara tikus yang diinduksi dengan DMBA?
- Bagaimanakah kadar malondialdehid dan senyawa karbonil pada karsinogenesis payudara tikus yang diinduksi DMBA?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk menganalisis sejauh mana peran enzim antioksidan endogen terutama katalase pada karsinogenesis kanker payudara tikus yang diinduksi dengan DMBA.

1.3.2. Tujuan Khusus

Ada beberapa tujuan khusus penelitian ini, yaitu:

- Menginduksi tumor payudara tikus dengan karsinogen kimia DMBA
- Menganalisis kadar senyawa karbonil dan MDA selama karsinogenesis kimia sebagai tanda kerusakan oksidatif
- Menganalisis aktivitas spesifik enzim katalase selama karsinogenesis.
- Menganalisis hubungan aktivitas spesifik enzim katalase dengan kadar

MDA sebagai tanda terjadinya kerusakan oksidatif

1.4. Manfaat Penelitian

Mengetahui peran enzim pada karsinogenesis kimia sehingga dapat menjadi pertimbangan penatalaksanaan pencegahan dini karsinogenesis terutama yang diinduksi oleh bahan-bahan kimia serta intervensi karsinogenesis baik pada tahap inisiasi dan promosi maupun pada tahap progresi yang lebih lanjut, misalnya pada manajemen terapi kanker dengan pemberian terapi gen disamping terapi konvensional lainnya seperti pembedahan, radioterapi dan kemoterapi.

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan dan Disain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan hewan coba berupa tikus betina strain Sprague Dawley.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian:

Penelitian ini dilakukan di Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Penelitian dilakukan selama 18 (delapan belas) bulan sejak bulan April 2008 s/d bulan Oktober 2009.

3.3. Populasi dan Sampel

Populasi adalah tikus betina Sprague Dawley betina (*Rattus norvegicus L*) berusia 5-7 minggu dengan berat antara 100-200 gram yang diperoleh dari Laboratorium Badan Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta. Sampel adalah plasma darah dan jaringan payudara tikus populasi yang telah diinduksi dengan DMBA dengan dosis dan kurun waktu yang tertentu. DMBA diperoleh dari LABTIAP, Serpong.

3.4. Jumlah Sampel

Untuk menentukan jumlah ulangan pada masing-masing kelompok digunakan Rumus Federer:²⁶

$$(t-1)(n-1) \geq 15, \text{ dimana}$$

t = jumlah kelompok perlakuan dimana dalam penelitian ini ada 6 kelompok.

n = jumlah ulangan pada masing-masing kelompok

Bila $t=6$, maka jumlah ulangan masing-masing kelompok adalah: $n \geq 4$ atau $n=5$. Jadi dalam penelitian ini digunakan 30 ekor tikus *Sprague Dawley* betina yang terbagi dalam 6 kelompok (masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor), yaitu: Kelompok kontrol : tikus yang hanya diberi minyak jagung

Kelompok 1: diinduksi DMBA 2 x 20 mg/kg BB selama 1 minggu.

Kelompok 2 : diinduksi DMBA 4 x 20 mg/kg BB selama 2 minggu.

Kelompok 3 : diinduksi DMBA 6 x 20 mg/kg BB selama 3 minggu.

Kelompok 4 : diinduksi DMBA 8 x 20 mg/kg BB selama 4 minggu.

Kelompok 5 : diinduksi DMBA 10 x 20 mg/kg BB selama 5 minggu.

3.5. Bahan dan Cara Kerja

3.5.1. Aklimatisasi dan Pemeliharaan Hewan Coba

Aklimatisasi hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus L.*) betina galur *Sprague Dawley* yang berusia 5 minggu dengan berat antara 130-200 g selama 2 pekan untuk adaptasi di *animal house*. Makanan tikus yang diberikan berupa *pellet* yang diperoleh dari PD Kasman, Jakarta dengan komposisi yang sudah diketahui, yaitu serat, protein dan lemak kasar. Pemberian makanan dan minuman kepada binatang percobaan dilakukan secara *ad libitum*, suhu kandang dijaga sekitar 25°C dan ada pertukaran gelap dan terang setiap 12 jam.²⁷

Masing-masing kelompok tikus diletakkan dalam kandang tersendiri dan dijaga sedemikian rupa sehingga tidak saling berinteraksi. Setiap kali akan diinduksi dan setiap pekan setelah induksi terakhir berat badan tikus ditimbang sampai tikus diterminasi.

3.5.2. Induksi kanker payudara dengan DMBA dan pengambilan sampel

Mula-mula tikus ditimbang untuk mengetahui volume larutan DMBA yang akan diberikan. Bahan yang digunakan adalah serbuk DMBA (Merck®) yang dilarutkan dalam minyak jagung. Induksi menggunakan sonde oral, seminggu dua kali dengan dosis 20 mg/kg BB yang dilarutkan dalam minyak jagung (4mg/mL). Tikus dengan berat \pm 200g mendapatkan \pm 1mL. Sonde untuk tikus kontrol dibedakan dengan tikus perlakuan untuk mencegah adanya kontaminasi.

Berat badan tikus ditimbang sebelum, selama dan setelah induksi. Terminasi tikus dilakukan lima pekan setelah induksi. Tiap kelompok tikus ditambah satu ekor kelompok kontrol dimatikan/diterminasi dengan anestesi menggunakan uap eter terlebih dahulu. Mula-mula diambil darahnya lalu diamati nodul yang ada pada payudara. Sebagian lagi disimpan dalam *deep freezer* suhu -80°C untuk pembuatan homogenat jaringan.

3.5.3. Pengukuran Kadar Malondialdehid (MDA)

Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan metode Wills.²⁹ Prinsipnya adalah mereaksikan MDA dengan asam tiobarbiturat sehingga terbentuk senyawa berwarna yang memberikan serapan maksimal pada panjang gelombang 530 nm. Bahan yang digunakan antara lain: plasma darah, supernatan homogenat jaringan payudara, larutan asam trikloroasetat (TCA) 20%, larutan asam tiobarbiturat (TBA) 0,67% dan larutan standar tetraetoksipropan.. Serapan dibaca serapannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 530 nm.

3.5.4. Pengukuran Kadar senyawa karbonil

Teknik pengukuran senyawa karbonil menggunakan metode modifikasi Levine et.al.³⁰ Prinsip pengukuran senyawa karbonil adalah gugus karbonil akan bereaksi dengan senyawa DNPH (dinitrofenil hidrazin) membentuk suatu senyawa berwarna yang dapat diukur serapannya pada panjang gelombang 355-390 nm. Bahan-bahan yang digunakan antara lain larutan 10 mM 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) yang dilarutkan dalam HCl 2,5 M, larutan TCA 20% dan 10%, campuran etanol:etil asetat = 1:1, serta larutan guanidine HCl 6M.

Mula-mula disiapkan dua tabung berisi 100 μL supernatan homogenat jaringan payudara tikus, masing-masing untuk sampel dan

kontrol. Ke dalam tabung sampel dimasukkan 400 μL larutan DNPH, sedangkan ke dalam tabung kontrol dimasukkan HCl 2,5 M dengan jumlah yang sama. Kedua tabung diinkubasi di tempat gelap selama satu jam dan divorteks tiap 15 menit. Kemudian kedua tabung diberi larutan TCA 20% sebanyak 500 μL dan diinkubasi selama 5 menit di dalam es lalu disentrifus pada 10.000 g, 4 C selama 10 menit dan dibuang supernatannya. Kemudian prosedur diulangi dengan pemberian TCA 10% pada tiap tabung tersebut. Endapan yang terbentuk dicuci tiga kali dengan campuran etanol:etil asetat = 1:1, setiap kali sebanyak 500 μL . Kemudian divorteks keras dan ditambahkan larutan guanidine HCl 6M sebanyak 250 μL . Setelah divorteks dan disentrifus, larutannya diukur serapannya pada panjang gelombang 370 nm.

3.5.5. Pengukuran aktivitas spesifik enzim katalase

Pengukuran aktivitas spesifik katalase menggunakan metode Mates et al yang dioptimasi kembali sesuai dengan sampel serta situasi dan kondisi laboratorium yang ada.³¹

Penentuan aktivitas spesifik katalase sampel dihitung berdasarkan penguraian H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 pada panjang gelombang 210 nm. Dekomposisi H_2O_2 diamati secara spektrofotometri berdasarkan penurunan serapan pada panjang gelombang maksimum. Pengukuran aktivitas katalase dilakukan pada pH 7,0 karena suasana yang terlalu asam atau basa dapat menyebabkan hilangnya aktivitas

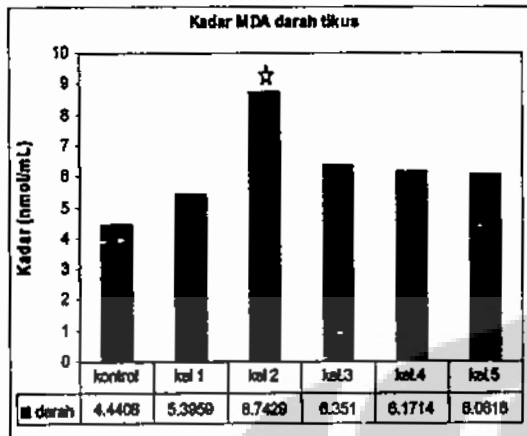
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Depkes RI. No. LB.03.02/KE/4529/08 tertanggal 12 November 2008 (Lampiran 1).

4.1. Induksi karsinogenesis dengan DMBA

Telah dilakukan induksi karsinogenesis payudara tikus Sprague Dawley betina dengan DMBA oral dosis 20 mg/kg BB yang dilarutkan dalam minyak jagung. Hasil penimbangan berat badan sebelum, selama dan setelah induksi disajikan pada lampiran 2 dan 3.

4.2. Kadar MDA tikus yang diinduksi dengan DMBA

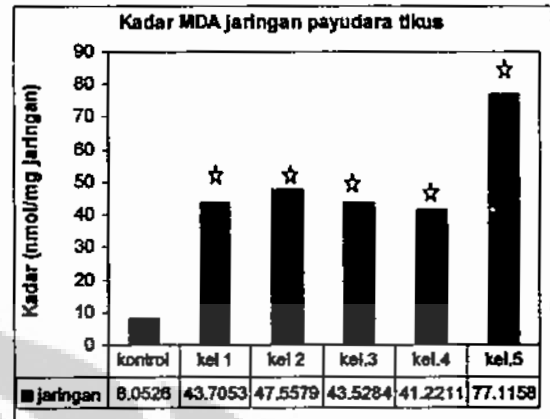


Gambar 4.1. Kadar MDA darah tikus yang diinduksi DMBA

Tanda * menunjukkan hasil yang bermakna secara statistik dibandingkan dengan kelompok kontrol (Uji post hoc, $p < 0.05$)

Pada gambar 4.1 terlihat kadar MDA plasma semua tikus kelompok perlakuan yang diinduksi DMBA meningkat, bahkan pada kelompok 2 peningkatannya mencapai dua kali kadar tikus kontrol dan bermakna secara statistik ($p = 0.013$). Kadar MDA plasma tikus kelompok 3, 4 dan 5 menurun dibandingkan kelompok 1 namun tetap lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini dapat dipahami karena MDA merupakan gambaran dari kerusakan lemak pada membran sel, menunjukkan makin besar dosis DMBA yang diberikan, makin banyak kerusakan membran yang terjadi, sampai pada tahap tertentu dimana kerusakan membran sel tidak lagi dipengaruhi oleh tingkat kerusakan sel karena darah sudah dapat mengantisipasi adanya stres oksidatif yang ditimbulkan.

Hasil yang sama didapat oleh Novrida, Handayani dan Kurniawati yang menginduksi kanker dengan FAA. Keduanya mendapatkan peningkatan kadar MDA plasma tikus yang diinduksi dengan FAA selama dua minggu induksi.^{9,47,48} Namun Ayly (2010, belum dipublikasi) mendapatkan kadar MDA pasien kanker paru menurun dibandingkan kontrol (tidak kanker) dan Ayly memberikan alasan bahwa penderita kanker mengalami kerusakan karena stres oksidatif yang sudah parah sehingga tidak terukur pada kadar MDAny.



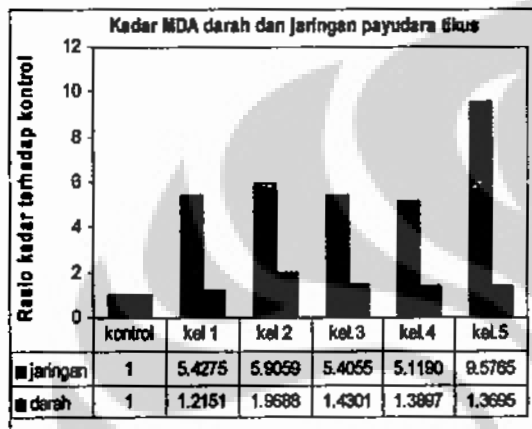
Gambar 4.2. Kadar MDA jaringan tikus yang diinduksi DMBA

Tanda * menunjukkan hasil yang bermakna secara statistik dibandingkan dengan kelompok kontrol (Uji post hoc, $p < 0.05$)

Pada gambar 4.2 terlihat kadar MDA jaringan tikus yang diinduksi DMBA meningkat secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol pada semua kelompok perlakuan. Kadar MDA jaringan tikus kelompok 1 meningkat secara bermakna dibandingkan kelompok kontrol ($p = 0.047$), dari 8.05 nmol/mg pada jaringan kontrol menjadi 43.70 nmol/mg jaringan pada kelompok 1. Kadar MDA tikus yang diinduksi DMBA empat kali (kelompok 2) menurun sedikit dari kelompok 1 namun masih meningkat secara bermakna dibandingkan kontrol ($p = 0.009$). Pada kelompok 3, kadarnya meningkat kembali menjadi menjadi 47,5579 nmol/mg jaringan ($p = 0.009$), sedangkan yang diinduksi delapan kali menurun dibandingkan kelompok 2, meskipun tetap meningkat secara bermakna dibandingkan tikus kontrol ($p = 0.009$). Pada kelompok 5 yang diinduksi DMBA sepuluh kali, kadar MDA meningkat kembali menjadi 77,1158 nmol/mg jaringan. Hal ini dapat dipahami bahwa induksi dengan DMBA dapat menyebabkan kerusakan peroksidasi lipid karena adanya stres oksidatif. Secara statistik, kenaikan kadar MDA di jaringan maupun darah meningkat secara bermakna pada semua kelompok perlakuan. Hasil yang sama diperoleh dari penelitian Kurniawati, Handayani dan Novrida yang menginduksi kanker dengan FAA pada jaringan hati dan

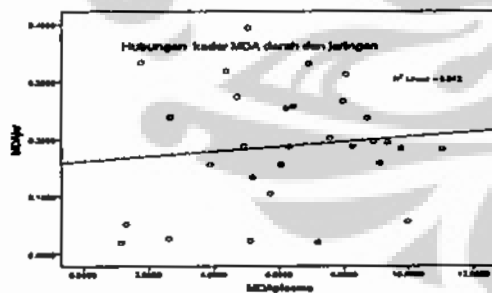
mendapatkan kadar MDA yang meningkat dibandingkan dengan kontrol.^{9,40,43}

Pada gambar 4.3. terlihat bahwa kadar MDA jaringan jauh lebih besar dibanding dalam darah karena kadar dalam darah merupakan efek yang sistemik sehingga sudah ada sistem yang menetralsirkannya. Hasil analisis statistik regresi linier diperoleh nilai $R = 0.146$ (Gambar 4.14) yang berarti ada hubungan yang lemah antara kadar MDA pada jaringan dan plasma yang diinduksi dengan DMBA.



Gambar 4.3. Diagram batang perbandingan kadar MDA plasma darah dan jaringan kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.

Nilai kadar dinormalisasi terhadap kontrol (kontrol = 1).

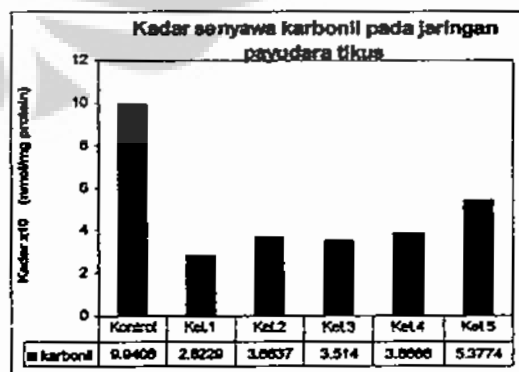


Gambar 4.4. Diagram titik perbandingan kadar MDA plasma darah dan jaringan kelompok kontrol dan perlakuan yang diinduksi DMBA.

Nilai $R = 0.146$, berhubungan positif lemah

4.5 Pemeriksaan kadar senyawa karbonil

Metode yang digunakan untuk mengukur kadar senyawa karbonil adalah metode Levine et.al. yang sudah dimodifikasi sesuai dengan jumlah sampel dan kondisi laboratorium.³¹ Kadar senyawa karbonil kelompok kontrol sebesar $9,63 \times 10^{-5}$ nmol/mg protein, sedangkan kelompok perlakuan memiliki kadar senyawa karbonil antara $2,82 \times 10^{-5}$ sampai $5,38 \times 10^{-5}$ nmol/mg protein (gambar 4.16). Kadar senyawa karbonil pada jaringan payudara semua kelompok perlakuan menurun, meskipun penurunannya tidak bermakna secara statistik. Kelompok perlakuan yang diinduksi dua kali dengan DMBA menurun dari $9,63 \times 10^{-5}$ nmol/mg protein menjadi $2,83 \times 10^{-5}$ nmol/mg protein, namun penurunan ini tidak bermakna secara statistik ($p = 0.096$). Kelompok perlakuan 2 yang diinduksi DMBA empat kali meningkat dibandingkan dengan kelompok 1, namun nilainya tetap jauh lebih rendah dibandingkan kontrol. Meskipun penurunannya juga tidak bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p = 0.306$), maupun terhadap kelompok 1 (0.501). Peningkatan kembali kadar karbonil pada kelompok empat maupun penurunan pada kelompok 5 tidak mengubah kebermaknanya secara statistik, dimana nilai p kelompok 4 dibandingkan kontrol adalah 0.387 dan kontrol dibandingkan dengan kelompok 5 = 0.731. Hal ini menunjukkan bahwa pada penelitian ini kerusakan oksidatif jaringan payudara tidak atau belum menyebabkan kerusakan protein, atau kerusakan protein pada payudara tidak/belum terlihat namun hanya menyebabkan kerusakan lipid karena jaringan payudara sebagian besar terdiri dari lipid. Data mentah hasil pengukuran kadar senyawa karbonil disajikan pada lampiran 10.

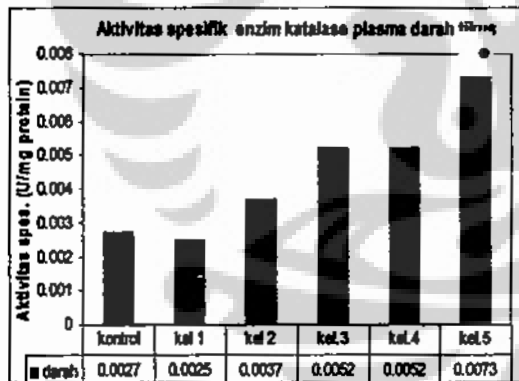


Gambar 4.5. Kadar senyawa karbonil jaringan tikus yang diinduksi DMBA (Uji Anova, $p = 0.338$)

Hasil sebaliknya didapat oleh Novrida dan Handayani yang mendapatkan peningkatan kadar senyawa karbonil pada induksi jaringan payudara tikus yang diinduksi dengan FAA. Ayly juga memperoleh hasil yang menunjukkan bahwa pada pasien kanker paru kadar senyawa karbonilnya meningkat dibandingkan pasien yang tidak kanker karena pada kanker kerusakannya sudah lanjut sehingga kerusakan yang banyak terjadi adalah kerusakan protein.^{9,38}

4.4. Aktivitas spesifik enzim katalase

Aktivitas spesifik katalase darah tikus yang mendapatkan dua kali, empat kali dan enam kali induksi DMBA (kelompok 1, 2 dan 3) meningkat dibanding tikus kontrol namun peningkatannya belum bermakna dibandingkan tikus kontrol ($p > 0,05$). Aktivitas katalase juga meningkat pada kelompok 4 dan 5 yang diinduksi 8x dan 10 x dengan DMBA dan kenaikannya bermakna secara statistik ($p = 0,038$ pada kelompok 4 dan $p = 0.01$ pada kelompok 5). Data kasar pengukuran aktivitas enzim katalase terdapat pada lampiran 12, sedangkan diagram batang aktivitas katalase sampel darah dan jaringan dapat dilihat pada gambar 4.16. dan gambar 4.6.

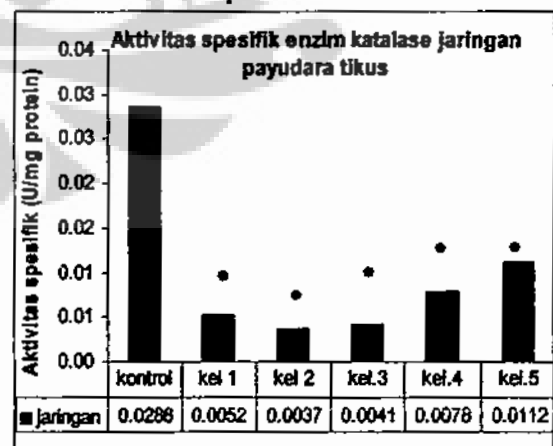


Gambar 4.6. Aktivitas spesifik enzim katalase darah tikus kontrol dan perlakuan pada karsinogenesis kimia yang diinduksi DMBA 20mg/kgBB Tanda * menunjukkan hasil yang bermakna secara statistik dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p < 0.05$)

Aktivitas spesifik enzim katalase pada jaringan payudara tikus yang diinduksi DMBA pada semua kelompok perlakuan menurun dibandingkan dengan kelompok

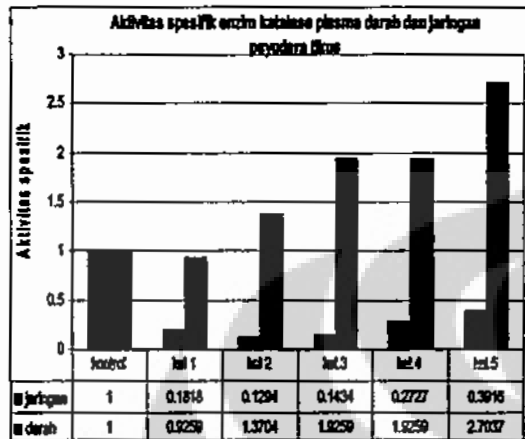
kontrol dan penurunannya bermakna secara statistik ($p < 0.05$, Gambar 4.6). Aktivitas spesifik enzim katalase pada kelompok kontrol sebesar 0.0286 Unit/mg protein, sedangkan kelompok 1, yang diinduksi DMBA 2 kali sebesar 0.0052 Unit /mg protein. Penurunan ini bermakna secara statistik ($p = 0.01$). Kelompok 2 yang diinduksi 4 kali dengan DMBA menurun sedikit menjadi 0,0037 u/mg protein dan naik kembali pada kelompok 3, 4 dan 5. Penurunan aktivitas spesifik katalase kelompok 2 terhadap kelompok kontrol bermakna secara statistik ($p = 0.007$), demikian juga dengan kelompok 3 ($p = 0.007$), kelompok 4 ($p = 0.021$) dan kelompok 5 ($p = 0.049$)

Dari gambar 4.7. dapat dilihat bahwa aktivitas enzim katalase dalam darah mula-mula mengalami penurunan (kelompok 1), kemudian naik sesuai dengan kenaikan jumlah induksi. Hal ini menunjukkan bahwa ada peningkatan radikal bebas dan diatasi dengan antioksidan katalase akibat stres oksidatif yang ditimbulkan oleh induksi dengan DMBA. Pada sampel jaringan terlihat bahwa aktivitas spesifik enzim katalase menurun pada semua kelompok perlakuan, meskipun pada kelompok 4 dan 5 aktivitasnya meningkat dibandingkan kelompok perlakuan lain. Hal ini menunjukkan bahwa ada ada kemungkinan peningkatan kadar peroksida pada stres oksidatif di jaringan payudara diatasi oleh antioksidan lain misalnya enzim glutathion peroksidase (GPx) atau enzim thioredoxin peroksidase (TPx) yang juga bekerja menetralkan radikal peroksida.



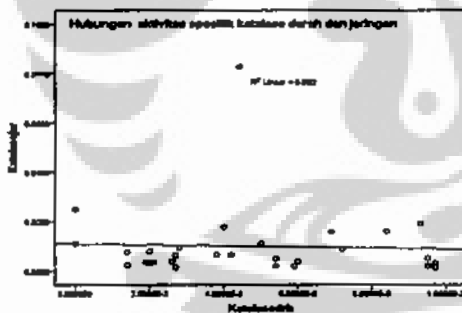
Gambar 4.7. Aktivitas spesifik enzim katalase jaringan tikus kontrol dan

perlakuan pada karsinogenesis kimia yang diinduksi DMBA. Tanda * menunjukkan hasil yang bermakna secara statistik dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p < 0.05$).



Gambar 4.8. Diagram batang perbandingan aktivitas spesifik enzim katalase plasma darah dan jaringan kelompok kontrol dan perlakuan pada karsinogenesis kimia yang diinduksi DMBA.

Nilai kadar dinormalisasi terhadap kontrol (kontrol = 1).



Gambar 4.8. Diagram titik perbandingan aktivitas spesifik enzim katalase plasma darah dan jaringan kelompok kontrol dan perlakuan pada karsinogenesis kimia yang diinduksi DMBA.

Nilai $R = 0.043$, berhubungan negatif lemah

Penelitian Ho, et.al. pada kanker paru manusia yang baru saja meninggal diperoleh hasil yang sama yaitu terjadi penurunan aktivitas katalase pada jaringan kanker dibanding jaringan normal, sedangkan enzim GPx tetap sama pada kanker maupun jaringan normal.⁴⁴ Dari analisis regresi linier diperoleh adanya hubungan antara

aktivitas spesifik enzim katalase pada plasma darah dan jaringan dengan nilai $R = 0.043$ yang berarti bahwa hubungannya negatif lemah.

Dari hasil ini menunjukkan bahwa telah terjadi kerusakan oksidatif PUFA dalam darah akibat induksi karsinogenesis kimia dengan DMBA, namun penanganannya kemungkinan dilakukan antara lain oleh enzim katalase

KESIMPULAN

Penelitian ini menghasilkan aktivitas enzim katalase pada darah kelompok perlakuan mula-mula turun, kemudian meningkat secara bermakna pada induksi lanjut ($p < 0.05$), sedangkan pada jaringan payudara aktivitas spesifik katalase pada kelompok perlakuan menurun secara bermakna ($p < 0.05$). Ada hubungan positif lemah antara aktivitas spesifik katalase di darah dan jaringan ($R = 0.066$). Kadar MDA plasma darah mula-mula meningkat kemudian turun dengan makin banyaknya induksi, sedangkan pada jaringan payudara, meningkat secara bermakna pada semua kelompok perlakuan ($p < 0.05$). Terjadi penurunan kadar senyawa karbonil pada semua kelompok perlakuan di jaringan payudara tikus yang diinduksi DMBA, meskipun tidak bermakna secara statistik ($p = 0.338$).

DAFTAR PUSTAKA

1. Hall, E., Giaccia, A. Radiobiology for radiologist. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006:11-300.
2. Cooper, G.M., Hausman, RE. The Cell A Molecular Approach. 3rd ed. Washington:ASM Press; 2003:631-80.
3. Halliwell, B & Gutteridge, J.C. Free Radicals in biology and medicine. 4th.ed. Oxford: Oxford University Press; 2007.
4. Gold LS et al. Compendium of Chemical carcinogens by Target Organ: Result of Chronic Bioassay in Rats, Mice, Hamsters, Dogs, and Monkeys. Toxicology pathology 2001;29(6):639-52.
5. Okey AB, Harper PA, Grant DM, Hill RP. Chemical and radiation carcinogenesis. In: Tannock IF, Richard PH, Bristow RG, Harrington L (editor). The Basic science of oncology. 4th.ed. The McGraw-Hill Companies; 2005.
6. Moody JD, Fu PP, Freeman JP, Cerniglia CE. Regio and stereoselective metabolism of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene by

- Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. Applied and Environmental Microbiology. 2003;69(7):3924-31
7. Maria Dara Novi H. Kemampuan Minyak buah merah (*Pāndanus conoideus Lamk.*) dalam mencegah stres oksidatif pada tikus yang diinduksi 2-AAF. [tesis]. Universitas Indonesia. Jakarta. 2006.
 8. Underwood JCE. Nucleolar organizer Hakkak R, Holley AW, McLeod SL, Simpson PM, Fuchs GJ, Jo CH, et al. Obesity promotes 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumor development in female Zucker rats. Breast Cancer Research. 2005;7:627-33.
 9. Mathivadhani P, Shanthi P, Sachdanandam P. Hypoxia and its downstream targets in DMBA induced mammary carcinoma: Protective role of *Semecarpus anacardium* nut extract. Chemo-Biological Interaction. 2007;167:31-40
 10. Androutsopoulos VP, Tsatsakis AM, Spandidos DA. Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. BMC Cancer 2009, 9:187
 11. Oberly TD. Oxidative damage and cancer. American Journal of Pathology. 2002;160(2):403-8
 12. Jusman SA. Basic concept of biochemistry in diabetes mellitus. Dalam Understanding ocular diabetics: Basic science, clinical aspects and diabetic course. Department of ophthalmology. University of Indonesia, 2nd continuing ophthalmology education. 1999:1-15
 13. Rozalski R, Gackowski D, Roszkowski L, Foksinski M, Olinski R. The level of 8-hydroxyguanine, a possible repair product of oxidative DNA damage, is higher in urine of cancer patients than in control subjects. Cancer Epid, Biomarkers and Prev. 2002;22:1072-75
 14. Girolami F, Abbadessa G, Racca S, Spaccamiglio A, Piccione F, Dacasto M, et al. Time-dependent acetyl salicylic acid effects on liver CYP1A and antioxidant enzymes in rat model of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary carcinogenesis. 2008;181:87-92.
 15. Sugiyama T, Osaka M, Koami K, Maeda S, Ueda N. 7,12-DMBA-induced rat leukemia: a review with insights into future research. Leukemia research. 2008;26:1053-68.
 16. Guo TL, Chi RP, Hernandez DM, Auttachoat W, Zheng JF. Decrease 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced carcinogenesis coincides with the induction of antitumor immunities in adult female B6C3F1 mice pretreated with genistein. Carcinogenesis. 2007;10.
 17. Androutsopoulos VP, Tsatsakis AM, Spandidos DA. Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. BMC Cancer. 2009;9:187.
 18. Kathila S, Rajapaksa, I, Glenn Sipes and Patricia B. Hoyer. Involvement of Microsomal Epoxide Hydrolase Enzyme in Ovotoxicity Caused by 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene. Toxicological Sciences. 2007;96(2):327-334.
 19. Brown NS, Bicknell R. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer: Oxidative stress: its effect on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. Breast cancer Res. 2000;3:323-7.
 20. James. Catalase-an extraordinary enzyme. [monograph on internet, cited 2003 July]. Diunduh dari <http://www.catalase.com/cataext.htm>.
 21. Mercedes A, Xevi B, Pietro V, Carme R. The molecular mechanism of the catalase reaction. Journal of the American Chemical Society 2009;131(33):11751-61.
 22. Hanafiah KA, Rancangan percobaan: teori dan aplikasi. ed. ke-6. PT Rajagrafindo Persada. Jakarta. 2000.
 23. Wills ED. Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissue. Biochem J. 1986;99:667-76.
 24. Winterbourn CC, Buss IH, Chan TP, Plank LD, Clark MA, Windsor JA. Protein carbonyl measurements show evidence of early oxidative stress in critically ill patients. Critical care magazine. 2000;28(1):143-9.
 25. Hedrich H, Bullock G (editors). The handbook of experimental animals: the laboratory mouse. Academic Press. 2006