

**PENGARUH PEMBERIAN PERASAN SELEDRI
TERHADAP AKTIVITAS PROLIFERASI SEL, INDEKS
APOPTOSIS DAN PERUBAHAN HISTOPATOLOGI
MUKOSA KOLON WISTAR
Kajian Karsinogenesis Kolon**

*(The Effects of Celery Juice on The Cell Proliferative Activity, Apoptotic
Index and The Histopathological Changes of Wistar's Colonic Mucosal
Colon Carcinogenesis Study)*



**Tesis
untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat S-2**

Magister Ilmu Biomedik

**ASWIYANTI ASRI
G4A001009**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
DESEMBER
2004**

TESIS

PENGARUH PEMBERIAN PERASAN SELEDRI TERHADAP AKTIVITAS
PROLIFERASI SEL , INDEKS APOPTOSIS DAN PERUBAHAN
HISTOPATOLOGI MUKOSA KOLON WISTAR

Kajian Karsinogenesis Kolon

*(The Effects of Celery Juice on The Cell Proliferative Activity, Apoptotic Index
and The Histopathological Changes of Wistar's Colonic Mucosal
Colon Carcinogenesis Study)*

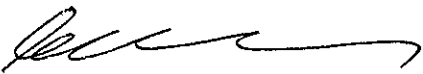
disusun oleh :

ASWIYANTI ASRI
G4A001009

telah dipertahankan di depan Tim Penguji
pada tanggal
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,
Komisi Pembimbing

Pembimbing I :



Prof. Dr. dr. Tjahjono, SpPA, FIAC

Pembimbing II :



Prof. Dr. dr. I. Riwanto, SpB-KBD

Ketua Program Studi
Magister Ilmu Biomedik



Prof. dr. Soebowo, SpPA (K)

IPF-POSTER-UNPAD	
No. Daftar:	3807/T/13/14
Tgl.	17 Juni 15

*Kupersembahkan untuk
keluarga tercinta
dan para guru
yang menjadi pelitaku*

Terima Kasih

Tesis ini telah dipertahankan di hadapan Tim penguji pada tanggal 14 Desember 2004
dan telah dilakukan perbaikan sesuai dengan saran

Tim Penguji

A. Ketua : Prof dr Soebowo,SpPA(K)

B. Anggota :

1. Prof Dr dr Tjahjono,SpPA(K),FIAC
2. Prof Dr dr I.Riwanto,SpB-KBD
3. Prof Dr dr Sarjadi,SpPA(K)
4. dr Parno Widjaja,SpFK
5. drg Henry Setyawan,M.Sc

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa, oleh karena atas berkat dan rahmatNya jumlah, tesis ini dapat selesai dikerjakan.

Penghargaan dan ucapan terima kasih khusus kepada kedua pembimbing Prof.Dr.dr.Tjahjono,SpPA,FIAC dan Prof.Dr.dr.I.Riwanto,SpB-KBD, atas perhatian, bimbingan, arahan dan dorongan, serta waktu yang diberikan kepada Penulis, selama proses persiapan proposal, seminar, pelaksanaan penelitian, sampai dengan akhir penulisan tesis ini.

Penulis mengucapkan terima kasih pada dr. Awal Prasetyo M.Kes yang telah memberikan kesempatan untuk bersama-sama melaksanakan dan mengembangkan penelitian ini, memberikan petunjuk dan bimbingan mulai dari pembuatan proposal, seminar, pelaksanaan penelitian sampai selesainya tesis ini.

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada para penguji dr. Parno Widjaja, SpFK, Prof .Dr. dr, Sarjadi, SpPA(K), drg. Henry Setyawan, M.Sc; para narasumber, dr. Indra Wijaya, SpPA (K) , dr. Soejoto, SpKK, atas pertanyaan, diskusi,kritikan dan saran perbaikan, sehingga tesis ini semakin berbobot.

Ucapan banyak terima kasih Penulis tujukan kepada Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Prof.dr.Soebowo, SpPA(K), Sekretaris Program Studi Magister Ilmu Biomedik dr.Edi Dharmana, PhD, SpParK dan dr Kusmiyati DK,M.Kes atas dorongan semangat, perhatian dan bantuan yang memacu penyelesaian tesis ini.

Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro, dr. Hj.Salmiah Agus,SpPA (Ketua Bagian Patologi Anatomi FK Universitas Andalas), Ketua Bagian Patologi Anatomi dr Kasno, SpPA(K) dan Ketua Program Studi Patologi

Anatomi dr Noor Yazid, SpPA (K), terimakasih atas kesempatan studi dan fasilitas yang diberikan kepada Penulis.

Untuk seluruh staf pengajar dan karyawan di bagian Patologi Anatomi, rekan-rekan residen Patologi Anatomi, staf bagian Biokimia, staf dan pengelola program studi Ilmu Biomedik Undip, terimakasih atas arahan, kepedulian dan kerjasamanya.

Ungkapan terima kasih juga Penulis ucapkan kepada para mahasiswa Lusia, Benita, Fiska, Ika, Meike yang telah bekerja bersama-sama dalam pelaksanaan penelitian. Penelitian ini dapat terlaksana berkat bantuan dana dari Proyek QUE tahun 2003, untuk itu diucapkan terima kasih.

Akhirnya terimakasih kepada suami tercinta Zulheri ,SH.MH , putra putriku Shinta, Welly (alm) dan Hana atas ketabahan, pengertian dan pengorbanan waktu kebersamaan kita. Mama Hj.Marnaini Asri , Papa dr. Asri Todo , SpPA (alm), Unang Alina dan adik-adikku Yayan, Al, Arif, Any, Fit terimakasih atas dukungan dan doanya.

Semoga Allah SWT memberikan rahmat dan hidayahNya, khususnya atas budi baik yang telah diberikan kepada Penulis.

Semarang, Nopember 2004

Penulis

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, Nopember 2004

Aswiyanti Asri

G4A001009

RIWAYAT HIDUP

Nama : dr. Aswiyanti Asri (Wiwik)
Jenis kelamin : perempuan
Tempat/tanggal lahir : Padang/7 Nopember 1969
Kewarganegaraan : Indonesia
Status Perkawinan : menikah dengan Zulheri, SH.MH
Anak : Yashintarry Ashila (9 tahun), Harrisia Welly (alm)
Deanna Hanako Jacinda (17 bulan)
Alamat :
^Kantor : Bagian Patologi Anatomi FK.Unand ,
Jln. Perintis Kemerdekaan Padang, Phone 0751 21176
^ Rumah : Jl Dr Moh Hatta no.59 Padang 25151
Phone 0751 24575 ; HP 081325178261
e-mail : wiwik69az@yahoo.com

Riwayat Pendidikan :

- SD Negeri 19 Padang, lulus tahun 1982
- SMP Negeri 04 Padang, lulus tahun 1985
- SMA Negeri 03 Padang, lulus tahun 1988
- Fak.Kedokteran Universitas Andalas Padang, lulus tahun 1995
- PPDS I PA FK.Undip Semarang dari Juli 2001

Riwayat Pekerjaan :

- Dokter PTT di Puskesmas Kataping Kabupaten Padang Pariaman Sumbar dari 1996-1998
- Staf Pengajar Bagian PA FK.Unand Padang dari 1997-sekarang
- Dokter jaga IGD RS Yos Sudarso Padang dari 1999-2001
- Dokter YKI Wilayah Jawa Tengah dari 2001-sekarang

DAFTAR ISI

Halaman Judul	i
Halaman Persetujuan	ii
Kata Pengantar	iii
Pernyataan	v
Riwayat Hidup	vi
Daftar Isi	vii
Daftar Gambar	ix
Daftar Tabel	x
Daftar Lampiran	xi
Singkatan	xii
Abstrak	xiv
<i>Abstract</i>	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Permasalahan	5
1.3. Tujuan Penelitian	6
1.4. Manfaat Penelitian	6
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Karsinogenesis Kolon	8
2.2. Aktivitas Proliferasi Sel	11
2.3. Hubungan Apoptosis dengan Karsinogenesis Kolon	13
2.4. 1,2 <i>Dimethylhydrazine</i>	14
2.5. Peran Diet Tinggi Lemak dan Tinggi Protein pada Karsinogenesis Kolon	18
2.6. Seledri (<i>Apium graveolens</i>)	20

BAB 3. KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	
3.1. Kerangka Teori	25
3.2. Kerangka Konsep	26
3.3. Hipotesis	27
BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN	
4.1. Rancangan Penelitian	28
4.2. Tempat dan Waktu Penelitian	28
4.3. Jenis dan Besar Sampel	28
4.4. Kriteria Inklusi	29
4.5. Kriteria Eksklusi	29
4.6. Variabel Penelitian	29
4.7. Definisi Operasional	30
4.8. Alat dan Bahan	31
4.9. Cara Kerja	32
4.10. Alur Kerja	36
BAB 5. HASIL PENELITIAN	
5.1. Gambaran Umum	38
5.2. Analisis Statistik	39
BAB 6. PEMBAHASAN	
6.1. Pengaruh Pemberian Seledri terhadap Sel Mukosa Kolon Tikus Wistar	49
6.2. Pengaruh Lama Pemberian Seledri	56
6.3. Keterbatasan dalam Penelitian	57
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN	
Daftar Pustaka	60
Lampiran	72

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. <i>LOH Pathway to Colorectal Carcinoma</i>	10
Gambar 2. Alur Kerja	36
Gambar 3. Perubahan Histopatologis Epitel Mukosa Kolon Tikus Wistar	43
Gambar 4. Indeks Apoptosis Tikus Wistar	45
Gambar 5. Aktivitas Proliferasi Sel (AgNOR)	47

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Skoring Perubahan Histopatologik Epitel Mukosa Kolon	34
Tabel 2. Skoring Perubahan Histopatologis Mukosa Kolon, Indeks Apoptosis dan Hitung AgNOR	40
Tabel 3. Nilai <i>Mean</i> dan <i>Median</i> Perubahan Histopatologis Mukosa Kolon, Indeks Apoptosis dan AgNOR pada tikus Kelompok I,II,III,IV dan V	41

DAFTAR LAMPIRAN

1. Ransum Pakan Tikus AIN 93M
2. Prosesing Jaringan dan Pengecatan
3. Gambaran Mikroskopik Perubahan Histopatologis Mukosa Kolon
4. Gambaran Mikroskopik Apoptosis
5. Gambaran Mikroskopik Hitung AgNOR
6. Analisis Statistik Perubahan Histopatologis
7. Analisis Statistik Indeks Apoptosis
8. Analisis Statistik Hitung AgNOR

SINGKATAN

COX	= <i>cyclooxygenase</i>
DMH	= <i>Dimethylhydrazine</i>
FAP	= <i>familial adenomatous polyposis</i>
DCC	= <i>deleted in colon carcinoma</i>
MSI	= <i>microsatellite instability</i>
RER	= <i>replication error</i>
HNPCC	= <i>hereditary non polyposis colorectal cancer</i>
CIN	= <i>chromosomal instability</i>
LOH	= <i>loss of heterozygosity</i>
AOM	= <i>azoxymethane</i>
PCNA	= <i>proliferating cell nuclear antigen</i>
NORs	= <i>nucleolar organizer regions</i>
DNA	= <i>deoxyribonucleic acid</i>
rDNA	= <i>ribosomal DNA</i>
PCD	= <i>programmed cell death</i>
Bcl-2	= <i>B cell lymphoma</i>
TUNEL	= <i>terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling</i>
HE	= <i>hematoxyllin-eosin</i>
RNA	= <i>ribonucleic acid</i>
MAM	= <i>methylazoxymethanol</i>
O ⁶ -MeG	= <i>O⁶-methylguanine</i>
RAPD	= <i>random amplified polymorphic DNA analysis</i>
ACF	= <i>Aberrant Crypt Foci</i>
SBA	= <i>secondary bile acids</i>

PKC	= <i>protein kinase C</i>
DAG	= <i>diacylglycerol</i>
PG-E ₂	= <i>prostaglandin E-2</i>
TNF- α	= <i>Tumour necrosing factors</i>
IL	= <i>Interleukin</i>
PCR-SSCP	= <i>polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism</i>
ATRA	= <i>all-trans retinoic acid</i>
SCFA	= <i>short chain fatty acids</i>
Gen SRC	= <i>retrovirus-associated DNA sequences</i>
iNOS	= <i>inducible nitric oxide synthase</i>
NO	= <i>nitric oxide</i>
NADPH	= <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced)</i>
PCR	= <i>polymerase chain reaction</i>
NSAIDs	= <i>non steroidal anti-inflammatory drugs</i>
s.c	= <i>sub cutaneous</i>

ABSTRAK

Latar Belakang

Kanker kolorektal ditandai dengan serangkaian perubahan genetik yang disertai perubahan morfologik sel epitel kolon. Model eksperimental karsinogenesis kolon pada tikus dengan menggunakan AOM atau 1,2 DMH secara luas digunakan untuk mempelajari efek variasi diet dan bahan khemopreventif, dimana perubahan yang terjadi mirip dengan *adenoma-carcinoma sequence* pada manusia.

Seledri atau *Apium graveolens* berasal dari Mediterania dimana bijinya banyak dimanfaatkan sebagai obat. Studi eksperimental maupun epidemiologik memperlihatkan bahwa senyawa aktif dalam seledri seperti lutein, 3-n-B, apigenin, sedanolide, terbukti berperan dalam memperlambat atau mencegah karsinogenesis. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa seledri dapat menghambat karsinogenesis kolon yang diinduksi dengan 1,2 DMH dengan dan tanpa diet tinggi lemak dan tinggi protein.

Metode

25 ekor tikus wistar jantan, umur 12 minggu, berat 180–200 gram, sehat, tingkah laku normal diadaptasi terlebih dahulu selama 7 hari, kemudian dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing terdiri atas 5 ekor tikus. Setiap kelompok tersebut diberikan injeksi 1,2 DMH subkutan sekali seminggu dengan dosis 20 mg/kg BB. Seledri dalam bentuk jus diberikan pada kelompok II, IV dan V secara oral, setiap hari dengan dosis 12,096 gr/kg BB, sedangkan untuk kelompok III dan IV juga diberikan diet tinggi lemak dan tinggi protein, *ad libitum*. Perlakuan tersebut diberikan selama 12 minggu untuk kelompok I–IV dan 16 minggu untuk kelompok V.

Setelah masa perlakuan berakhir, tikus diterminasi, usus besar diambil saat laparotomi. Jaringan tersebut kemudian diperiksa apakah ada tumor usus atau bagian yang mencurigakan. Untuk evaluasi histopatologik dan indeks apoptosis, jaringan difiksasi dengan buffer formalin 10%, dijadikan blok parafin, kemudian diwarnai dengan H&E. Aktivitas proliferasi sel dinilai dengan menggunakan pewarnaan argirofilik (AgNOR).

Gambaran histopatologik yang ditemukan dinilai dengan menggunakan skoring perubahan epitel mukosa kolon. Indeks apoptosis dihitung dari setiap 100 sel, menggunakan pembesaran 400 x. Titik–titik AgNOR dihitung dalam inti dari setiap 100 sel, dengan pembesaran tinggi memakai minyak emersi.

Perbedaan perubahan histopatologik epitel mukosa kolon, indeks apoptosis dan AgNOR antara kelompok perlakuan dianalisis dengan *Mann–Whitney U test*, memakai program *SPSS 12.00 for windows*.

Hasil

Evaluasi perubahan histopatologik menunjukkan bahwa tikus yang diinduksi dengan 1,2 DMH saja atau disertai diet tinggi lemak dan protein mempunyai lesi yang lebih berat dibanding kelompok yang diberi seledri, yaitu lesi tingkat ringan, sedang dan berat dengan displasia ringan, sedang dan berat. Rerata tertinggi perubahan histopatologis diperlihatkan oleh kelompok III yaitu $2,70 \pm 0,82$ dan terendah kelompok V ($1,50 \pm 0,54$). Rerata indeks apoptosis tertinggi ditemukan pada kelompok IV ($3,48 \pm 2,61$) dan terendah kelompok I ($0,95 \pm 0,52$). Rerata hitung AgNOR terendah terlihat pada kelompok V ($0,77 \pm 0,16$) dan tertinggi kelompok III ($1,44 \pm 0,40$).

Uji beda dengan *Mann Whitney U test* memberikan hasil yang bermakna antara perbandingan kelompok I dengan II pada ketiga variabel tergantung tersebut. Perbedaan yang signifikan juga dihasilkan dari perbandingan antara kelompok III dan IV, untuk perubahan histopatologik (pertumbuhan epitelium dan displasia sel) dan indeks apoptosis. Sedangkan perbandingan kelompok II dan V hanya bermakna untuk indeks apoptosis.

Kesimpulan

Seledri mampu menghambat perubahan histopatologik epitel mukosa kolon, indeks apoptosis dan aktivitas proliferasi sel (AgNOR) pada tikus yang diinduksi dengan 1,2 DMH.

Seledri secara signifikan dapat menghambat perubahan histopatologik dan meningkatkan apoptosis pada tikus yang diinduksi dengan 1,2 DMH dan diet tinggi lemak dan protein.

Pemberian seledri dalam jangka waktu yang lebih lama secara signifikan dapat meningkatkan indeks apoptosis pada tikus wistar yang diinduksi dengan 1,2 DMH.

Kata Kunci

Karsinogenesis kolon, 1,2 DMH, diet tinggi lemak tinggi protein, seledri, perubahan histopatologik epitel mukosa kolon, indeks apoptosis, hitung AgNOR.

ABSTRACT

Background

Colorectal cancer was characterized by a sequence of molecular genetic alterations and morphological changes of colonic epithelial cell. Colon carcinogenesis induced in rats by AOM or 1,2 DMH was a useful experimental model as it mimics the human adenoma-carcinoma sequence and allows the study of dietary variation and the effects of chemopreventive agents.

Celery or apium graveolens was known as once highly valued medicine. Epidemiologic and experimental studies have shown that celery's active compounds such as lutein, 3-n-B, apigenin, sedanolide were believed to play important role in delaying or preventing carcinogenesis. The aim of this study is to show that celery as a whole agent could prevent colon carcinogenesis of wistar rat which induced by 1,2 DMH with or without high fat high protein diet.

Method

A total 25 male wistar rats, aged 12 weeks were adaptationed for 7 days and then randomly divided to five groups, of 5 animal each. Each group were given s.c injection of 20 mg/kgBW 1,2 DMH once weekly. Groups II, IV and V were given celery as a juice orally, everyday. Groups III and IV were fed high fat high protein diet, ad libitum. Groups I to IV were treated for 12 weeks and group V as long as 16 weeks.

After the times of exposure, all of rats were terminated, large intestine were resected. The organ were opened and examined for intestinal tumours or suspicious part, macroscopically. For histopathological evaluation and apoptosis, one of cut sections were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin blocks, and processed by routine histological procedure with H&E staining. The other sections was stained using the argyrophilic technique described by Ploton to analyses cell proliferative activity.

Histopathological pattern (epithelial cell changes) was count as a scoring. Apoptotic index described as a apoptotic bodies in 100 non apoptotic epithelial cells of intestinal glands, using objective lens 40 x. AgNOR dots were count in the nucleus of 100 epithelial cells using high power field with emersion oil.

Differences in histopathological (epithelial) changes, apoptotic index and AgNOR counts between groups were analysed by Mann-Whitney U test with SPSS 12.00 for windows.

Result

The results of histopathological changes indicated that rats rats induced by 1,2 DMH alone or with high fat high protein diet showed a higher degree of lesions and higher degree of dysplasia when compared with the groups were given celery. The highest mean was group III (2,70±0,82) with and the lowest was group V (1,50±0,54). Group IV show the highest apoptotic index (3,48±2,61) and the lowest was group I (0,95±0,52). AgNOR counts were shown the lowest rate on group V (0,77±0,16) and the highest was group III (1,44±0,40).

Mann-Whitney U-test of group I versus II show a significant differences for the three of dependent variables. Significant differences were found in compared group III versus IV to histopathological changes and apoptotic index. Compare of group II versus V were found only significant differences for apoptotic index.

Conclusion

Celery was potent to prevent histopatological changes, enhances apoptosis and decrease cell proliferative activity (AgNOR) in 1,2 DMH-induced colon tumors. Administration of celery significantly inhibit histopatological changes and increasing apoptosis in 1,2 DMH and high fat protein diet-induced colon carcinogenesis. Celery also significantly could enhances apoptosis in 1,2 DMH-induced colon tumors with different length periods.

Keywords

Colon carcinogenesis, 1,2 DMH, high fat high protein diet, celery, histopathological (epithelial) changes, apoptotic index, AgNOR counts.

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Angka kejadian kanker kolon di seluruh dunia tahun 1996 tercatat 875.000 dengan mortalitas 510.000. Pada tahun 2004 di Amerika Serikat diperkirakan akan terdiagnosis 146.940 kasus baru kanker kolon yang menimbulkan kematian pada 56.730 orang¹. Kanker kolon menduduki urutan kedelapan tertinggi di negara berkembang. Angka kejadian karsinoma kolorektal secara nasional belum ada. Menurut *Sjamsuhidayat* dkk. yang dikutip dari *I.Riwanto* (2003) pada 14 propinsi di Indonesia ditemukan 1378 kasus karsinoma kolorektal dari total 134.743.420 penduduk atau 1,8 per 100.000 penduduk². Kanker kolorektal menduduki peringkat kedua dari seluruh kanker terbanyak pada pria sesudah kanker paru sedangkan pada wanita merupakan nomor tiga terbanyak sesudah kanker serviks dan payudara³.

Studi genetik, eksperimental dan epidemiologik menunjukkan bahwa karsinoma kolorektal disebabkan oleh interaksi yang kompleks antara kerentanan genetik dan faktor lingkungan atau gaya hidup¹. Kanker kolorektal berkembang melalui serangkaian tumorigenesis histologikal. Perubahan epitelial tersebut telah terbukti disertai oleh perubahan genetik⁴. Perubahan epitelial tersebut mulai dari epitel normal, epitel hiperproliferatif, adenoma dan karsinoma^{5,6}. Penelitian pada hewan coba dengan menggunakan karsinogen

kimiawi untuk induksi tumor kolorektal telah menemukan rangkaian perubahan tersebut, dan menuju pada hipotesis bahwa polip adenomatosa (adenoma) adalah prekursor dari sebagian besar karsinoma kolorektal. Oleh karena itu cara-cara yang dapat menurunkan insiden dan prevalensi adenoma juga dapat menurunkan risiko timbulnya karsinoma kolorektal^{1,7}.

Pada saat hasil pengobatan konvensional dan farmakologik masih dipertanyakan, meningkatnya penerimaan terhadap terapi alternatif medis oleh masyarakat tidak dapat diabaikan. Melalui studi *in vitro*, hewan coba ataupun studi pada manusia dengan berbagai herba, vitamin telah dibuktikan kemampuannya dalam pengobatan atau pencegahan kanker kolon atau polip prekanker⁸. *The National Cancer Institute* dalam lima tahun terakhir menghabiskan dana lebih dari 20 juta dolar Amerika untuk meneliti potensi antikanker dari tanaman-tanaman yang biasa dimakan. Tanaman atau herba yang mempunyai aktivitas antikanker yang tertinggi misalnya bawang putih, kedelai, kubis, jahe, *licorice* dan sayuran berumbi seperti wortel dan seledri⁹.

Seledri atau *Apium graveolens* merupakan salah satu tumbuhan dengan kandungan antioksidan tinggi^{10,11}. *Apium graveolens* mengandung senyawa aktif karotenoid (*lutein*), flavonoid (*apigenin, apiin*), 3-*N-butyl-phthalide* (menentukan karakteristik odor pada seledri), serta *sedanolide*^{10,12}.

Kim JM et.al (1998) mengemukakan bahwa *lutein* mempunyai potensi sebagai agen kemopreventif melawan karsinogenesis kolon¹². *Zheng GQ et.al*

(1993) mengatakan bahwa *phthalide*, juga merupakan senyawa kemopreventif terhadap kanker¹³. Studi pada hewan menemukan bahwa biji seledri dapat mencegah pembentukan tumor ganas pada mencit. Dalam suatu studi dengan memakai orang dalam jumlah yang banyak dengan dan tanpa kanker kolorektal, ditemukan bahwa orang yang mengkonsumsi diet kaya *lutein* (dari seledri, bayam, tomat, wortel, selada, brokoli, jeruk) secara signifikan lebih sedikit menderita kanker kolorektal, tetapi belum jelas apakah seledri saja berperan penting dalam pencegahan penyakit ini.¹⁴

Thomas dan Schulick (2000) menyatakan bahwa *apigenin* merupakan *COX-2 inhibitor*¹⁵. *Momin RA dan Nair MG* (2002), memasukkan *sedanolide* ke dalam kelompok *inhibitor COX*. *COX* merupakan faktor yang berperan dalam respon inflamasi¹⁶. *Sun Y et.al* (2002), menyatakan bahwa *COX-2* meningkat kadarnya pada kanker kolorektal¹⁷. Peningkatan yang terjadi sampai empat kali lipat dari normal. Inhibisi *COX-2* menghambat metastasis kanker kolon pada hati¹⁸. *Boggs* (2002), menyatakan bahwa *COX-2 inhibitor* menghambat proliferasi sel kanker dan angiogenesisnya¹⁹. Peneliti di *St. Mark's Hospital, London* (1998) menemukan bahwa *COX-2 inhibitor* dapat mencegah kanker kolon²⁰.

Apium graveolens memiliki kandungan serat cukup tinggi²¹. Studi epidemiologik dan eksperimental (hewan coba) menunjukkan bahwa serat

mempunyai efek protektif terhadap karsinogenesis kolon melalui berbagai mekanisme antara lain penurunan waktu transit, pengikatan asam empedu sekunder dan pembentukan butirir²².

1,2 DMH dapat menginduksi kanker kolon. *Druckrey et. al* (1967) merupakan orang yang pertama kali menginduksi kanker kolon pada tikus dengan menggunakan 1,2 DMH dan mengatakan bahwa target jaringan utama induksi adalah intestinum, khususnya kolon dan rektum. Spesies hewan coba, rute pemberian, dan dosis mempengaruhi karsinogenisitas 1,2 DMH. Selektifitas target organ berdasarkan rute pemberian 1,2 DMH untuk menginduksi kanker kolon telah ditegaskan oleh *Wiebecke et. al* (*Chemical Induction of Colon Cancer*, 1982) pada penggunaan tikus dengan spesies yang sama. Sejak itu banyak penelitian untuk mengkonfirmasi efek karsinogenik 1,2 DMH pada kolon.²³

Penelitian epidemiologik, eksperimental (hewan coba) dan klinis menyatakan bahwa diet kaya lemak protein, alkohol dan daging berhubungan dengan peningkatan insiden kanker kolorektal. Asupan lemak yang tinggi juga meningkatkan risiko rekurensi adenoma paska polipektomi²². Diet tinggi lemak juga menstimulasi efek karsinogenik 1,2 DMH pada hewan coba²⁴.

1.2. Permasalahan

Selama ini seledri dimanfaatkan sebagai obat terbatas pada hipertensi dan rematik. Penelitian laboratorik yang melihat pengaruh seledri terhadap karsinogenesis secara umum maupun khusus terhadap kolon masih sangat kurang. Berdasarkan hal tersebut, maka dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

- a. Apakah pemberian seledri dapat menurunkan aktivitas proliferasi sel, meningkatkan indeks apoptosis dan menghambat perubahan histopatologis epitel mukosa kolon pada tikus wistar yang diinduksi dengan 1,2 DMH ?
- b. Apakah pemberian seledri dapat menurunkan aktivitas proliferasi sel, meningkatkan indeks apoptosis dan menghambat perubahan histopatologis epitel mukosa kolon pada tikus wistar yang diinduksi dengan 1,2 DMH beserta diet tinggi lemak dan protein?
- c. Apakah lamanya pemberian seledri berpengaruh terhadap aktivitas proliferasi sel, indeks apoptosis dan perubahan histopatologis epitel mukosa kolon pada tikus wistar yang diinduksi dengan 1,2 DMH?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum :

Melihat pengaruh pemberian seledri terhadap aktivitas proliferasi sel, indeks apoptosis dan perubahan histopatologis epitel mukosa kolon pada tikus wistar yang diinduksi karsinogenesis kolon.

1.3.2. Tujuan Khusus :

1.3.2.1. Mengetahui pengaruh pemberian seledri terhadap aktivitas proliferasi sel, indeks apoptosis dan perubahan histopatologis epitel mukosa kolon pada tikus wistar yang diinduksi dengan 1,2 DMH.

1.3.2.2. Mengetahui pengaruh pemberian seledri terhadap aktivitas proliferasi sel, indeks apoptosis dan perubahan histopatologis epitel mukosa kolon pada tikus wistar yang diinduksi dengan 1,2 DMH beserta diet tinggi lemak dan protein.

1.3.2.3. Melihat pengaruh lama pemberian seledri terhadap aktivitas proliferasi sel, indeks apoptosis dan perubahan histopatologis epitel mukosa kolon tikus wistar yang diinduksi dengan 1,2 DMH.

1.4. Manfaat Penelitian

Apabila terbukti pengaruh seledri terhadap karsinogenesis kolon maka hasil penelitian ini dapat sebagai dasar pertimbangan pemakaian seledri sebagai suplemen. Penelitian ini juga diharapkan dapat bermanfaat sebagai dasar

penelitian selanjutnya baik tentang efek seledri secara menyeluruh maupun obat tradisional lainnya yang mempunyai khasiat yang sama.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Karsinogenesis Kolon

Perkembangan sel normal menjadi kanker merupakan proses yang kompleks dan bertahap (*multistep process*). Tahap perkembangan sel kanker tersebut antara lain inisiasi, promosi dan progresi⁵.

Perubahan genetik terjadi pada tahap inisiasi, tetapi untuk mengubah sel normal menjadi sel kanker diperlukan mutasi pada lebih dari satu gen. Sel tersebut mengalami perubahan/mutasi pada gennya tetapi secara fenotip masih normal⁵. Tahap promosi adalah proses dimana sel yang terinisiasi terpapar terhadap promoter tumor yang menyebabkan sel mengalami ekspansi klonal secara fenotipik²⁵. Sel yang terinisiasi akan dirangsang untuk berproliferasi. Promoter tumor dapat menghambat apoptosis, sehingga sel yang terinisiasi tersebut terakumulasi sebagai sel yang disfungsional dan tidak berdiferensiasi (misalnya nodul pada mamma, polip pada kolon dan papiloma pada kulit)²⁶.

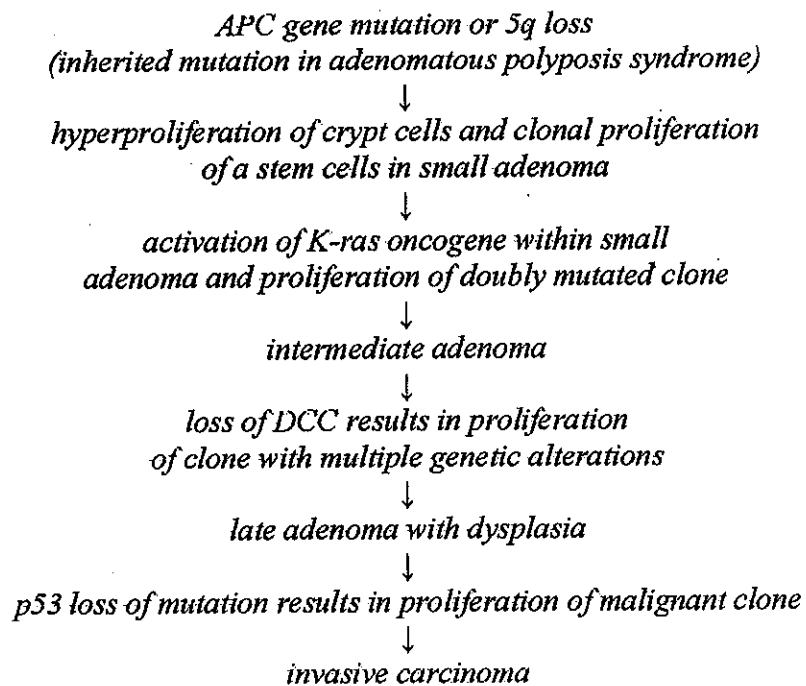
Progresi mungkin adalah proses yang paling kompleks dari ketiga tahap ini, karena membutuhkan perubahan genetik dan fenotip dan ekspansi seluler berlangsung dengan cepat. Sensitivitas terhadap komponen dalam diet, inhibitor pertumbuhan, pemicu diferensiasi secara bertahap akan menghilang sehingga tumor menjadi otonom secara progresif dan dapat dikendalikan hanya oleh intervensi yang lebih drastis²⁵.

Salah satu jenis tumor yang telah diteliti untuk mengetahui patogenesis kanker tersebut, adalah kanker kolorektal. Telah lama diduga bahwa kanker kolorektal berasal dari polip karena jenis tumor jinak itu sering dijumpai bersamaan dengan kanker kolorektal. Penelitian yang dilakukan oleh beberapa peneliti menemukan bahwa pada polip kecil ditemukan mutasi gen FAP, pada polip besar ditemukan mutasi gen FAP dan gen *K-ras*, sedangkan pada kanker kolorektal disamping mutasi kedua gen dijumpai pula mutasi pada dua gen lain, yaitu gen p53 dan gen DCC²⁷.

Karsinogenesis kolon merupakan proses yang memerlukan interaksi antara genetik dan faktor lingkungan. Faktor lingkungan yang berperan ternyata terdiri dari banyak faktor yang saling berinteraksi melalui berbagai mekanisme. Faktor lingkungan berasal dari endogen maupun eksogen, misalnya diet (lemak, protein, serat), bakteri usus, rokok, alkohol, yang semuanya mempunyai peran yang berbeda-beda.¹ Penelitian terdahulu membuktikan bahwa risiko berhubungan dengan tingginya asupan lemak dan rendahnya asupan biji-bijian dan serat. Sebagai tambahan, risiko juga berhubungan dengan rendahnya diet sayuran dan buah dan gaya hidup barat dan mungkin dengan tingginya *intake* kalori/energi, daging dan kegemukan²⁸.

Kanker usus besar berkembang melalui rangkaian perubahan yang dikenal dengan *Adenoma-Carcinoma Sequence*. Perubahan mukosa adalah sebagai akibat perubahan genetik progresif yang terjadi pada waktu-waktu

tertentu selama karsinogenesis. ²⁸ *Genomic instability* pada karsinogenesis kolon yang telah diidentifikasi yaitu 1) MSI, yang juga dikenal sebagai RER, ditemukan pada HNPCC dan 2) CIN yang ditemukan pada 85 % kanker kolorektal sporadik, melalui mekanisme LOH (Gambar 1) ^{29,30}.



Gambar 1. LOH pathway to colorectal carcinoma ³¹

Risiko adenoma berubah menjadi kanker adalah antara 2,5-8 % dan risiko meningkat bersama dengan penambahan ukuran polip, adenoma multipel, jenis histologik dan displasia epitel ^{21, 31}.

Polip adenomatosa dibagi menjadi tiga subtipe berdasarkan arsitektur epitelial yaitu adenoma tubular, adenoma vilosa dan adenoma tubulovilosa²¹.

Semua lesi adenomatosa berasal dari proliferasi displastik epitel, yang berkisar dari displasia ringan sampai berat. Displasia berat biasanya ditemukan pada adenoma vilosa, tetapi semua derajat displasia, bahkan adenokarsinoma invasif dapat ditemukan pada semua jenis histologik adenoma²¹.

Model eksperimental kanker kolon, dimana tumor diinduksi dengan AOM atau 1,2 DMH secara luas digunakan untuk mempelajari efek bahan kemopreventif dan tahap perkembangan kanker kolon. Perubahan yang terjadi menyerupai *adenoma-carcinoma sequence* pada manusia³².

2.2. Aktivitas Proliferasi Sel

Perubahan lain yang terjadi pada awal progresifitas sel normal menjadi sel kanker adalah peningkatan proliferasi sel³³.

Progresifitas sel neoplastik merupakan cermin dari sifat dan perangai sel yang telah berubah menjadi maligna. Sel-sel kanker yang tumbuh berlebihan terjadi akibat proses aktivitas proliferasi sel yang berlebih-lebihan³⁴. Kenaikan aktivitas proliferasi pada jaringan yang terinisiasi adalah perubahan yang sangat penting pada stadium awal dari promosi tumor yang merupakan tanda khas lesi prekanker³⁵.

Aktivitas proliferasi sel pada lesi jinak maupun ganas dapat diteliti dengan *thymidine uptake*, pemberian label *bromodeoxy-uridine*, sitometrik alur maupun imunohistokimia, misalnya Ki-67, PCNA maupun MIB-1³⁵.

NOR akhir-akhir ini banyak dipakai untuk mengukur aktivitas proliferasi sel. Cara pewarnaan AgNOR mudah dan biayanya murah sehingga dapat dilakukan secara rutin dengan blok parafin³⁵.

NOR merupakan metode dengan menggunakan reaksi Ag dengan NOR (AgNOR)³⁶. NOR adalah lengkung DNA yang menempati area khusus dalam kromosom 13,14,15,21 dan 22 yang diketahui sebagai tempat gen DNA ribosomal (rDNA). NOR penting dalam sintesis protein, membantu menjaga perpanjangan konfigurasi DNA dan mengatur transkripsinya. NORs mempunyai struktur nukleoprotein yang khas yang dipakai sebagai identifikasinya. Protein tersebut selama transkripsi bersifat argirofilik, sehingga dapat dipulas dengan perak. Pada sediaan blok parafin dengan pewarnaan perak koloid NOR tampak sebagai bercak-bercak gelap intranukleus pada mikroskop cahaya. Bercak-bercak itu disebut agregat argirofilik (AgNOR). Hasil pewarnaan AgNOR mempunyai korelasi yang tinggi dengan sitometrik alur dan pewarnaan imunohistokimia misalnya Ki-67. Variasi dalam jumlah AgNOR dapat membantu menegakkan diagnosis dan dapat membedakan berbagai tingkatan lesi. Menurut *Schwint et.al* yang dikutip dari *Ahmad Ghozali dkk. (1997)* jumlah AgNOR dapat membedakan antara epitel mulut yang normal dengan epitel

mulut di dekat karsinoma epidermoid yang masih terlihat normal dan belum menunjukkan tanda-tanda displasia. Pada penelitian tersebut jumlah AgNOR dianggap dapat mendeteksi adanya perubahan seluler sebelum perubahan morfologi terjadi, yaitu peningkatan aktivitas proliferasi pada mukosa mulut di dekat karsinoma epidermoid³⁵.

2.3. Hubungan Apoptosis dengan Karsinogenesis Kolon

Apoptosis adalah kematian sel yang dipicu oleh sel itu sendiri, oleh karena itu disebut juga PCD. Apoptosis dapat terjadi secara fisiologis maupun patologis. Apoptosis patologis terjadi karena berbagai sebab diantaranya adalah kerusakan DNA²⁷.

Apoptosis dikendalikan oleh 2 perangkat gen dengan fungsi yang antagonistik yaitu memacu dan menghambat. Gen tersebut adalah p53 (memicu apoptosis) dan gen Bcl-2, salah satu gen yang menghambat apoptosis^{27,37}.

Pada banyak jenis kanker diketahui bahwa terjadi mutasi homozigot dari gen p53 sehingga apoptosis tidak dapat terjadi dan mutasi tidak dapat dicegah. Demikian juga dengan gen Bcl-2, mengalami ekspresi berlebihan, sehingga sel yang seharusnya terbunuh melalui apoptosis tetap hidup dan dapat menimbulkan kanker²⁷.

Payne C et al (1995) meneliti apoptosis pada biopsi kolon manusia dengan riwayat kanker kolorektal, adenoma, kolitis ulseratif dan tanpa neoplasia

dan menemukan bahwa rata-rata indeks apoptosis pada orang normal dan kanker kolorektal berbeda secara signifikan, dimana indeks apoptosis pada orang normal lebih tinggi daripada penderita kanker³⁸.

Terdapat berbagai metode untuk menghitung apoptosis, yang bervariasi dari segi biologik dan utilitasny. *Hu Y et al* (2002) membandingkan jumlah sel apoptotik dengan metode TUNEL lebih tinggi daripada HE, hal ini disebabkan TUNEL sangat sensitif sehingga dapat mendeteksi pecahnya ikatan DNA walau belum terjadi perubahan inti yang nyata. Tetapi metode ini tentunya lebih mahal dan kompleks³⁹.

2.4. 1,2 Dimethylhydrazine

2.4.1. Sifat Kimia 1,2 DMH

1,2 DMH, yang mempunyai rumus kimia $C_2H_8N_2$ atau $CH_3-NH-NH-CH_3$ adalah senyawa yang mudah larut atau berbentuk cairan tak berwarna dengan bau mirip amoniak. Senyawa ini mempunyai potensi karsinogenik, mutagenik, korosif serta mudah terbakar namun tidak ada level paparan yang aman. 1,2 DMH, suatu zat *metilating*, banyak digunakan untuk induksi tumor kolon pada hewan coba karena kandungan karsinogen organotropiknya yang besar, variasi luas respon tumor terhadap hewan pengerat yang berbeda, modulasi induksi-diet dan distribusi tumor yang menyerupai tumor kolon

manusia serta kemiripan patologi tumor yang ditimbulkannya dengan tumor pada manusia^{40,41}.

2.4.2. Induksi Karsinogenesis Kolon dengan 1,2 DMH

1,2 DMH mudah diabsorpsi, berikatan dengan protein, DNA dan RNA jaringan mamalia. Kolon tikus adalah target toksisitas 1,2 DMH⁴².

1,2 DMH dimetabolisme di hepar menjadi *azomethane* dan AOM, kemudian dihidroksilasi menjadi *methylazoxymethanol* (MAM). *Fiala*, dalam *Chemical Induction of Colon Cancer*, 1982 menemukan bahwa mikrosom kolon berbeda dengan mikrosom hati yang tidak bisa mengkatalisa hidroksilasi AOM menjadi MAM sehingga yang berperan dalam induksi karsinogenesis kolon adalah 1,2 DMH dan metabolit-metabolitnya AOM dan *azomethane*²³.

Richards, dalam *Chemical Induction of Colon Cancer*, 1982 mengatakan bahwa aksi 1,2 DMH melalui dua tahap yaitu tahap inisiasi dan promosi. Pada tahap inisiasi terjadi metilasi DNA kolon yaitu pada posisi N⁷ dan O⁶ dari guanin.²³ O⁶ *methylguanine* (O⁶-MeG) dan N⁷ *methylguanine* yang sudah mengalami metilasi tersebut bersifat toksik, mutagenik dan karsinogenik. Dalam keadaan tidak adanya DNA repair, O⁶-MeG akan menginduksi transisi GC→AT⁴¹. Transisi GC→AT dan *adducts* O⁶-MeG dapat menyebabkan mutasi gen *K-ras*. *Luceri et al* (2000) meneliti perubahan DNA pada tikus yang diinduksi AOM dan menemukan bahwa MSI yang terjadi amat terbatas sehingga karsinogenesis kolon pada tikus mungkin disebabkan oleh mutasi spontan.

Tetapi tumor yang diinduksi AOM memperlihatkan *genomic instability* yang terlihat pada pemeriksaan RAPD³².

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

43

Berbagai studi telah dilakukan untuk mempelajari efek 1,2 DMH terhadap karsinogenesis kolon. *Corpet DE et.al (2003)* melakukan kajian 35 studi tentang topik diatas dan mengatakan bahwa rata-rata induksi dengan 1,2 DMH diberikan selama 8-14 minggu dengan dosis 15 mg/kg BB tikus⁴⁴.

Aberrant crypt foci (ACF), lesi preneoplastik putatif, suatu perubahan morfologik awal, dapat ditemukan dua minggu sesudah induksi dengan

karsinogen dosis tunggal seperti AOM⁴⁵, sedangkan *Papanikoloau et.al* (2000) meneliti pembentukan ACF pada strain tikus dengan kerentanan yang berbeda terhadap induksi 10 mg/kg BB AOM dan menemukan bahwa tumor terlihat sejak minggu ke enam sesudah induksi pertama⁴⁶.

Wang Q-S et.al (1999) mengatakan bahwa pemberian berulang karsinogen seperti 1,2 DMH pada hewan pengerat menyebabkan timbulnya tumor yang mirip dengan karsinoma kolorektal sporadik pada manusia⁴⁷.

Rute pemberian tampaknya tidak mempunyai efek signifikan terhadap organotropisme utama dari 1,2 DMH pada tikus. Pemberian 1,2 DMH secara subkutan maupun oral secara selektif menginduksi adenokarsinoma pada kolon dan rektum tetapi injeksi subkutan merupakan cara yang paling konsisten dan dapat dipercaya untuk menginduksi kanker kolon pada hewan pengerat.²³

Lain halnya dengan *Working Group* (1999) yang melaporkan apapun rute pemberian, 1,2 DMH, bila diberikan dalam dosis yang sesuai, menyebabkan timbulnya adenoma dan adenokarsinoma kolon dan pada usus halus (dalam jumlah yang lebih sedikit) pada tikus dan mencit. Bila diberikan dalam air minum dapat menimbulkan tumor vaskuler⁴².

The Cancer Journal (1993) menyimpulkan bahwa pemberian berulang 1,2 DMH pada tikus akan terjadi kegagalan maturasi sel induk kriptek kolon yang menyebabkan peningkatan jumlah sel dan penumpukan sel pada bagian atas

kripte⁴⁸. *Melen-Mucha* (2002) memberikan 1,2 DMH pada tikus Wistar jantan, dan menemukan bahwa terjadi peningkatan proliferasi dan penurunan apoptosis epitel kolon.⁴⁹

Kanker pada kolon yang diinduksi dengan 1,2 DMH pada mencit dan tikus memperlihatkan stadium prekanker yang jelas. Rangkaian perubahan patologik dapat diobservasi sebelum timbul karsinoma, dan jumlah serta jenis epitel kolon yang berubah tergantung dosis dan lama pemberian⁵.

2.5. Peran Diet Tinggi Lemak dan Tinggi Protein pada Karsinogenesis Kolon

Studi pada hewan coba memperlihatkan konsistensi yang jelas bahwa diet tinggi lemak meningkatkan insiden kanker kolon. Pengaruhnya terutama pada tahap promosi karsinogenesis, walaupun inisiasi dapat dipengaruhi pada berbagai derajat⁵⁰.

Promosi kanker kolon oleh diet tinggi lemak disebabkan oleh meningkatnya ekskresi asam empedu sekunder), yang mungkin dimediasi oleh PKC dan/atau *ornithine decarboxylase*⁵⁰. SBA bersifat sebagai promotor tumor, yang akan menstimulasi aktivitas proliferasi epitel kolon melalui percepatan pertukaran membran fosfolipid. Percepatan ini kemudian mengakibatkan dilepasnya DAG. Dalam keadaan normal konversi membran fosfolipid ini dilakukan oleh bakteri usus, tetapi meningkat pada diet tinggi

lemak. DAG adalah aktivator endogen PKC, yang selanjutnya akan meningkatkan proliferasi sel^{22, 51}. SBA juga mampu meningkatkan produksi PG-E₂ dan ekspresi COX-2⁵².

SBA dibentuk oleh mikroflora usus seperti *Streptococcus bovis*, yang meningkat pada keadaan diet tinggi lemak. Selain berperan dalam pembentukan SBA, mikroflora usus mampu memecah asam lemak peroksidabel menjadi *superoxide*. *Superoxide* dengan dikatalisa Fe²⁺ berubah menjadi hidroksi radikal yang merusak DNA^{24,53}. Produksi *superoxide* dan radikal bebas lain menstimulasi mikroflora usus untuk mengeluarkan *inflammatory cytokine* dan *chemokine* seperti TNF- α , IL antara lain IL-6, IL-8. Radikal bebas dapat merusak DNA sedangkan IL-8 berperan dalam tahap progresi karsinogenesis kolon dan memicu terlepasnya radikal superoksid dari netrofil^{53,54}. *Inflammatory cytokine* juga menimbulkan inflamasi kronik yang pada akhirnya juga mengarah kepada karsinogenesis kolon⁵¹.

Protein yang dicerna dalam tubuh meningkatkan kadar amin dan amida yang berperan dalam pembentukan nitrosamide. *Nitrosamide* merupakan karsinogen yang akan menimbulkan jejas pada sel kolon²¹.

2.6. Seledri (*Apium Graveolens*)

2.6.1. Morfologi dan Habitat

Seledri dikenal dengan nama ilmiah *Apium graveolens*, termasuk keluarga *Umbelliferae*⁵⁶. Seledri adalah tanaman *biennial* yang banyak ditanam tetapi juga tumbuh liar di Amerika Utara dan Selatan, Eropa dan Afrika. Tanaman seledri berdiri tegak, dapat tumbuh sampai 2-3 kaki. Daun seledri berwarna hijau tua, licin, berbentuk baji, dengan pinggir bergerigi, terletak pada kedua sisi tangkai yang berseberangan. Bunga berwarna abu-abu-putih, mekar dari bulan Juli sampai November. Buahnya kecil, berisi biji berbentuk elips^{56,57}.

Seledri yang dikenal sekarang berasal dari seledri liar yang banyak ditemukan di Mediterania, dimana bijinya banyak dimanfaatkan sebagai obat⁵⁸.

2.6.2. Kandungan Tanaman Seledri

Komponen aktif seledri adalah *carotenoid (lutein)*; *phthalide* terutama *3-n-butylphthalide*, *ligustilide*, *sedanolide* dan *sedanenolide* ; *coumarins*, *bergapied* ; *isopimperatorin* , *iso pimpinellin* ; *apiumoside* dan *celeroside*, *flavonoids* seperti *apiin* dan *apigenin* ; *fatty acids* ; *fixed oil*; *volatile oil* (mengandung *d-limonene*, dengan *a-selinene*, *santalol*, *a-dan b- eudesmol*, *dihydrocarvone*^{10,12,56}.

2.6.3. Pengaruh Lutein dalam Seledri terhadap Karsinogenesis Kolon

Lutein merupakan *flavonoid karotenoid*, antioksidan poten, yang banyak terkandung dalam *Apium graveolens*. Kim JM (1988) menemukan bahwa *lutein*

berperan sebagai senyawa kemopreventif terhadap kanker kolon pada tikus yang terinduksi dengan 1,2 DMH.¹²

The US Department of Agriculture-Nutrition Coordinating Centre menyatakan bahwa intake *lutein* berhubungan dengan turunnya risiko kanker kolon. Sedangkan, karotenoid lain, seperti α -karoten dan β -karoten, tidak berhubungan secara signifikan, karena *lutein* memiliki gugus hidrofilik dan hidrofobik yang dapat terentang antara membran sel. Karotenoid yang lain tidak memiliki gugus polar dan tetap tinggal secara utuh pada bagian dalam lapisan lipid membran sel.⁵⁹

Gugus polar *lutein* yang berada di luar membran sel dapat mengikat radikal bebas dengan efektif. Mekanisme kerja *lutein* dapat dijelaskan sebagai berikut : ion *superoxide* sebagai radikal bebas dioksidasi oleh *lutein* menjadi oksigen. *Lutein* juga dapat mengikat radikal bebas sehingga terbentuk senyawa inaktif.^{57,60}

Villalon B et al (2004) melaporkan bahwa *lutein* secara signifikan menurunkan insiden dan jumlah tumor dibanding kelompok tikus jantan *Sprague-Dawley* yang diberi DMH. Dengan analisis PCR-SSCP, kelompok yang diberi *lutein* memperlihatkan mutasi *K-ras* yang berbeda dibanding dengan kelompok yang diberi DMH maupun kelompok kontrol⁶¹.

Sumantran VN et al (2000) melaporkan bahwa ATRA dan *lutein* secara selektif menginduksi apoptosis pada sel yang bertransformasi menuju keganasan tapi tidak pada sel normal⁶².

Slattery ML et al (2000) meneliti hubungan konsumsi karotenoid dengan kanker kolon dan menemukan bahwa konsumsi *lutein*, salah satu karotenoid dominan dalam plasma, secara signifikan memperlihatkan efek protektif pada penderita kanker kolon yang terdiagnosis sebelum usia 67 tahun maupun pada penderita yang perokok⁶³. Suatu penelitian tentang *lutein* juga menemukan bahwa *lutein* berhubungan dengan penurunan 17 % risiko kanker kolon. Orang-orang dengan konsumsi makanan kaya *lutein* seperti bayam, brokoli, selada, tomat, jeruk dan seledri mempunyai insiden kolon kanker yang lebih rendah.⁶⁴

2.6.4. Pengaruh Apigenin dan Sedanolide dalam Seledri terhadap Karsinogenesis Kolon

Apium graveolens mengandung bahan aktif *sedanolide* dan *apigenin* yang mempunyai kemampuan untuk menghambat enzim COX-1 dan COX-2 pada pH 7. COX-2 berperan dalam sintesa PG-E₂, suatu mediator inflamasi endogen yang berfungsi meningkatkan proses inflamasi, antara lain dengan dilatasi mikrovaskuler dan meningkatkan permeabilitas terhadap plasma. Proses inflamasi, bila berlangsung kronik, menyebabkan perubahan mukosa kolon menuju displasia.⁶⁰ *Kojima (2001)* menyatakan bahwa PG-E₂ mempengaruhi reaksi antitumor sel limfosit sehingga menyebabkan

imunosupresi pada area tumor. Dengan demikian ekspresi COX-2 yang berlebih pada kolon mengakibatkan imunosupresi lokal. COX-2 juga menurunkan indeks proliferasi limfosit. Hal ini diperkuat oleh *Tsujii M* (2002), yang mengatakan bahwa PG-E₂ mempunyai efek yang berlawanan dengan antitumor⁴⁷. COX-2 juga berperan dalam pengaturan pertumbuhan. COX-2 cenderung meningkatkan proliferasi sel epitel kript kolon dan menurunkan apoptosis yang merupakan mekanisme proteksi terhadap karsinogenesis.^{15, 18,19, 60, 65}

Van Dross R et. al (2003) melaporkan bahwa *apigenin* berperan sebagai zat kemopreventif karena berbagai efeknya terhadap kultur sel karsinoma kolon termasuk inhibisi transformasi dan angiogenesis, induksi penghentian siklus sel dan stimulasi komunikasi celah hubungan interseluler⁶⁶.

Liang Y-C et.al (1999) dalam studinya tentang penekanan COX oleh *apigenin* dan *flavonoid* lain menyimpulkan bahwa *apigenin* dan *flavonoid* lain mampu menghambat aktivitas PKC⁶⁷.

Di Indonesia, seledri yang dipadukan dengan kumis kucing telah dipatenkan menjadi obat antihipertensi. *Apigenin* yang terkandung dalam seledri berfungsi sebagai kalsium antagonis⁶⁸.

2.6.5. Pengaruh Serat dalam Seledri terhadap Karsinogenesis Kolon

Seledri mengandung serat dalam jumlah yang cukup tinggi yaitu 1,7 g/100 g atau 3,5 g dalam satu tangkai besar⁶⁹.

Serat mampu meningkatkan besar feses, sehingga akan melarutkan karsinogen dan memperpendek waktu transit, dengan demikian kontak antara karsinogen dengan lumen dan mukosa kolon akan lebih singkat⁶⁹.

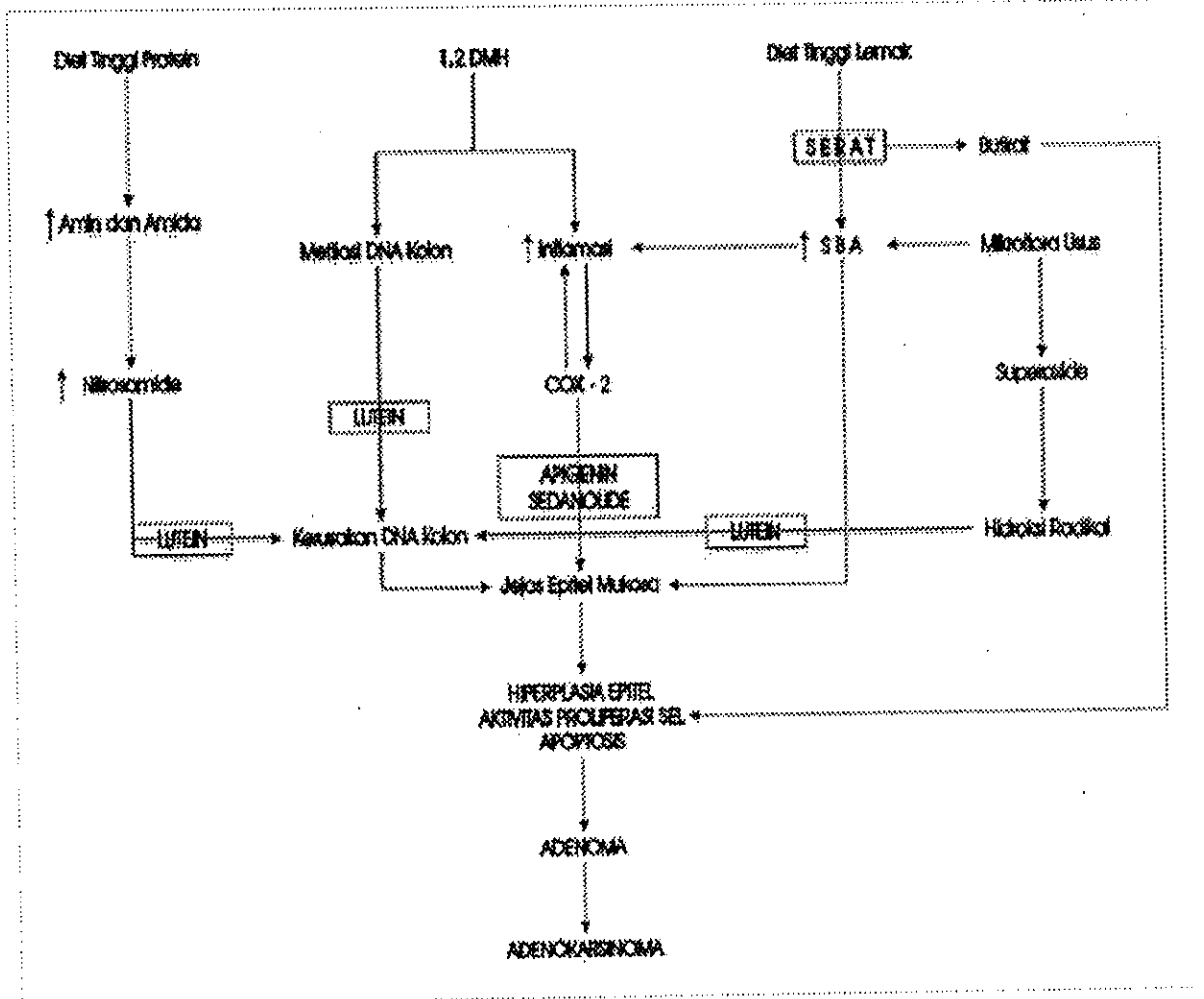
Serat juga berikatan dengan asam empedu, jadi akan menurunkan konsentrasi asam empedu dalam feses, akibatnya dekonjugasi dan konversi asam lemak primer menjadi sekunder oleh enzim bakterial dapat dicegah. Serat menurunkan pH feses, sehingga menurunkan solubilitas asam empedu bebas, yang secara teoritis akan mengurangi aktivitas promotor tumor dari SBA⁶⁹.

Fermentasi serat oleh mikroflora usus seperti prebiotik dan probiotik akan membentuk SCFA, diantaranya *butyrate*. *Butyrate* mampu menghambat enzim *histone deacetylase*, yang dihasilkan dari hiperasetilasi *histone*. Enzim *histone deacetylase* berperan dalam pengaturan gen SRC dimana ekspresi gen ini akan menimbulkan proliferasi sel yang berlebihan pada kolon^{1, 69, 70}.

Medina V et al melaporkan bahwa asam butirrat yang merupakan produk degradasi serat secara signifikan menurunkan jumlah tumor dan insiden keganasan dan karsinoma kolon pada hewan coba yang diinduksi dengan 1,2 DMH⁷¹.

BAB.3 KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. KERANGKA TEORI



UPT-PUSTAK-UNDIP

3.2. KERANGKA KONSEP



3.3 HIPOTESIS

1. Pemberian seledri pada tikus wistar yang diinduksi 1,2 DMH dapat menurunkan aktivitas proliferasi sel, meningkatkan indeks apoptosis dan menghambat perubahan histopatologis epitel mukosa kolon.
2. Pemberian seledri pada tikus wistar yang diinduksi 1, 2 DMH beserta diet tinggi lemak dan protein dapat menurunkan aktivitas proliferasi sel, meningkatkan indeks apoptosis dan menghambat perubahan histopatologis epitel mukosa kolon.
3. Terdapat perbedaan aktivitas proliferasi sel, indeks apoptosis dan perubahan histopatologis epitel mukosa kolon pada tikus wistar yang diinduksi 1, 2 DMH dengan jangka waktu berbeda.

BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain *Randomized Post Test Control Group* yang dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap. Randomisasi sederhana dilakukan dengan menggunakan komputer.

4.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian berlangsung selama 18 minggu.

Pemeliharaan hewan coba dan induksi 1,2 DMH, pemberian seledri dan diet tinggi lemak dan protein dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang.

Pemeriksaan aktivitas proliferasi sel, indeks apoptosis (AI) dan perubahan histopatologis epitel mukosa kolon dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UNDIP.

4.3. Jenis dan Besar Sampel

Populasi dan sampel penelitian ini adalah tikus Wistar jantan berusia 12 minggu dengan berat badan 180-200 gram.

Penentuan besar sampel dengan rumus Federrer, yaitu : $(t-1)(n-1) > 15$, dimana t adalah kelompok perlakuan, dan n adalah jumlah sampel perkelompok

perlakuan. Tikus wistar dibagi dalam 5 kelompok, yaitu 1 kelompok kontrol, 1 kelompok kontrol perlakuan dan 3 kelompok perlakuan, sehingga didapat jumlah sampel minimal perkelompok adalah 5 ekor tikus.

4.4. Kriteria Inklusi

Tikus Wistar jantan, dalam keadaan sehat, aktivitas dan tingkah laku normal, berumur 12 minggu, dengan berat badan 180-200 gram.

4.5. Kriteria Eksklusi

Gerakan tikus tidak aktif, mengalami diare selama penelitian yang ditandai dengan feses yang tidak terbentuk, atau tikus mati dalam masa penelitian.

4.6. Variabel Penelitian

4.6.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian 1,2 DMH subkutan, seledri dan diet tinggi lemak dan tinggi protein.

4.6.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas proliferasi sel (hitung AgNOR) , perubahan histopatologis epitel mukosa kolon dan indeks apoptosis.

4.7. Definisi Operasional

4.7.1. Variabel Bebas

Injeksi 1,2 DMH adalah pemberian 1,2 DMH dengan dosis 20 mg/kgBB sekali seminggu secara subkutan.

Pemberian seledri dalam bentuk jus dan serat dari daun dan tangkai seledri dengan dosis 12,096 gr/kgBB melalui sonde lambung (jus) dan dicampurkan dengan pakan (serat) setiap hari. Dosis didapat berdasarkan dosis lazim manusia yang dikonversikan pada tikus, dan telah disesuaikan dengan hasil penelitian pendahuluan.

Pemberian diet tinggi lemak dan protein dalam bentuk pakan siap pakai yang berisi lemak 40 % dan protein 24 %.

4.7.2. Variabel Tergantung

Aktivitas proliferasi sel dinilai dengan menggunakan pewarnaan AgNOR yaitu jumlah titik-titik AgNOR dalam inti sel pada 100 sel tumor dengan pembesaran 1000 x menggunakan minyak emersi, skala rasio.

Perubahan histopatologis mukosa kolon dilihat dari perubahan epitel kelenjar mukosa kolon secara mikroskopik mulai dari normal, hiperplasia, displasia dan karsinoma/adenokarsinoma, skala ordinal.

Indeks apoptosis adalah badan apoptotik per 100 sel tumor non apoptotik dengan pembesaran 400 x, kemudian diambil rata-ratanya, skala rasio.

4.8. Alat dan Bahan

4.8.1. Alat

4.8.1.1. Untuk pemeliharaan dan perlakuan adalah timbangan, kandang hewan, sonde lambung dan *sprit disposable*.

4.8.1.2. Untuk pemeriksaan sediaan histopatologi dan hitung AgNOR adalah oven, mikrotom, kaca obyek dan kaca penutup.

4.8.2. Bahan

Hewan coba dalam penelitian ini adalah tikus jantan galur Wistar yang berumur 12 minggu, bobot badan antara 180-200 gram, sehat, aktivitas dan tingkah laku normal. Selama penelitian tikus tidak sakit dan mengalami diare atau mati. Tikus diberi pakan standar AIN 93 M dan minum secara *ad libitum*.

Bahan perlakuan adalah 1,2 DMH, diet tinggi lemak dan protein dan seledri.

Untuk prosesing jaringan berupa formalin *buffer* 10 %, aseton, *xylol*, benzol, dan parafin cair. Untuk pengecatan HE berupa *xylol*, alkohol absolut, hematoksilin, eosin, dan kanada balsam. Untuk pengecatan AgNOR diperlukan gelatin, asam format dan perak nitrat.

4.9. Cara Kerja

4.9.1. Cara Perlakuan

Pemberian perlakuan dibagi atas dua kelompok waktu yaitu kelompok pertama diberi perlakuan selama 12 minggu dan kelompok kedua yang diberi perlakuan selama 16 minggu. Pemberian injeksi 1,2 DMH, seledri dan diet tinggi lemak dan protein dimulai pada saat yang sama yaitu hari pertama minggu pertama sesudah melewati masa adaptasi, tetapi frekuensinya berbeda yaitu 1,2 DMH diberikan sekali seminggu tiap hari pertama pada minggu tersebut sedangkan seledri dan diet tinggi lemak dan protein diberikan setiap hari.

1,2 DMH dalam bentuk bubuk terlebih dahulu ditimbang dan dilarutkan dalam *aquabidestilata*. Injeksi 1,2 DMH dilakukan secara subkutan pada daerah abdomen tikus. Dosis 1,2 DMH 20 mg/kgBB, sehingga rata-rata dosis adalah 4 mg per tikus. Injeksi dilakukan pada setiap tikus dari kelompok I-V.

Seledri segar dihaluskan secara manual (dengan tingkat kehalusan cukup sampai Φ 0,3-0,5 cm dan disaring dengan saringan teh (Φ 1 mm), sehingga akan menjadi larutan. Pada proses penghalusan seledri, akan keluar cairan dari dalam seledri tersebut. Larutan diberikan melalui sonde lambung dan ampas/serat yang tersisa dari hasil penyaringan dicampur dengan pakan tikus, sebanyak 12,096 gr/kgBB atau 2,4192 gr per tikus.

Diet tinggi lemak dan protein diberikan dalam bentuk bahan siap pakai, sebagai pakan tikus, *ad libitum*.

Bahan Perlakuan	Kel I	Kel II	Kel III	Kel IV	Kel V
1,2 DMH (1x 1 minggu)	X	X	X	X	X
Seledri (setiap hari)		X		X	X
Diet Tinggi Lemak dan Protein (setiap hari)			X	X	

4.9.2. Cara Pemeriksaan

Teknik pemeriksaan aktivitas proliferasi sel, perubahan histopatologi epitel mukosa kolon dan indeks apoptosis dengan cara 1) tikus didekapitasi ; 2) diambil usus besar pada bagian yang mencurigakan atau bagian yang sudah terbentuk tumor, setiap jaringan usus besar tikus diambil 2 potong jaringan yang masing-masing dibuat blok parafin, diperoleh 44 blok parafin ; 3) dilakukan prosesing jaringan dan 4) pengecatan HE untuk indeks apoptosis dan perubahan histopatologi mukosa kolon dan AgNOR untuk aktivitas proliferasi sel (cara prosesing dan pengecatan terlampir).

Pemeriksaan perubahan histopatologis epitel mukosa kolon dan hitung titik AgNOR dan indeks apoptosis dilakukan pada setiap blok parafin.

Aktivitas proliferasi sel kolon dinilai dengan menggunakan metode AgNOR. Hitung AgNOR dilakukan sesuai metode *Ploton* dengan menghitung jumlah AgNOR interfase per sel pada 100 sel tumor dengan pembesaran 1000x menggunakan minyak emersi, kemudian diambil rata-ratanya. Pada setiap sediaan dilakukan penghitungan pada daerah yang paling anaplastik, hindari bagian nekrotik dan sel yang bertumpuk. Kontrol internal reaksi dilakukan

dengan penghitungan AgNOR pada limfosit yang hanya memiliki satu bintik AgNOR. Pengecatan AgNOR tampak sebagai titik coklat atau hitam dalam inti sel epitel kelenjar^{72,73}.

Perubahan histopatologis mukosa kolon dilihat dari perubahan histopatologis epitel mukosa kolon secara mikroskopik yaitu :

Tabel 1. Skoring Perubahan Histopatologik Epitel Mukosa Kolon

Skor	Perubahan Histopatologis Sel Epitel Mukosa Kolon
0	Normal
1	Hiperplasia
2	Displasia ringan
3	Displasia sedang
4	Displasia berat

Hiperplasia epitel kelenjar adalah penambahan jumlah sel epitel kelenjar mukosa kolon, menjadi lebih dari satu lapis⁷⁴.

Polip adenomatosa atau adenoma adalah massa yang tumbuh menonjol ke dalam lumen kolon, bertangkai atau *sessile* yang membentuk struktur kelenjar atau berasal dari sel epitel kelenjar, yang disertai berbagai derajat atipia sel^{31,74}. Displasia ringan ditandai dengan inti sel membesar, hiperkromatik tetapi polaritas inti hanya sedikit menurun dan sedikit gambaran mitosis. Displasia sedang berupa inti sel pleomorfik, mulai berlapis-lapis dan kelenjar lebih padat yang ditandai dengan pola "*back to back*", penurunan sekresi musin dan mitosis lebih banyak. Displasia berat secara mikroskopik ditandai dengan

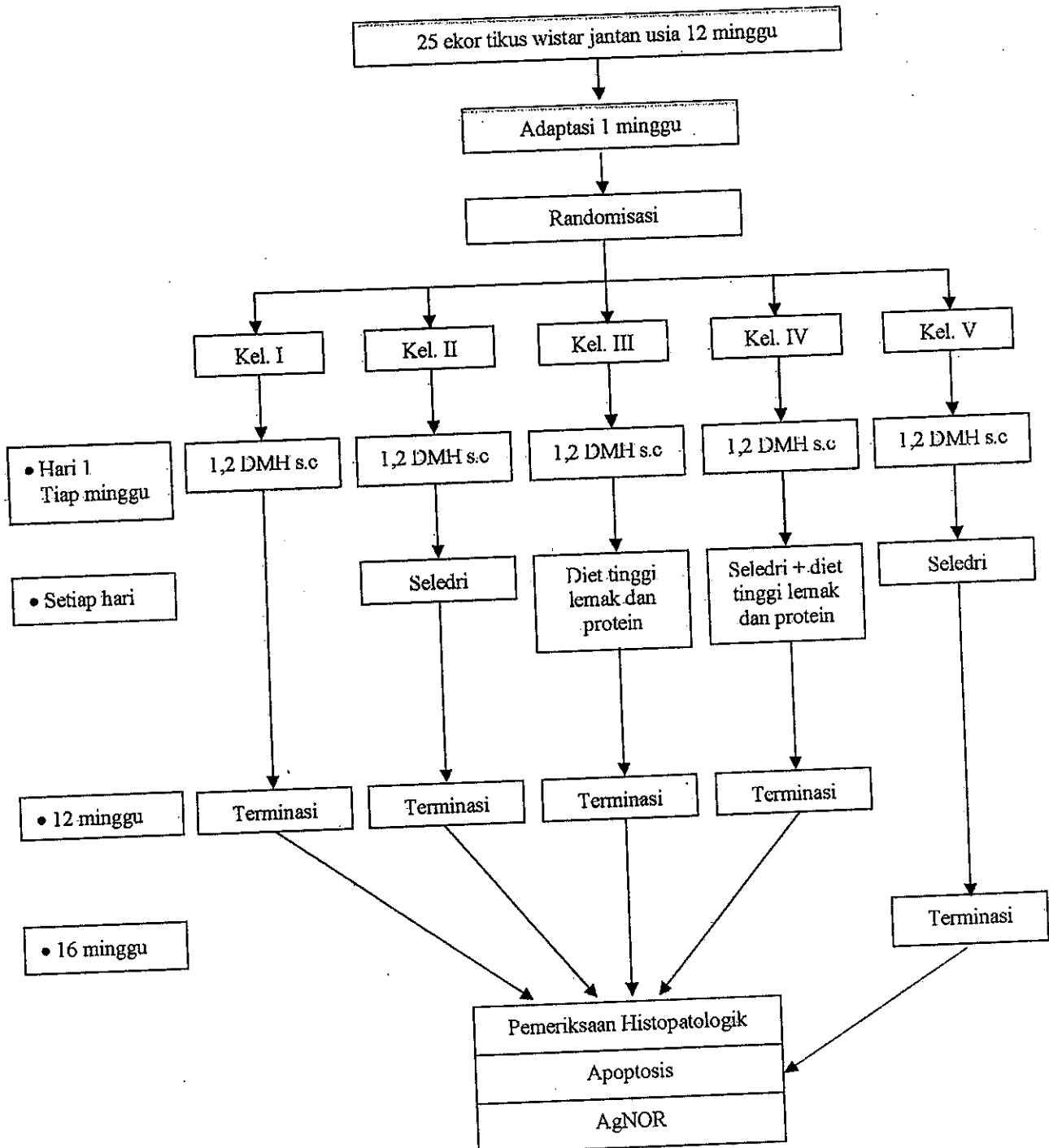
inti lebih pleomorfik, bertumpuk-tumpuk, *loss of polarity* tetapi belum ada invasi melalui muskularis mukosa ke dalam submukosa³¹.

Penghitungan skoring perubahan histopatologis dan morfologi sel epitel mukosa kolon dilakukan pada satu preparat dari tiap blok parafin. Tiap kolon tikus dijadikan 2 blok parafin, masing-masing blok parafin dihitung sebagai satu sampel sehingga didapat total sampel adalah 44 buah, setelah dikurangi tikus yang mati sebelum berakhir masa perlakuan. Bila ditemukan lebih dari 1 bentuk perubahan (seperti hiperplasia dan displasia) pada satu preparat, skoring diambil dari perubahan yang tertinggi.

Indeks apoptosis adalah badan apoptotik per 100 sel tumor non apoptotik⁶⁶. Indeks apoptosis dihitung sesuai metode yang digunakan oleh *Aihara M et al*, dimana badan apoptotik dihitung per 100 sel tumor dari area yang signifikan dengan pembesaran 400 x, pada 10 lapangan pandang dari satu preparat tiap blok parafin, kemudian diambil rata-ratanya⁷⁵.

Pewarnaan HE memperlihatkan badan apoptotik berupa sel bulat tunggal dengan sitoplasma padat, homogen, eosinofilik kuat yang mengandung kondensasi kromatin berupa material basofilik kuat homogen, berbentuk bulat, tunggal. Kadang kromatin yang memadat tersebut pecah menjadi beberapa bagian, bisa juga sitoplasma hilang dan tertinggal hanya sedikit fragmen kromatin. Kadang badan apoptotik dipisahkan dari sel utuh sekitarnya melalui halo yang jernih^{75,76}.

4.10. Gambar 2. Alur Kerja



- a. Kelompok I merupakan kelompok kontrol, diberi pakan standar dan injeksi 1,2 DMH subkutan selama 12 minggu.
- b. Kelompok II merupakan kelompok perlakuan diberi pakan standar, injeksi 1,2 DMH subkutan dan seledri selama 12 minggu.
- c. Kelompok III merupakan kelompok kontrol perlakuan, diberi pakan standar, injeksi 1,2 DMH subkutan dan diet tinggi lemak dan tinggi protein.
- d. Kelompok IV merupakan kelompok perlakuan, diberi pakan standar, injeksi 1,2 DMH subkutan, diet tinggi lemak dan protein serta seledri selama 12 minggu.
- f. Kelompok V merupakan kelompok perlakuan, diberi pakan standar, injeksi 1,2 DMH subkutan dan seledri selama 16 minggu.
- g. Kelompok I dibandingkan dengan kelompok II diharapkan dapat mencapai tujuan khusus a.
- h. Kelompok III dibandingkan dengan kelompok IV diharapkan dapat mencapai tujuan khusus b.
- i. Kelompok II dibandingkan dengan kelompok V diharapkan dapat mencapai tujuan khusus c.

5. HASIL PENELITIAN

5.1. Gambaran Umum

Selama penelitian, sejak minggu pertama sampai minggu ke-empat beberapa tikus mati yaitu satu ekor masing masing dari kelompok I, IV dan V. Dari otopsi didapatkan tanda aspirasi pneumonia pada paru, perdarahan, degenerasi sampai nekrosis pada hepar, ginjal dan traktus gastrointestinal. Minggu ke-lima sampai selesai penelitian, tidak ada lagi tikus yang mati dengan berat badan relatif stabil. Daerah abdomen di sekitar lokasi penyuntikan 1,2 DMH ditemukan ulkus pada beberapa tikus. Kelompok tikus wistar 16 minggu (kelompok V) ditemukan satu ekor tikus dengan pembengkakan pada daerah kulit abdomen dan satu ekor pada daerah leher, yang kemudian pecah membentuk ulkus. Setelah induksi selama tujuh minggu, satu ekor tikus dari kelompok I (kontrol) diterminasi, secara makroskopik belum terlihat tumor tetapi secara mikroskopik sudah didapatkan adenoma tubulovilosa pada kolon.

Kolon tiap tikus dipotong dan dijadikan dua blok parafin, tiap blok parafin dihitung sebagai satu sampel sehingga total sampel adalah 44 buah.

Data dianalisis dengan *SPSS 12.0 for Windows*.

5.2. Analisis Statistik

Pada akhir penelitian pada kelompok yang diinduksi selama 12 minggu maupun 16 minggu, secara makroskopik belum tampak tumor kolon.

Hasil penelitian berupa perubahan histopatologis epitel mukosa kolon, indeks apoptosis dan aktivitas proliferasi sel (AgNOR) didiskripsikan dan dimasukkan dalam Tabel 2 dan 3 serta dibuat grafik *box-plot*.

Tabel 2 Skoring Perubahan Histopatologis Epitel Mukosa Kolon, Indeks Apoptosis dan Hitung AgNOR

Kelompok	Perubahan Histopatologis Epitel Mukosa		Indeks Apoptosis		AgNOR	
	I	II	I	II	I	II
I.						
Tikus 1	2	3	1,6	1,8	0,98	1,26
Tikus 2	2	2	0,9	0,6	1,82	1,32
Tikus 3	3	3	0,4	0,7	1,05	1,73
Tikus 4	2	2	0,5	1,1	1,63	1,19
II.						
Tikus 1	2	2	10,3	2,0	0,88	0,90
Tikus 2	2	2	1,2	2,5	0,95	0,98
Tikus 3	2	2	1,7	1,9	0,54	0,40
Tikus 4	1	2	2,3	2,3	1,03	1,06
Tikus 5	2	2	2,1	2,1	1,34	1,01
III						
Tikus 1	2	2	0,5	0,7	0,98	1,65
Tikus 2	2	4	0,5	1,3	1,35	1,96
Tikus 3	4	3	2,6	1,7	1,60	1,97
Tikus 4	3	2	0,6	1,9	0,68	1,44
Tikus 5	3	2	1,1	1,0	1,45	1,29
IV						
Tikus 1	2	1	2,1	1,5	1,46	0,70
Tikus 2	2	1	1,3	2,9	0,39	0,98
Tikus 3	2	1	6,4	8,6	0,77	0,80
Tikus 4	2	2	2,3	2,7	1,32	1,48
V						
Tikus 1	2	1	2,0	1,2	0,53	0,87
Tikus 2	2	2	1,6	1,3	0,68	0,64
Tikus 3	1	1	1,0	1,2	0,95	0,82
Tikus 4	2	1	1,2	1,1	1,00	0,68

Tabel 3. Nilai Mean dan Median Perubahan Histopatologis Mukosa Kolon, Indeks Apoptosis dan AgNOR pada tikus kelompok I, II, III, IV dan V

Kelompok	Perubahan Histopatologis Epitel Mukosa Kolon	Indeks Apoptosis	AgNOR
Kel. I (n=8)			
<i>Mean</i>	2,38	0,95	1,37
<i>Median</i>	2,00	0,80	1,29
S D	0,52	0,52	0,32
Kel.II (n=10)			
<i>Mean</i>	1,90	2,84	0,90
<i>Median</i>	2,00	2,10	0,97
S D	0,32	2,65	0,27
Kel.III (n=10)			
<i>Mean</i>	2,70	1,19	1,44
<i>Median</i>	2,50	1,05	1,45
S D	0,82	0,70	0,40
Kel IV (n=8)			
<i>Mean</i>	1,63	3,48	0,99
<i>Median</i>	2,00	2,50	0,89
S D	0,52	2,61	0,40
Kel V (n=8)			
<i>Mean</i>	1,50	1,33	0,77
<i>Median</i>	1,50	1,20	0,75
S D	0,54	0,32	0,16

Skoring perubahan histopatologis (pertumbuhan epitelium dan displasia sel)) mukosa kolon adalah skala ordinal sehingga uji statistik yang dipergunakan adalah non parametrik yaitu uji beda *Mann-Whitney U Test*.

Sedangkan untuk indeks apoptosis dan hitung AgNOR yang berupa skala rasio normalitas data diuji terlebih dahulu dengan uji *Kolmogorov-Smirnov* ($p < 0,05$). Ternyata data indeks apoptosis dan aktivitas proliferasi sel (AgNOR) berdistribusi tidak normal. Untuk uji beda kedua variable tersebut dipakai test non parametrik untuk uji beda yaitu *Mann Whitney U Test*.

5.2.1. Perubahan Histopatologis Mukosa Kolon

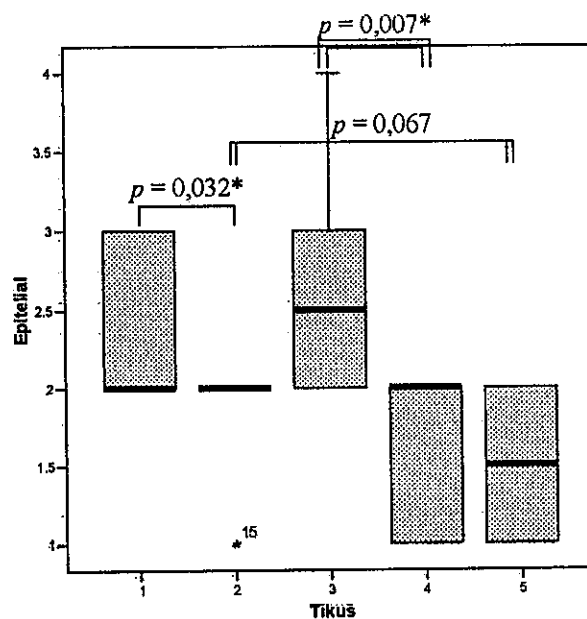
Perubahan histopatologik secara mikroskopik ditemukan adenoma dengan berbagai jenis histologik dan derajat displasia pada semua tikus dari kelompok I dan III. Pada kelompok II, dan IV sebagian besar adalah berupa hiperplasia epitel tetapi masih ditemukan adenoma yaitu pada 1 ekor tikus kelompok II, dan 2 tikus dari kelompok IV. Tikus kelompok V sama sekali tidak terbentuk adenoma.

Data Tabel 2 menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol (I) dan kontrol perlakuan (III), didapat perubahan histopatologik epitel mukosa berupa displasia ringan, sedang dan berat.

Kelompok II dan IV yang selain diinduksi karsinogenesis kolon juga diberi seledri, gambaran mikroskopik yang ditemukan adalah hiperplasia dan displasia ringan.

Data Tabel 3 menunjukkan bahwa rerata skoring perubahan histopatologis mukosa kolon tikus wistar yang diberi injeksi 1,2 DMH s.c dan diet tinggi lemak dan protein (kelompok III) sebesar $2,70 \pm 0,82$ lebih tinggi

dibandingkan kelompok kontrol (kelompok 1). Sedangkan rerata skoring perubahan histopatologis mukosa kolon tikus wistar yang diberi injeksi 1,2 DMH s.c dan seledri selama 16 minggu yaitu sebesar $1,50 \pm 0,54$ (Kelompok V) lebih rendah dibanding kelompok II yang mendapat perlakuan yang sama selama 12 minggu.



Keterangan :

- ▭ = uji beda kelompok I vs II
- ▭ = uji beda kelompok III vs IV
- ▭ = uji beda kelompok II vs V

Gambar 3. Perubahan Histopatologis Epitel Mukosa Kolon Tikus Wistar

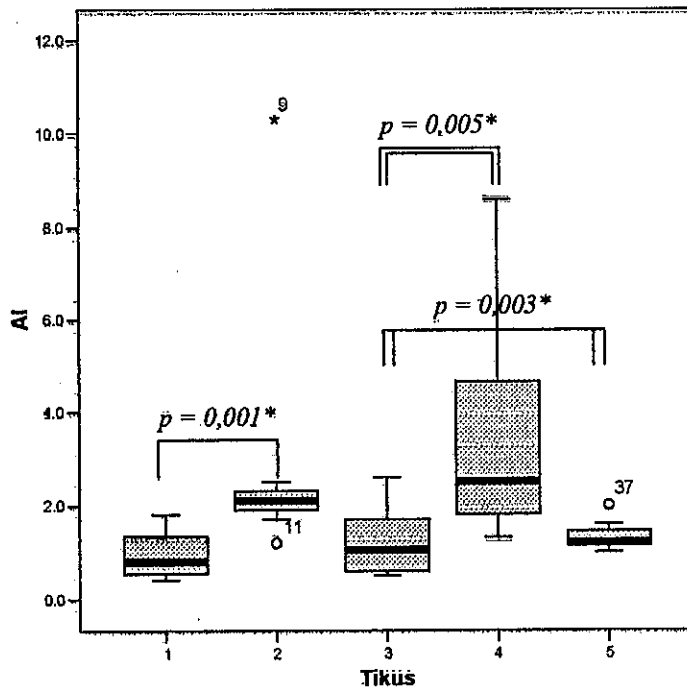
Gambar 3 memperlihatkan median dari kelima kelompok yang bervariasi. Median tertinggi diperlihatkan oleh kelompok III yaitu 2,50 , berarti perubahan histopatologis yang ditemukan berkisar diatas dan dibawah skor

tersebut. Hal yang sama ditemukan juga pada kelompok I, dengan area *box-plot* yang lebih besar di atas nilai tengah. Tetapi pada kelompok II dan IV, nilai tengah sama dengan kelompok I yaitu 2,00, hanya skor perubahan epitel berada sekitar atau dibawah median. Pada kelompok II, ada nilai *outlier* yaitu sampel 15.

Pada gambar 3 juga terlihat hasil uji beda antar kelompok perlakuan. Uji antar kelompok perlakuan terhadap skoring perubahan histopatologis mukosa kolon tikus wistar yang berbeda bermakna didapatkan pada perbandingan antara kelompok I dengan kelompok II ($p= 0,032$) dan antara kelompok III dengan IV ($p= 0,007$). Berdasarkan uji tersebut didapatkan perbedaan yang tidak bermakna pada perbandingan antara kelompok II dengan V ($p=0,067$).

5.2.2. Indeks Apoptosis

Tabel 4 menunjukkan bahwa rerata indeks apoptosis kelompok IV yang diberi injeksi 1,2 DMH s.c + diet tinggi lemak dan protein + seledri ($3,48 \pm 2,61$) adalah yang tertinggi dibanding kelompok lainnya. Sebaliknya rerata indeks apoptosis kelompok kontrol sebesar $0,95 \pm 0,52$ adalah yang paling rendah diantara lima kelompok tersebut. Rerata indeks apoptosis kelompok II, IV dan V (mendapat seledri) lebih rendah dibanding kelompok I dan III (tidak mendapat seledri).



Keterangan :

- ⌈ = uji beda kelompok I vs II
- ⌈ = uji beda kelompok III vs IV
- ⌈ = uji beda kelompok II vs V

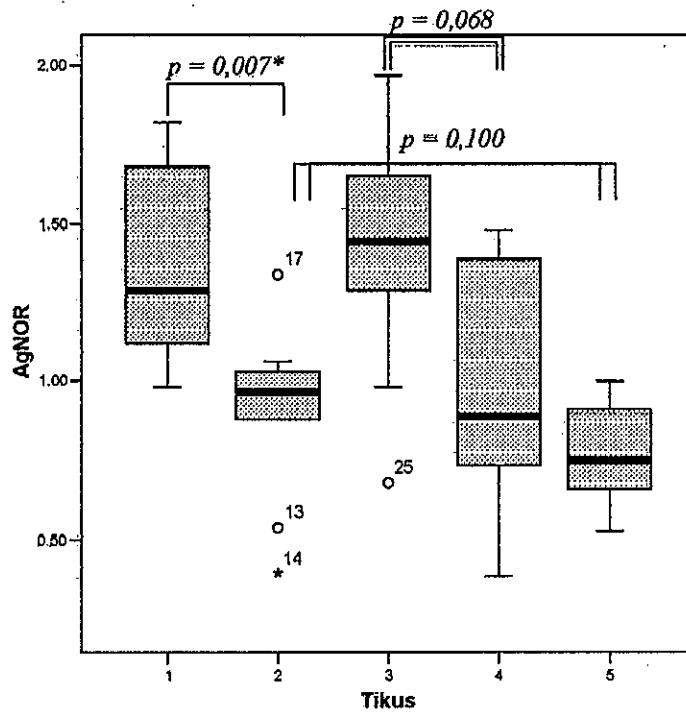
Gambar 4. Indeks Apoptosis

Pada gambar 4 terlihat bahwa variasi median kelima kelompok tidak terlalu jauh berbeda walaupun median indeks apoptosis kelompok IV adalah yang paling tinggi dibanding 4 kelompok lainnya. Median indeks apoptosis kelompok II, IV dan V yang semuanya diberi seledri selain diinduksi karsinogenesis kolon, lebih tinggi dibanding kelompok I dan III. Data *outlier* ditemukan pada kelompok II (sampel 9 dan 11) dan V (sampel 37).

Perbedaan yang signifikan didapatkan pada uji beda indeks apoptosis antara kelompok perlakuan I dengan II ($p=0,001$), kelompok III dengan IV ($p = 0,005$) dan kelompok II dengan V ($p=0,003$).

5.2.3. Aktivitas Proliferasi Sel (AgNOR)

Dari Tabel 3 terlihat bahwa rerata hitung AgNOR kelompok III yang diberi injeksi 1,2 DMH s.c + diet tinggi lemak dan protein ($1,44 \pm 0,40$) adalah yang tertinggi dibanding kelompok lainnya, sebaliknya rerata hitung AgNOR kelompok V sebesar $0,77 \pm 0,16$ adalah yang paling rendah. Rerata hitung AgNOR kelompok II, IV dan V (mendapat seledri) lebih rendah dibanding kelompok I dan III (tidak mendapat seledri).



Gambar 5. Aktivitas proliferasi sel (hitung AgNOR) tikus wistar

Grafik *box-plot* hitung AgNOR dari kelima kelompok perlakuan memperlihatkan variasi yang nyata. Pada gambar 5 terlihat bahwa median hitung AgNOR kelompok III adalah yang paling tinggi dibanding 4 kelompok lainnya dengan median terendah ditemukan pada kelompok V. Nilai tengah hitung AgNOR kelompok II, IV dan V yang semuanya diberi seledri selain diinduksi karsinogenesis kolon, lebih rendah dibanding kelompok I dan III. Masih ditemukan data *outlier* pada kelompok II (sampel 13, 14 dan 17) dan sampel 25 dari kelompok III.

Uji beda antar kelompok perlakuan terhadap hitung AgNOR antara kelompok I dengan kelompok II ($p= 0,007$) berbeda bermakna . Sedangkan uji beda yang berbeda tetapi tidak bermakna didapatkan pada perbandingan kelompok III dengan IV ($p=0,068,$) dan kelompok II dengan V ($p=0,100$).

BAB 6. PEMBAHASAN

Satu ekor tikus dari kelompok I, IV dan V mati pada minggu pertama sampai ke-empat. Dari otopsi ditemukan tanda-tanda aspirasi pneumonia (paru), perdarahan, degenerasi sampai nekrosis pada hepar, ginjal dan traktus gastrointestinal. Pada salah satu ekor tikus yang mati juga terbentuk semacam ulkus dekat daerah penyuntikan 1,2 DMH (abdomen). Pemeriksaan histopatologik dari daerah ulkus tersebut ditemukan nekrosis luas. *Hu Y et al* menemukan bahwa maksimum respon akut apoptotik terjadi dalam delapan jam setelah injeksi tunggal AOM dengan dosis 10 mg/kgBB³⁹. 1,2 DMH adalah bahan kimia yang bersifat sangat korosif dan dapat merusak kulit dan mata. Menghirup 1,2 DMH dapat meiritasi hidung, tenggorokan dan paru menyebabkan batuk dan sesak napas. 1,2 DMH juga menimbulkan gangguan pada hepar setelah paparan dalam waktu lama⁴⁰.

6.1. Pengaruh Pemberian Seledri terhadap Sel Mukosa Kolon Tikus Wistar

Kemopreventif berpotensi untuk menjadi komponen utama kontrol kanker kolorektal. Walaupun masyarakat ilmiah telah mengetahui kontribusi potensial kemopreventif untuk pencegahan dan kontrol kanker kolorektal, pendekatan optimal untuk preventif kanker ini adalah kombinasi antara manipulasi nutrisi dan pemberian bahan kemopreventif⁷⁷.

Seledri atau *Apium graveolens* telah lama dikenal di daerah Mediterania, dimana bijinya banyak dimanfaatkan sebagai obat⁷⁸. Kandungan senyawa dalam seledri antara lain *lutein*, *phthalid* (*3-n-butyl-phthalide=3-n-B, sedanolide*), *flavonoid* (*apigenin*) dan *furanocoumarins* (*psoralen, bergapten, angelicin*)^{10,12}.

Penelitian terdahulu baik epidemiologik maupun laboratorik telah membuktikan peran senyawa aktif dalam seledri tersebut terhadap pencegahan berbagai jenis kanker, termasuk kanker kolorektal.

6.1.1. Perubahan Histopatologis Mukosa Kolon

Pada penelitian ini dapat ditunjukkan bahwa perubahan histopatologis epitel mukosa kolon tikus wistar yang diberi seledri dilihat secara mikroskopik sebagian besar belum terbentuk adenoma dengan beberapa pengecualian pada 1-2 tikus dari kelompok II dan IV sedangkan berdasarkan skoring yang telah ditetapkan, adalah berupa hiperplasia dan displasia ringan. Rerata skoring perubahan histopatologis epitel mukosa kolon memperlihatkan bahwa kelompok II, IV dan V lebih rendah dibanding kelompok I dan III yang tidak diberi seledri.

Hasil yang ditemukan sesuai dengan yang diharapkan dimana dapat ditunjukkan bahwa seledri mampu menghambat perkembangan lesi karsinogenesis kolon. Analisis komparatif dengan *Mann-Whitney U Test* membuktikan bahwa perbedaan skoring perubahan histopatologis antara

kelompok I vs II dan III vs IV adalah signifikan, terbukti bahwa seledri bukan saja mampu menghambat karsinogenesis kolon pada tikus yang diinduksi dengan 1,2 DMH, tetapi juga 1,2 DMH yang disertai diet tinggi lemak dan protein.

Lutein adalah senyawa karotenoid, antioksidan, yang paling banyak mendapat perhatian karena mampu mengatur pertumbuhan sel, modulasi ekspresi gen dan peningkatan respon imun. Asupan *lutein* berhubungan dengan turunnya risiko kanker kolon. Induksi kanker kolon dengan pemberian injeksi 20 mg/kgBB DMH s.c 2x/minggu selama 3 minggu kemudian diberi *lutein* 0,05% dalam air minum (minggu 5-12), ternyata secara signifikan menurunkan jumlah kripte kolon tikus dibanding kelompok kontrol yang tidak diberi *lutein*⁷⁹. *Lutein* secara signifikan menurunkan insiden dan rerata jumlah tumor pada kolon tikus yang diinduksi karsinogenesis kolon dengan 1,2 DMH yaitu melalui perubahan pola mutasi *K-ras* dan *B-catenin* yang dapat dilihat dari analisis DNA (PCR)⁶¹. Studi oleh *Slattery M et al* (2000) memakai sampel penderita kanker kolorektal dan yang tidak, yaitu dengan menanyakan makanan yang dikonsumsi sejak dua tahun sebelum penyakitnya didiagnosis. Nutrient yang terkandung dalam makanan tersebut kemudian dikalkulasi dengan *database*. Ternyata dari semua karotenoid yang diteliti, hanya *lutein* dan *zeaxanthin* yang memperlihatkan efek protektif terhadap kanker kolon. Efek antioksidan *lutein* dan *zeaxanthin* berhubungan dengan kemampuannya untuk

menangkap radikal bebas pada membran sel kolon yang rentan terhadap karsinogen⁶³.

Apigenin dalam *Apium graveolens* berfungsi sebagai kalsium antagonis sehingga dapat menghambat kontraksi aorta tikus yang disebabkan oleh konsentrasi kalsium yang berlebihan dan menurunkan tekanan darah^{70, 80}. *Apigenin* mempunyai efek vasodilator, *anti allergenic*, *anti inflammmatory*, anti viral dan preventif terhadap kanker⁸¹. Efek kemopreventif *apigenin* telah dibuktikan secara in vitro maupun in vivo, salah satunya pada kultur sel dimana *apigenin* mampu menghambat transformasi dan angiogenesis, induksi siklus sel yang terhenti dan stimulasi *gap junctional* komunikasi interseluler⁶⁶.

Kandungan serat dalam seledri cukup tinggi yaitu 1,7 gram dalam 100 gram seledri mentah⁸². Diet kaya serat telah lama dihipotesiskan bersifat protektif terhadap kanker kolon. Salah satu mekanismenya yaitu serat dapat melarutkan asam empedu fecal, yang bersifat sebagai promoter tumor. Serat juga mempunyai efek dilusi sterol feces, sterol feces diduga dapat meningkatkan karsinogenisitas AOM^{77,83}. Penelitian lain menyatakan bahwa serat yang berasal dari batang/tangkai tumbuhan, yang mengandung senyawa *polymeric phenolic* seperti *lignin* dan *suberin*, bila didegradasi akan mengeluarkan asam ferulic dan asam hidroksinamik lainnya. Asam ini mempunyai potensi antioksidan, antimutagenik dan efek antikanker lainnya seperti modulasi ekspresi gen dan respon imun⁸⁴.

Masing-masing senyawa dalam seledri tersebut mempunyai jalur yang berbeda tetapi secara sendiri-sendiri atau bersama-sama mempunyai efek preventif terhadap kanker kolorektal.

6.1.2. Indeks Apoptosis

Pada keadaan transformasi keganasan, sel yang mengalami perubahan tersebut tidak dapat lagi disingkirkan dengan mekanisme apoptosis, oleh karena timbulnya mutasi gen pengatur apoptosis. Dalam keadaan demikian, terjadi resistensi apoptosis. Hal ini menjadi salah satu mekanisme kerja zat kemopreventif yaitu melalui peningkatan apoptosis.

Rerata indeks apoptosis kelompok yang diberi seledri (H,IV dan V) lebih tinggi dibanding kelompok kontrol dan kontrol perlakuan. Uji beda yang signifikan ditemukan pada perbandingan antara kelompok I dan II serta III dengan IV. Hasil ini membuktikan bahwa seledri dapat meningkatkan apoptosis pada sel epitel kolon yang diinduksi karsinogenesis dengan 1,2 DMH atau disertai diet tinggi lemak dan protein.

Belum ditemukan literatur yang menelaah melalui mekanisme apa senyawa aktif dalam seledri mampu meningkatkan apoptosis. *Sumantran VN et al* (2000) melaporkan bahwa ATRA dan *lutein* secara selektif menginduksi apoptosis pada sel yang bertransformasi menuju keganasan tapi tidak pada sel normal⁶². *Brown WA et al* (2001) mengatakan bahwa *COX inhibitor* menghambat karsinogenesis kolon pada hewan coba yang diinjeksi 1,2 DMH

melalui induksi apoptosis dan inhibisi proliferasi sel.⁸⁵ Kandungan serat dalam seledri dapat mengurangi pembentukan SBA. SBA selain sebagai promotor tumor, dapat menimbulkan transformasi keganasan dengan meningkatkan inflamasi⁶⁹.

Ada beberapa data ekstrim dari indeks apoptosis. Tikus 1 kelompok II, AI adalah 10,3, demikian juga tikus 3 kelompok IV, AI adalah 6,4 dan 8,6, jauh diatas rata-rata untuk kelompok tersebut. Belum diketahui penyebab peningkatan AI tersebut, disarankan penelitian yang lebih mendalam dengan metoda yang lebih sensitif.

6.1.3. Aktivitas Proliferasi Sel (AgNOR)

Pada awal progresifitas sel normal menjadi sel kanker, resistensi apoptosis selalu diikuti dengan peningkatan proliferasi sel³³. *Melen-Mucha* (2002) memberikan 1,2 DMH pada tikus Wistar jantan, dan menemukan bahwa terjadi peningkatan proliferasi dan penurunan apoptosis epitel kolon.⁴⁹

Pada penelitian ini terjadi peningkatan proliferasi sel pada kelompok I dan III yang diinduksi karsinogenesis kolon. Sebaliknya rerata hitung AgNOR pada kelompok yang diberi seledri lebih rendah dibanding kelompok yang tidak diberi seledri, menunjukkan aktivitas proliferasi sel pada kelompok yang diberi seledri berkurang walau sama-sama diinduksi karsinogenesis kolon. Uji beda yang signifikan didapatkan pada perbandingan kelompok I dengan II, membuktikan bahwa seledri dapat menurunkan aktivitas proliferasi sel pada

tikus yang diinduksi dengan 1,2 DMH. Tetapi uji beda yang bermakna tidak ditemukan pada perbandingan kelompok III dengan IV, walaupun hasilnya hampir mendekati yaitu $p = 0,068$. Dari hasil tersebut disimpulkan bahwa hal ini disebabkan jumlah sampel yang masih terlalu kecil.

COX inhibitor dapat menghambat aktivitas katalitik enzim COX dan sintesis prostaglandin. Dengan demikian *COX inhibitor* mampu menghambat transformasi sel, inhibisi proliferasi sel, angiogenesis dan inisiasi apoptosis⁸⁶.

Apigenin, juga berfungsi sebagai *COX-inhibitor*. LiangY-C et al (1999) melaporkan bahwa *apigenin* secara signifikan menghambat PG-E2, menurunkan COX-2 dan ekspresi iNOS. Selama infeksi dan inflamasi, tingginya produksi NO dapat menyebabkan kerusakan DNA sebagaimana mutasi *in vivo*⁸⁷.

Fermentasi serat oleh mikroflora usus akan membentuk *butyrate*. *Butyrate* mampu menghambat proliferasi sel dan menginduksi apoptosis. *COX-inhibitor* seperti NSAIDs juga dapat meningkatkan efek *butyrate* dengan *down-regulating* ekspresi COX-2⁸⁷.

6.2. Pengaruh Lama Pemberian Seledri

Berbagai sumber baik melalui perpustakaan dan internet telah ditelusuri tetapi sampai saat ini belum ditemukan studi yang meneliti efek lama pemberian seledri terhadap karsinogenesis kolon.

Seperti dapat dilihat pada tabel 2 dan 3, kelompok V yang diberi injeksi 1,2 DMH s.c dan seledri selama 16 minggu, perubahan histopatologis epitel mukosa kolon yang ditemukan adalah hiperplasia dan displasia ringan dengan rerata $1,50 \pm 0,54$ yang merupakan rerata perubahan histopatologis yang terendah dibanding 4 kelompok lainnya,. Rerata AI kelompok V adalah $1,33 \pm 0,32$ (dibanding 2 kelompok lain yang diberi seledri adalah yang terendah). Aktivitas proliferasi sel yang terlihat dari jumlah titik AgNOR dalam inti sel adalah yang terendah yaitu $0,77 \pm 0,16$. Grafik *box-plot* perubahan histopatologis (Gambar 3) menunjukkan bahwa median kelompok V adalah yang paling rendah. Hal serupa tampak pada grafik *box-plot* gambar 6 dimana median hitung AgNOR kelompok V adalah yang paling rendah.

Dari hasil-hasil tersebut diatas dapat dinyatakan bahwa seledri mampu menghambat karsinogenesis kolon dengan waktu pemberian yang lebih lama tetapi belum dapat diketahui efek pemberian seledri pada karsinogenesis kolon yang sudah mencapai tahap adenokarsinoma karena sampai akhir perlakuan 16 minggu, belum ditemukan keganasan kolon pada sampel yang ada. Menurut *Corpet DE et al (2002)*, adenoma dan adenokarsinoma membutuhkan waktu 5-8 bulan untuk terbentuk pada hewan coba yang diinduksi dengan karsinogen kimiawi⁴⁴.

Uji beda perubahan histopatologis dan aktivitas proliferasi sel antara kelompok II dengan V tidak bermakna. Perbedaan yang signifikan didapatkan pada uji beda indeks apoptosis antara kelompok II dan V.

Dapat disimpulkan bahwa efek protektif seledri terhadap inhibisi perkembangan karsinogenesis kolon melalui injeksi 1,2 DMH dengan waktu pemberian yang berbeda, dilihat dari perubahan histopatologis yang muncul maupun aktivitas proliferasi sel masih belum dapat dibuktikan. Sedangkan pengaruh seledri terhadap indeks apoptosis dengan lama pemberian yang berbeda telah dapat dibuktikan, berarti sel yang mengalami apoptosis akan lebih banyak bila pemberian seledri juga diperpanjang.

6.3. Keterbatasan dalam Penelitian

Penelitian ini mempunyai beberapa kelemahan yaitu :

- a. Waktu induksi karsinogenesis kolon dan pemberian seledri kurang lama sehingga tidak dapat dilihat efek seledri terhadap perubahan morfologik kolon yang lebih lanjut (adenokarsinoma).
- b. Khusus untuk indeks apoptosis, pengecatan HE bukanlah pengecatan spesifik untuk badan apoptotik sehingga hasil penghitungannya masih ada kemungkinan terjadi kekeliruan.
- c. Objektivitas penelitian belum sepenuhnya diterapkan.

BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Beberapa kesimpulan yang dapat ditarik dari penelitian ini adalah :

- 7.1.1. Seledri mampu menghambat perubahan histopatologis dari karsinogenesis kolon yang diinduksi dengan 1,2 DMH.
- 7.1.2. Seledri mampu meningkatkan indeks apoptosis dari karsinogenesis kolon yang diinduksi dengan 1,2 DMH.
- 7.1.3. Seledri mampu menghambat aktivitas proliferasi sel dari karsinogenesis kolon yang diinduksi dengan 1,2 DMH.
- 7.1.4. Seledri secara signifikan dapat menghambat perubahan histopatologis dan indeks apoptosis pada kolon yang diinduksi karsinogenesis dengan 1,2 DMH dan diet tinggi lemak dan protein.
- 7.1.5. Seledri secara signifikan terbukti mampu meningkatkan indeks apoptosis pada kolon tikus yang diinduksi dengan 1,2 DMH dalam waktu yang lebih lama.
- 7.1.6. Belum dapat dibuktikan efek seledri terhadap perubahan histopatologis dan aktivitas proliferasi sel kolon yang diinduksi 1,2 DMH dalam jangka waktu yang lebih lama.

7.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan jumlah sampel yang lebih besar dan memperpanjang masa induksi karsinogenesis kolon (5-8 bulan) sehingga didapatkan perubahan morfologik sel mukosa kolon yang lebih lanjut, untuk lebih mengetahui pengaruh seledri terhadap tumor tipe tersebut. Perlu juga penelitian lebih mendalam dengan variasi dosis dan penilaian toksisitas seledri.

Perlu pula dilakukan penelitian lanjutan untuk melihat dan membandingkan efek masing-masing senyawa aktif dalam seledri serta dosis yang efektif dalam menghambat karsinogenesis kolon, misalnya dengan mengekstraksi *apigenin* dan meneliti secara lebih mendalam fungsi *COX inhibitor* dari *apigenin* dan membandingkan dengan obat *COX inhibitor* yang sudah beredar di pasaran. Penelitian lanjutan disarankan juga untuk membandingkan efek senyawa aktif seledri dengan serat murni untuk lebih memahami peran senyawa aktif seledri terhadap karsinogenesis kolon.

DAFTAR PUSTAKA

1. National Cancer Institute. Screening for colorectal cancer [online]. [cited 2004 April 29]. Available from URL, : <http://www.jncicancerspectrum.oupjournals.org/cgi/pdq/jncipdq;CDR0000062753>.
2. I.Riwanto. Skrining dan surveilan karsinoma kolorektal perpaduan antara risiko kejadian terhadap biaya yang diperlukan. Media Medika Indonesiana 2003 : 38 (4) ; 167-77.
3. Sarjadi, Padmi Tri Hartini. Mapping kanker di Semarang dan sekitarnya. Media Medika Indonesiana 2001 : 36 (2) ; 87-92.
4. Yamada Y, Mori H. Pre-cancerous lesions for colorectal cancers in rodents : a new concept. Carcinogenesis [serial on the Internet] 2003 [cited 2004 June 15] ; 24 (6). Available from : URL : [_http://carcin.oupjournals.org/cgi/content/full/24/6/1015?](http://carcin.oupjournals.org/cgi/content/full/24/6/1015?)
5. Suhartono Taat Putra. Patologi molekuler kanker. Dalam : Biologi molekuler kedokteran. Edisi pertama. Surabaya : Airlangga University Press ; 1997 : 59-84.
6. Franks LM, Teich NM. Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. 3rd edition. Oxford : Oxford University Press, 1997 : 115.
7. Rosai J. Gastrointestinal tract. In : Ackerman's surgical pathology. 8th edition. St.Louis : Mosby 1996 : 754-77.
8. Northwestern colorectal institute. Alternative medicine as an adjunct in colorectal disease [online]. [cited 2004 April 29]. Available from URL, : <http://www.gisurgery.org/alternative.html>.

9. Craig WJ. Phytochemicals : guardian of our health. [online]. [cited 2004 April 26]. Available from URL, : <http://www.andrews.edu/NUFS/phyto.html>.
10. Information Alternative Medicine. Celery [online] 2001 [cited 2003 April 3]. Available from : URL ; : [http : /holistic-online.com/Herbal-Med/_Herbs/h212.htm](http://holistic-online.com/Herbal-Med/_Herbs/h212.htm).
11. Ayuningsih, Fajar. Seledri (*Apium graveolens*). Nirmala, 2002 : 49-51.
12. Kim JM, Araki S, Kim DJ, Park CB, Takasuka N, Toriyama-Baba H et al. Chemopreventive effects of carotenoids and curcumins on mouse colon carcinogenesis after 1,2 dimethylhydrazine initiation. Carcinogenesis [serial on the Internet] 1998 [cited 2003 Oct 8] ; 19. Available from : URL : <http://carcin.oupjournals.org/cgi/content/abstract/19/1/81?>
13. Zheng GO, Kenny PM, Lam LK. Chemopreventive of benzo (a) pyrene-induced forestomach cancer in mice by natural phthalides from celery seed oil. J. Nutr Cancer 1993 ; 19 : 77-86.
14. Celery seed-overview [online].2002 [cited 2003 Oct 7]. Available from : URL ; : [http : //www.umm.edu/altmed/ConsHerbs/CelerySeedch.html](http://www.umm.edu/altmed/ConsHerbs/CelerySeedch.html).
15. Newmark TM, Schulick P. Beyond aspirin : the COX-2 medical revolution. Hohm Press 2000 (Issue) : 96 .
16. Momin RA, Nair MG. Anti oxidant, cyclooxygenase and topoisomerase inhibitory compounds from *Apium graveolens* linn seeds. J. Phytomedicine 2002 ; 9 : 312-8.
17. Sun Y. Cyclooxygenase-2 overexpression reduces apoptotic susceptibility by inhibiting the cytochrome C-dependent apoptotic pathway in human colon cancer cells. Cancer Res 2002 ; 62 (2) : 6323-8.

18. Seppa, Nathan. Colon cancer treatment shows promise. (COX-2 inhibitors) (Brief Article). Issue 1998 ; 164 : 243.
19. Boggs W. In mice, COX-2 inhibitor prevents liver metastasis of colon cancer. *International Journal of Cancer* 2002 ; 100 : 515-9.
20. Taketo MM. COX-2 and colon cancer. *Inflamm Res* 1998 ; 47 (Suppl) 2 : S112-6.
21. Crawford JM, Liu C. The gastrointestinal tract. In : Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Cotran Pathologic basis of disease. Seventh edition. Philadelphia : Elseviers- Saunders, 1999: 857-66.
22. Quade G. Prevention of colorectal cancer. [online].2002 [cited 2004 April 29]. Available from URL,: <http://www.meb.uni-bonn.de/cancernet/304731.html>.
23. Joseph CA, Woo Y-T, Argus MF. Chemical induction of cancer. London : Academic Press, 1982 : 350-93.
24. Juergen EG. A diet rich in fat and poor in dietary fibre increases the in vitro formation of reactive oxygen species in human feces. *The Journal of Nutrition* 1997 ; 127 (5) : 706-9.
25. Fouad T. Multistage carcinogenesis. [online].1993 [cited 2004 April 29]. Available from URL,: <http://www.thedoctorslounge.net/oncolounge/articles/oxidcar/oxodcar1.htm>.
26. Trosko JE, Ruch RJ. Theory of carcinogenesis. [online].1998 [cited 2004 April 14]. Available from URL,: <http://www.bioscience.org/1998/v3/d/trosko/2.htm>.
27. Purnomo Suryohusodo. Dasar molekuler karsinogenesis. Dalam : Kapita selekta ilmu kedokteran molekuler. Jakarta : Sagung Seto ; 2000 : 102-120.

28. Soeripto, Indrawati, Indrayanti. Gastro-intestinal cancer in Indonesia. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2003 ; 4: 289-96.
29. Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Chang DK, Ricciardiello L, Carethers JM et al. Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer research* [serial on the Internet]. 2003 [cited 2004 Oktober 3] ; 63 . Available from : URL : <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/full/63/7/1608>.
30. Cancer.gov. Genetics of colorectal cancer. [online] [cited 2004 Oktober 14]. Available from URL: <http://www.cancer.gov/cancerinfo/pdq/genetics/colorectal>.
31. Welton ML, Varma MG, Amerhauser A. Colon, rectum and anus. In : Norton J et al (eds). *Surgery basic science and clinical evidence*. New York : Springer, 2001: 702-26.
32. Luceri C, De Filippo C, Caderni G, Gambacciani L, Salvadori M, Giannini A et al. Detection of somatic DNA alterations in azoxymethane-induced F344 rat colon tumors by random amplified polymorphic DNA analysis. *Carcinogenesis* [serial on the Internet] 2000 [cited 2003 Oct 8] ; 21 (9). Available from : URL : <http://carcin.oupjournals.org/cgi/content/full/21/9/1753>
33. Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Garewal H. Fields defects in progression to adenocarcinoma of the colon and esophagus. *Electronic journal of biotechnology* [serial on the Internet]. 2000 July {cited 2004 June 2] ; 3 (3). Available from : URL : <http://www.bioline.org.br/request/ej00018>.
34. Tjahjono. Analisis aktivitas proliferasi pada siklus sel. *MMI*.2002.37(1):1-8.

35. Ahmad Ghozali, Harijadi. Pewarnaan nucleolar organizer region (AgNOR) pada perubahan fibrokistik payudara. Berkala ilmu kedokteran. 1997. 29 (2) : 47-51.
36. Levin V. Colorectal cancer : prevention and early detection. [online]. [cited 2004 April 29]. Available from URL : <http://www.aaoc.org.ar/revista/vol3/levin.htm>.
37. Mariani SM. Apoptosis-a graceful death. Highlights from the 2003 annual meeting of the American association for cancer research. [online]. 2003 [cited 2004 May 15]. Available from : URL : <http://www.medscape.com/viewarticle/460891/mpid=19675>.
38. Payne C, Bernstein C, Bernstein H, Garewal H, Sampliner RE, Warneke J et al. Resistance to apoptosis in colon carcinogenesis. [online]. 1995 [cited 2004 May 31]. Available from : URL : <http://sup.ultrakohl.com/uscap/payne.htm>.
39. Hu Y, Martin J, Leu RL, Young GP. The colonic response to genotoxic carcinogens in the rat : regulation by dietary fibre. Carcinogenesis [serial on the Internet] 2002 [cited 2003 Oct 8] ; 23 (7). Available from : URL : <http://carcin.oupjournals.org/cgi/content/full/23/7/1131>
40. New Jersey Department of Health and Senior Services. Hazardous substance fact sheet. Available from : URL : <http://www.state.nj.us/health/eoh/rtkweb/1008.pdf>.
41. Povey AC, Badawi AF, Cooper DP, Hall CN, Harrison KL, Jackson Pe et al. DNA alkylation and repair in the large bowel : Animal and human studies. J.Nutr. [serial on the Internet]. 2002 November {cited 2004 Sept 2} ; 132 (11). Available from : URL : <http://www.nutrition.org/cgi/content/full/132/11/3518S>.

42. IARC. 1,2 dimethylhydrazine. [on line]. 1999 [cited 2004 Jan 2]. Available from : URL : <http://monographs.iarc.fr/htdocs/monographs/vol71/036-dimhydr..html>.
43. Bruce WR, Giacca A, Medline A. Possible mechanism relating diet and risk of colon cancer. *Cancer epidemiology biomarkers and prevention*. [serial on the Internet]. 2000 Dec [cited 2004 June 12] ; 9. Available from : URL : <http://cebp.aacrjournals.org/cgi/content/full/9/12/1271>.
44. Corpet DE, Tache S, Pierre F. Chemoprevention of colon cancer : systematic review of preclinical studies in rats & mice [online]. 2003 [cited 2003 Oct 4] . Available from : URL, : <http://corpet.free.fr/aom.html>.
45. Pretlow TP. Research interest [online]. Available from : URL, : http://www.cwru.edu/med/pathology/fac/pretlow_ter.htm
46. Papanikoloau A, Wang Q-S, Papanikoloau D, Whiteley HE, Rosenberg DW. Sequential and morphological analyses of aberrant crypt foci formation in mice of differing susceptibility to azoxymethane-induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* [serial on the Internet] . 2000 August [cited 2003 Dec 11] ; 21 (8): [about 6p]. Available from : URL, : <http://carcin.oupjournals.org/cgi/content/full/21/8/1567#T2>.
47. Wang Q-S, Walsh AM, Goldsby JS, Papanikoloau A, Bolt AB, Rosenberg DW. Preliminary analysis of azoxymethane-induced colon tumorigenesis in mouse aggregation chimeras. *Carcinogenesis* [serial on the Internet]. 1999 April [cited 2003 Nov 16] ; 20 (4) : [about 7p]. Available from : URL, : <http://carcin.oupjournals.org/cgi/content/full/20/4/691>.
48. The Cancer Journal. Colon cancer is the disease of the entire colonic mucosa. *The Cancer Journal* 1993 ; 6 (6): 309.

49. Melen-Mucha G, Niewiadomska H. Frequency of proliferation and their ratio during rat colon carcinogenesis and the their characteristic pattern in the dimethylhydrazine-induced colon adenoma and carcinoma. *J. Cancer Invest* 2002 ; 20(5-6) : 700-12.
50. No author. Cancer and dietary fat. . [on line]. 1999 [cited 2004 June 2]. Available from : URL : <http://www.fao.org/docrep/V4700E/V4700E0g.htm>.
51. DeRubertis FR, Craven PA. Relationship of bile salt stimulation of colonic epithelial phospholipid turnover and proliferative activity : role of activation of pretein kinase C1. *Prev Med [serial on the Internet]*. 1987 July [cited 2004 June16] ; 16 (4). Available from : URL, : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=retrieve&db=pubmed&list_uids=3628203&dopt=Abstract.
52. Reddy BS, Hirose Y, Cohen LA, Simi B, Cooma I, Rao CV. Preventive potential of wheat bran fractions against experimental colon carcinogenesis : complications for human colon cancer prevention. *Cancer research [serial on the Internet]*. 2000 Sept [cited 2004 June 23] ; 60. Available from : URL, : <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/full/60/17/4792>.
53. Ellmerich S, Scholler M, Duranton B, Gosse F, Galluser M, Klein J-P et al. Promotion of intestinal carcinogenesis by *Streptococcus bovis*. *Carcinogenesis [serial on the Internet]*. 2000 April [cited 2004 June 23] ; 60. Available from : URL, : <http://carcin.oupjournals/cgi/content/full/21/4/753>.
54. Parsonnet J. Bacterial infection as a cause of cancer. *Environ Health Perspect [serial on the Internet]*. 1995 Nov [cited 2004 June 25] ; 103. Available from : URL, :

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=retrieve&db=pubmed&list_uids=8741796&dopt=Abstract
55. Sanderson IR. The physicochemical environment of the neonatal intestine. American journal of Clinical Nutrition [serial on the Internet]. 1999 May [cited 2004 June 2] ; 69 (5). Available from : URL, : <http://ajcn.org/cgi/content/full/69/5/1028S>.
 56. Holistic Online. Celery. [on line]. 1998[cited 2004 Jan 2]. Available from : URL : http://holistic-online.com/Herbal-Med/_Herbs/h212.htm.
 57. No author. Celery seed. [on line]. 2002 [cited 2004 Jan 2]. Available from : URL : http://www.ivillagehealth.com/library/onemed/content/0,7064/241012_246599,00.html.
 58. Murray MT. Celery extract. [on line]. 2000 [cited 2004 Feb 2]. Available from : URL : <http://www.doctomurray.com/articles/pdfs/PADM4515CelerySeed.pdf>.
 59. Mann D. Produce may protect against colon cancer. Web MD Medical News. [online].2000 Feb [cited 2003 Dec 16] ; 9 . Available from : URL, : http://my.webmd.com/content/article/21/1728_55124.html.
 60. Constantinides P. Inflammation response. In : General pathobiology. Norwark .: Appleton & Lange. 1994 : 143-4.
 61. Villalon B, Gonzalez-Jasso E, Ramos-Gomez M, Salgado LM, Loarca-Pina FG, Reynoso R. Inhibitory effects of lutein on K-ras and B-catenin genetic alterations in rat colon carcinogenesis. IFT Annual Meeting July 12-16, 2004. Available from, : http://ift.confex.com/ift/2004/techprogram/paper_23368.htm.
 62. Sumantran VN, Zhang R, Lee DS, Wicha MS. Differential regulation of apoptosis in normal versus transformed mammary epithelium by lutein

- and retinoic acid. *Cancer epidemiology biomarkers and prevention* [serial on the Internet]. 2000 March [cited 2003 Dec 16] ; 9 . Available from : URL, : <http://cebp.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/9/3/257>.
63. Slattery ML, Benson J, Curtin K, Ma K-N, Schaeffer D, Potter JD. Carotenoids and colon cancer. *American Journal of Clinical Nutrition* [serial on the Internet]. 2000 February [cited 2004 January 22] ; 71 (2) : [about 8p]. Available from : URL, : <http://www.ajcn.org/cgi/content/full/71/2/575?>
64. New study links lutein to colon cancer risk reduction [online] 2003 [cited 2004 February 6]. Available from : URL : <http://www.luteininfo.com/1002.shtm>.
65. Kojima M . Association of enhanced cyclooxygenase expression with possible local immunosuppression in human colorectal carcinoma. *J. Exp Cell Res* 2001 ; 268(2) : 139-49.
66. Van Dross R, Xue Y, Knudson A, Pelling JC. The chemopreventive bioflavonoid apigenin modulates signal transduction pathways in keratinocyte and colon carcinoma cell lines. *J.Nutr.* [serial on the Internet] . 2003 November [cited 2004 January 23] ; 133 Suppl : [about 4p].. Available from : URL, : <http://www.nutrition.org/cgi/content/full/133/11/3800S>
67. Liang Y-C, Huang Y-T, tsai S-H, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin J-K. Suppression of inducible cyc;ooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* [serial on the Internet]. 1999 Oct [cited 2004 June 23] ; 20 (10). Available from : URL, : <http://carcin.oupjournals/cgi/content/full/20/10/1945>.

68. Kumis kucing dan seledri lolos uji klinis hipertensi. Suara Merdeka [online]. 2002 March. [cited 2003 Nov 7]. Available from : URL, : <http://www.suaramerdeka.com/harian/0203/25/ragam5.htm>
69. Young GP, Mason J, Cerda JJ. Gastroenterology [serial on the Internet]. 2000 June [cited 2004 June 7] ; 118 (6). Available from : URL, : <http://www.gastrojournal.org/scripts/om.dll/serve?action=searchDB&searchDBfor=art&artType=fullfree&id=a0060001235>
70. Food Causing Cancer [online]. 2002 [cited 2003 June 4]. Available from : URL, : <http://www.13.waisays.com/cancer.htm>
71. Medina V, Afonso JJ, Alvarez-Arguelles H, Hernandez C, Gonzalez F. Sodium butyrate inhibits carcinoma development in a 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon cancer. Journal of Parenteral & Enteral Nutrition [serial online] 1998 [cited 2003 Dec 27] ; 22 (Iss 1) : 14-7. Available from : Proquest Medical Library.
72. Fonseca LM, do Carmo MAV. AgNORS in hyperplasia, papilloma and oral squamous cell carcinoma. Universidade Federal de Minas Gerais. [on line] . 2000 [cited 2002 May 4]. Available from : URL, : [http://www.forp.usp.br/bdj/bdj11\(2\)/t05112.html](http://www.forp.usp.br/bdj/bdj11(2)/t05112.html)
73. Padi Tri Hartini. Hubungan antara hitung AgNOR dengan grading histologi pada karsinoma duktus infiltratif payudara. Thesis. Semarang 2002 : 22.
74. Pathology Outlines.com, LLC Colon (large bowel). [online]. May 2004 [cited 2004 Sept 24]. Available from : URL, : <http://www.pathologyoutlines.com/colon.html#adenomacarcinoma>.
75. Aihara M, Scardino PT, Truong LD, Wheeler TM, Goad JR, Yang G et al. The frequency of apoptosis correlates with the prognosis of gleason grade 3 adenocarcinoma of the prostate. Cancer 1995 ; 75 (2): 523-9.

76. Langlois NEI, Eremin O, Heys SD. Apoptosis and prognosis in cancer : rationale and relevance. (Review Article) . In : J.R.Coll.Surg.Edinb, 2000. Edinburgh . Available from : URL, : http://www.rcsed.ac.uk/journal/vol45_4/4540002.htm.
77. Reddy BS. Novel approaches to the prevention of colon cancer by nutritional manipulation and chemoprevention. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. [serial on the Internet]2000 March {cited 2004 Sept 1} ; 9 (3). Available from : URL : <http://cebp.aacrjournals.org/cgi/content/full/9/3/239>.
78. No author. Celery (*Apium graveolens* L). [online]. [cited 2004 July 24]. Available from : URL, : http://www-ang.kfunigraz.ac.at/~katzer/engl/generic_frame.html?Apiu_gra.html.
79. Schoenhals K. Fighting the good fight : a review of the natural products making headway against cancer [online]. [cited 2004 July 24]. Available from : URL, : <http://www.whsr magazine.com/articles/2a1cover.html>.
80. No author. Celery. [online]. [cited 2004 Sept 24]. Available from : URL, : <http://mung.pittsfieldrr.net/Plants/UMBELLIFERAE%20-%20Carrot/Apium%20graveolens%20-%20Celery.html>.
81. No author. Nature's powerful disease fighters and free radical neutralizers. <http://www.island.net/~diane ben/nature.htm>.
82. No author. Seledri, mentah. [online]. [cited 2004 August 24]. Available from : URL, : <http://www.asiamaya.com/nutrients/seledri.htm>.
83. Galloway DJ, Owen RW, Jarrett F, Boyle P, Hill MJ, George WD. Experimental colorectal cancer : the relationship of diet and faecal bile acid concentration to tumour induction. *Br.J.Surg.* 1986 ;73 ; 233-7.
84. Ferguson, LR, Chavan RR, Harris PJ. Changing concepts of dietary fiber : implications for carcinogenesis. *Nutrition and cancer*. [serial on the

- Internet]. 39 (2) Available from : URL :
<http://www.annieappleseedproject.org/dietfibcar.html>
85. Brown WA, Skinner SA, Malcontenti-Wilson C, Vogliagis D, O'Brien PE. Non-steroidal anti-inflammatory drugs with activity against either cyclooxygenase 1 or cyclooxygenase 2 inhibit colorectal cancer in a DMH rodent model by inducing apoptosis and inhibiting cell proliferation. *Gut*. [serial on the Internet] 2001 May [cited 2004 March 1] ; 48. Available from : URL :
<http://gut.bmjournals.com/cgi/content/full/48/5/660>.
86. Shiff SJ, Rigas B. The role of cyclooxygenase inhibition in the antineoplastic effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs). *J.Exp.Med.* [serial on the Internet] 1999 [cited 2004 March 1] ; 190 (4). Available from : URL : <http://www.jem.org/cgi/content/full/190/4/445>.
87. Zhang ZH, Ouyang Q, Gan HT. Targeting cyclooxygenase-2 with sodium butyrate and NSAIDs on colorectal adenoma/carcinoma cells. *World J Gastroenterol.* [serial on the Internet]. 2004 Oct[cited 2004 July 1] ; 10 (20). Available from : URL : http://www.wjgnet.com/1007-9327/abstract_eb.asp?f=2954&v=10.