

**PERBEDAAN EKSPRESI VEGF  
SEL ADENOKARSINOMA KOLOREKTAL  
TIKUS *Sprague Dawley*  
DENGAN DAN TANPA PEMBERIAN  
EKSTRAK *Phyllanthus niruri***

**THE DIFFERENCES OF VEGF EXPRESSION  
ON COLORECTAL ADENOCARCINOMA CELLS  
OF RAT (RATTUS SPRAGUE DAWLEYS)  
WITH AND WITHOUT OF *PHYLLANTUS NIRURI* EXTRACT  
ADMINISTRATION**



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

**Magister Ilmu Biomedik**

**Amin Samiasih  
G4A008027**

**PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG  
2010**

TESIS  
**PERBEDAAN EKSPRESI VEGF  
SEL ADENOKARSINOMA KOLOREKTAL  
TIKUS *Sprague Dawley*  
DENGAN DAN TANPA PEMBERIAN  
EKTRAK *Phyllanthus niruri***

disusun oleh

**Amin Samiasih  
G4A008027**

telah dipertahankan di depan Tim Penguji  
pada tanggal 23 September 2010  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,  
Pembimbing

Pembimbing I

Pembimbing II

**DR.dr.Winarto, SpMK, SpM (K)**  
NIP. 130 675 157

**Dr. H. Udadi Sadhana, M.Kes, Sp.PA**  
NIP. 131 967 650

Ketua Program Studi  
Magister Ilmu Biomedik  
Program Pasca Sarjana  
UNDIP

**DR.dr.Winarto, SpMK, SpM (K)**  
NIP. 130 675 157

## **PERNYATAAN**

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya 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, Agustus 2010

Amin Samiasih

## RIWAYAT HIDUP

### A. Identitas

1. Nama Lengkap : Amin Samiasih,SKp
2. Jenis kelamin/Agama : Perempuan/Islam
3. Tempat/Tanggal Lahir : Magetan 05 Oktober 1972
4. Alamat : PM I Jl Palapa Indah Blok GG no 13 Mranggen Demak.

### B. Riwayat Pendidikan

1. SDN Purwodadi Magetan Lulus tahun 1986
2. SMP Negeri I Karangmojo Lulus tahun 1989
3. SMA Negeri Maospati Lulus tahun 1991
4. AKPER DEP KES RI Jakarta Lulus tahun 1994
5. FIK Universitas Indonesia Lulus tahun 2000

### C. Riwayat Pekerjaan

1. Staf pengajar pada AKPER Muhammadiyah Semarang (1995-2003)
2. Staf pengajar pada Fikkes Universitas Muhammadiyah Semarang (2003-sekarang)

### D. Riwayat Keluarga

1. Nama Suami : M Ruyani
2. Tempat/ tanggal lahir : Sragen 21 September 1969
3. Nama Anak : Amalia Syifa El Islamy  
Tazkiatun Nafs El Hawwa  
Maulana Achsan Al Farisi  
Zahidah Muthi' As Zahra

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT penguasa dan sumber segala ilmu, berkat rahmat dan hidayahNya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis dengan judul Perbedaan Ekspresi VEGF Sel Adenokarsinoma Kolorektal Tikus *Sprague Dawley* Dengan dan Tanpa Pemberian Ekstrak *Phyllanthus niruri*.

Pada kesempatan ini kami ingin menyampaikan rasa terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional Republik Indonesia melalui program BPPS yang telah memberikan biaya studi bagi kami pada program studi Ilmu Biomedik.
2. Rektor Universitas Muhammadiyah Semarang yang telah memberi ijin dan kesempatan untuk melanjutkan studi pada program studi Ilmu Biomedik.
3. Dekan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang yang telah memberi ijin dan kesempatan untuk melanjutkan studi pada program studi Ilmu Biomedik.
4. Direktur Program Pascasarjana dan Pengelola Program Magister Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro yang telah memberi kesempatan untuk menimba ilmu pada program studi Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Diponegoro Semarang.
5. Dr.dr.Winarto, Sp.MK, Sp.M(K). selaku pembimbing pertama yang senantiasa memberi masukan yang berhubungan dengan tesis, demi kelancaran penulisan tesis ini.

6. dr. H. Udadi Sadhana, M.Kes, SpPA selaku pembimbing kedua yang meluangkan waktu membimbing, memberikan saran, masukan dan dorongan semangat dalam penyelesaian tesis ini.
7. Prof. Dr. dr. H. Tjahjono, Sp.PA (K), FIAC, Prof. dr. Edy Dharmana, PhD.. SpPar(K), dr Indra Wijaya, SpPA(K), Dr.drg.Henry Setyawan Susanto, Msc dan dr Neni Susilaningsih, M.si selaku narasumber yang telah banyak memberikan saran untuk penyelesaian tesis ini.
8. Dr dr Haryadi, SpPA(K) dan dr Noor Yazid, Sp.PA(K) yang senantiasa membimbing peneliti dalam mengenal pembacaan preparat.
9. Seluruh Staf Pengajar Program Studi Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Diponegoro yang telah banyak memberikan ilmu yang bermanfaat bagi penulis disaat menempuh pendidikan pada program studi tersebut.
10. Segenap teman-teman dosen program studi Keperawatan Universitas Muhammadiyah Semarang yang banyak membantu dan memberikan dorongan untuk penyelesaian penelitian.
11. Teman-teman Laboratorium Patologi Anatomi RS. Dr. Sarjito / FK UGM Yogyakarta dan segenap teknisi Laboratorium Unit Pengembangan Hewan Percobaan Universitas Gadjah Mada yang telah banyak membantu kelancaran pelaksanaan penelitian.
12. Berbagai pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu yang membantu penyelesaian tesis ini.

Semoga kebaikan dan bantuan dari pihak-pihak tersebut di atas mendapatkan imbalan yang berlipat dari Tuhan Yang Maha Esa. Amin. Kami menyadari adanya

kekurangan dalam melaksanakan penelitian ini, untuk itu masukan dan saran yang membangun sangat kami harapkan dan kami terima dengan tangan terbuka demi penyempurnaan dimasa yang akan datang.

Kami berharap agar hasil penelitian ini benar-benar dapat memberikan manfaat.

Amin Samiasih

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	Xi
DAFTAR GAMBAR	Xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRACT	Xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar belakang	1
1.2. Rumusan masalah	3
1.3. Tujuan penelitian	4
1.3.1. Tujuan Umum	4
1.3.2. Tujuan Khusus	4
1.4. Manfaat penelitian	4
1.5. Keaslian Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. <i>Phylantus niruri</i>	6
2.2. Adenokarsinoma Kolorektal	7-13
2.3. Proses Angiogenesis Dalam Tumor	13-15
2.4. VEGF dan Perannya Dalam Angiogenesis	16-19
2.5. Jejas Kimia	19-21
BAB III KERANGKA TEORI KERANGKA KONSEP HIPOTESIS	22

3.1.. Kerangka Teori	22
3.2.. Kerangka Konsep	23
3.3. Hipotesis	23
<b>BAB IV METODE PENELITIAN</b>	<b>24</b>
4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian	24
4.2. Lokasi dan Waktu Penelitian	25
4.3. Populasi dan Sampel	26
4.3.1. Populasi	26
4.3.2. Sampel	26-27
4.4. Variabel Penelitian	27
4.4.1. Variabel bebas	27
4.4.2. Variabel tergantung	27
4.5. Definisi operasional variabel	27
4.6. Bahan yang digunakan	28
4.7. Bahan utama	28
4.8. Bahan untuk pemeriksaan jaringan	28
4.9. Peralatan Penelitian	28
4.9.1. Alat untuk perawatan tikus	28
4.9.2. Alat prosesi jaringan	29
4.10. Tehnik Pengumpulan Data	29
4.10.1. Prosedur Perlakuan	29
4.10. 2. Prosedur Pengumpulan Data	31
4.10.3. Aklimatisasi	31

4.10.4. Jaringan Adenokarsinoma Kolorektal	31
4.11. Alur Penelitian	32
4.12 Analisa Data	32
4.13. Etika Penelitian	33
4.14. Klarifikasi <i>Conflic Of Interest</i>	33
4.15. Keterbatasan Penelitian	33
BAB V HASIL PENELITIAN	34
5.1. Gambaran Proses Penelitaian	34
5.2. Ekspresi VEGF	35-37
BAB VI PEMBAHASAN	38
6.1. Gambaran Proses Penelitian	38
6.2. Karsinogenesis	39-40
6.3. Peran VEGF pada angiogenesis Adenokarsinoma Kolorektal	41-43
6.4. <i>Phylnatus niruri</i>	43-44
BAB VII SIMPULAN DAN SARAN	45
7.1. Simpulan	45
7.2. Saran	45
DAFTAR PUSTAKA	46-50
LAMPIRAN	

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Contoh penelitian yang pernah dilakukan berkaitan	5
Tabel 2. Median ekspresi VEGF sel Adenokarsinoma Kolorektal	36
Tikus sprague Dawley pada kelompok kontrol dan perlakuan	

## **DAFTAR GAMBAR**

Gambar 1.	Enam Tanda Utama Kanker	<b>10</b>
Gambar 2.	Efek Ligan Reseptor terhadap Angiogenesis	<b>17</b>
Gambar 3.	Jejas sel akibat radikal bebas	<b>21</b>
Gambar 4.	Kerangka Teori	<b>22</b>
Gambar 5	Kerangka konsep	<b>23</b>
Gambar 6.	Alur Penelitian	<b>24</b>
Gambar 7.	Box Plot median Jumlah ekspresi VEGF	<b>36</b>
Gambar 8	Morfologi ekspresi VEGF sel Adenokarsinoma Kolorektal	<b>36</b>

tikus Sprague Dawley pada kelompok kontrol, perlakuan 1

## DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Dokumentasi penelitian
- Lampiran 2. Row data hasil pengamatan ekspresi VEGF
- Lampiran 3. Hasil distribusi frekuensi ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal tikus *Sprague Dawley* kelompok kontrol dan perlakuan.
- Lampiran 4: Hasil Uji Kappa Coeficiency ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal tikus Sprague Dawley  
Lampiran 3: Hasil Uji Kappa Coeficiency ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal tikus Sprague Dawley
- Lampiran 5. Hasil Uji normalitas data Ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal Tikus *Sprague Dawley* kelompok tanpa pemberian *Phylantus niruri* (K) dan dengan pemberian *Phylantus niruri*(P1)
- Lampiran 6. Hasil Uji Komparasi *Mann Withney* Ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal Tikus *Sprague Dawley* kelompok tanpa pemberian *Phylantus niruri* (K) dan dengan pemberian *Phylantus niruri*(P1).
- Lampiran 7. Prosedur Prosesing Jaringan
- Lampiran 8. Foto- foto Proses dan hasil penelitian
- .

## Abstrak

### Latar Belakang

Proses angiogenesis membentuk pembuluh darah baru untuk memenuhi kebutuhan nutrisi sel kanker. *Vascular endotelial growth factor* (VEGF) merupakan salah satu faktor penting dalam proses angiogenesis. Terapi anti-angiogenesis merupakan pendekatan baru dalam meningkatkan angka harapan hidup pasien kanker kolorektal. Obat tersebut membidik VEGF yang merupakan kunci terjadinya angiogenesis. Huang *et al* (2009) *Elagic acid* merupakan komponen aktif *P urinary* telah terbukti memperlihatkan aktifitas anti-angiogenesis. *Elagic acid* juga merupakan komponen aktif *P niruri*. Elagic acid also is p niruri active component.

### Tujuan

Tujuan penelitian ini menganalisis perbedaan ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal tikus *Sprague Dawley* dengan dan tanpa pemberian *Phyllanthus niruri*.

### Bahan dan metode

Jenis penelitian ini eksperimen laboratorik, *Randomized post test control-group only design*, dengan populasi tikus *Sprague Dawley* jantan. Bahan sediaan preparat dari sel adenokarsinoma kolorektal tikus *Spargue Dawley* dengan pengecatan imunohistokimia VEGF ab 1 *lab vision*. Jumlah sampel 6 pada tiap kelompok. Kelompok kontrol adalah sel adenokarsinoma kolorektal, sedangkan kelompok perlakuan sel adenokarsinoma kolorektal dengan pemberian *P niruri*. Jumlah ekspresi VEGF dihitung berdasarkan jumlah sitoplasma yang terwarnai coklat modifikasi Zlobec I *et al* (2003). Analisis data menggunakan uji statistik *Mann Withney*.

### Hasil

Ekspresi VEGF kelompok kontrol *mean* 24.50%. Ekspresi VEGF kelompok perlakuan *mean* 8.08%. Hasil analisis statistik uji *Mann Withney* ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal kelompok kontrol dan kelompok perlakuan nilai  $p < 0,025$  ( $\alpha < 0,05$ ).

### Simpulan

Ada perbedaan bermakna ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal dengan dan tanpa pemberian *P nirur*. Ekspresi VEGF kelompok perlakuan lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol.

**Kata kunci:** Adenokarsinoma Kolorektal, *Phyllanthus niruri*, VEGF.

## Abstract

### **Background**

Angiogenesis is a formation process of a new vein which supply nutrition for the cells of cancer. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is the main factor of an angiogenesis process. Anti-angiogenesis therapy was a new approach which shown a raised of life expectancy in patients with colorectal cancer. The medicine targeted VEGF which was the main key of the angiogenesis occurrence. Huang et al (2009) elagic acid is the active component P urinary has been showed anti-angiogenesis activity. Elagic acid also is P niruri active component.

### **Object**

The research object analyzes differences of VEGF adenokarsinoma colorectal cells both sprague dawley rat's with and without P niruri administration.

### **Material and Method**

The kinds of this research is laboratory experiment, *Randomized post test control-group only design* with *Sprague Dawley* rat's population. The material of specimen from adenocarcinoma colorectal cells staining with VEGF Ab 1 Lab Vision imunohistichemistry. Every group has six samples. Control group is adenocarcinoma colorectal cells, while treatment group adenocarcinoma colorectal cells with extract P niruri administration. Total of VEGF expression is counted based on cytoplasmic Zlobec I et al (2003) modification. Statistic data analysis use Mann Withney test.

### **Result**

Control group of VEGF expression *mean* 24.50%. Treatment group VEGF expression *mean* 8.08%. The result of statistic analysis Mann Withney test VEGF expression adenocrarsinoma colorectal cells control group and treatment group has p value 0,025 ( $\alpha$  0,05).

### **Conclusion**

There is a significant differences of VEGF's expression on colorectal adenocarcinoma cells with and without of Phyllantus niruri administration. Treatment group of VEGF expression less than control group.

**Keywords:** colorectal adenocarcinoma, Phyllantus niruri, VEGF.

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1. Latar Belakang**

Tingkat kejadian adenokarsinoma kolorektal meningkat di Asia termasuk Jepang dan Thailand. Insiden tertinggi kanker usus besar untuk laki-laki terlihat di Jepang dan untuk perempuan di New Zealand Selandia Baru. Tingkat kematian di Jepang dan di Thailand meningkat dengan cepat.<sup>1</sup>

Adenokarsinoma kolorektal merupakan salah satu jenis kanker yang menduduki urutan kedelapan tertinggi di negara berkembang dan menyebabkan metastasis pada kelenjar limfoid. Sedangkan di Indonesia pada tahun 2002 menduduki urutan ke-2 pada pria dan ke-3 pada wanita, serta terjadi kenaikan 1,8 per 100.000 penduduk.<sup>2</sup>

Adenokarsinoma kolorektal sebagaimana sel kanker lainnya, sulit disembuhkan dapat menyebabkan kematian pada pasien dan faktor yang terpenting dalam prognosinya adalah metastasis ke kelenjar limfoid. Pasien kanker kolon dinyatakan tetap hidup 5 tahun kemudian bila tidak terjadi metastasis ke kelenjar limfoid.<sup>3</sup>

Adenokarsinoma kolorektal adalah tumor ganas yang tersusun sebagai struktur kelenjar pada epitel kolorektal. Untuk pertumbuhan dan metastasis adenokarsinoma diperlukan proses angiogenesis. Angiogenesis merupakan proses terbentuknya pembuluh darah baru. *Vascular endothelial growth factor (VEGF)*

---

merupakan salah satu faktor penting dalam proses angiogenesis terutama pada adenokarsinoma. VEGF berkontribusi dalam neovaskularisasi tumor yang berespon untuk meningkatkan kebutuhan pengiriman nutrisi dan oksigen, hal ini dibutuhkan untuk keberlangsungan hidup sel tumor .<sup>4</sup>

Terdapat empat ligan VEGF dalam jaringan normal dan pada berbagai tahap kanker kolorektal, yaitu VEGF A, B, C, dan D. Dari ke-4 ligan tersebut, VEGF-A (umumnya dikenal sebagai VEGF) adalah yang paling sering diekspresikan dalam jaringan ganas dan tahapan adenoma *Dukes*. VEGF dapat dihasilkan oleh tumor itu sendiri, oleh jaringan sekitar atau oleh makrofag dan fibroblas yang menginfiltrasi. VEGF dapat memprediksi respon terapi konvensional sistemik atau lokal radiotherapi. Pada penelitian terhadap pasien, VEGF berhubungan dengan peningkatan risiko kekambuhan adenokarsinoma kolorektal. Penatalaksanaan kanker secara konvensional melalui pembedahan, radiasi, kemoterapi selain menghabiskan biaya yang tinggi juga dapat menimbulkan efek yang tidak ringan dan hasilnya pun masih kurang efektif untuk membunuh sel kanker. Perkembangan pengobatan melalui terapi pendamping menjadi tantangan baru. Penemuan terapi anti-angiogenesis merupakan pendekatan baru dimana angka harapan hidup pasien kanker kolorektal mulai menunjukkan grafik kenaikan. Obat tersebut membidik VEGF yang merupakan kunci terjadinya angiogenesis.<sup>5-7</sup>

Pada penelitian ini, ekstrak *P niruri* yang diberikan adalah 13,5 mg/kgBB//2 ml selama 4 hari. Ekstrak *P niruri* yang digunakan adalah produk

---

Stimuno®. Dosis yang diberikan telah dikonversi dari dosis anjuran penggunaan Stimuno® pada manusia dewasa ke dosis tikus.

Telah diteliti bahwa pemberian ekstrak *P niruri* dosis 10 mg/ml dan 100 mg/ml dalam waktu 48 jam ke sel mononuklear kanker payudara mempengaruhi viabilisasi sel mononuklear secara *in vitro*.<sup>8</sup> Penelitian terhadap Embrio ayam dan *human vascular endothelial cells* (HUVECs) menunjukkan bahwa komponen aktif *P urinaria ellagic acid* memperlihatkan aktifitas anti-angiogenik dan menghambat sekresi protein MMP-2 dari HUVECs.<sup>9</sup>

Penelitian tentang pemberian ekstrak *P niruri* terhadap adenokarsinoma kolorektal belum ada, oleh karena itu dilakukan penelitian payung yang akan membuktikan berbagai aspek efek pemberian ekstrak *P niruri* terhadap sel adenokarsinoma kolorektal pada tikus *Sprague Dawley*. Pada penelitian ini ingin membuktikan pengaruh *P niruri* terhadap ekspresi VEGF Adenokarsinoma Kolon pada tikus *Sprague Dawley*.

## **1.2. Rumusan masalah**

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah: Apakah ada perbedaan ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal pada tikus *Sprague Dawley* dengan pemberian ekstrak *P niruri* dan tanpa *P niruri*.

### **1.3. Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1. Tujuan umum**

Menganalisis perbedaan ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal pada tikus *Sprague Dawley* dengan pemberian ekstrak *P niruri* dan tanpa *P niruri*.

#### **1.3.2. Tujuan khusus**

1. Menghitung ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal pada tikus *Sprague Dawley* tanpa pemberian ekstrak *P niruri*.
2. Menghitung ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal pada tikus *Sprague Dawley* dengan pemberian ekstrak *P niruri*.
3. Menganalisis perbedaan ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal pada tikus *Sprague Dawley* dengan pemberian ekstrak *P niruri* dan tanpa *P niruri*.

### **1.4. Manfaat penelitian**

Adapun manfaat penelitian ini adalah:

1. Dapat dijadikan sumbangan pemikiran bahwa *P niruri* merupakan anti angiogenesis yang ditandai dengan penurunan ekspresi VEGF pada sel adenokarsinoma kolorektal dan sebagai titik tolak penelitian selanjutnya.
2. Pemberian pada pasien penderita adenokarsinoma kolorektal setelah dinyatakan keberhasilannya pada penelitian pra klinik dan klinik.

### 1.5. Orisinalitas Penelitian

Beberapa penelitian yang pernah dilakukan yang berkaitan dengan penelitian ini dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Contoh penelitian terkait yang pernah dilakukan:

Peneliti Penerbit dan tahun jurnal diterbitkan.	Disain	Hasil Penelitian
Chadijah, thesis , Undip, th 2003.	Post test dengan kelompok kontrol ( <i>Randomized post test control-group only design</i> ).Invitro	Pemberian ekstrak <i>P niruri L</i> dosis 10 mg/ml dan 100 mg/ml ke sel mononuklear mempengaruhi viabilizas sel mononuklear.
Sheng-Teng Huang, Chen Yu Wang, Rong Chi Yang, Hsiao Ting Wu, Su Hui Yang, Yung Chi Cheng, at al doi:10.1093/ecam/nep207 2009 Page 1 of 11.	Post test dengan kelompok kontrol ( <i>Randomized post test control-group only design</i> ). In Vivo	<i>Ellagic Acid</i> adalah komponen aktif <i>P. urinaria</i> memperlihatkan aktifitas anti-angiogenic dan menghambat sekresi protein MMP-2 dari HUVECs. <sup>9</sup>
Refita Septiani, skripsi, ITB, th 2009.	Post test dengan kelompok kontrol ( <i>Randomized post test control-group only design</i> ).In Vivo	Ekstrak <i>P.amarus</i> dapat meningkatkan kematian sel pada jaringan kanker yang dilihat melalui pengamatan histologi dan <i>P.amarus</i> dapat menurunkan proliferasi sel dan ekspresi PCNA pada jaringan kanker kelenjar payudara mencit galur C3H. <sup>10</sup>

Orisinalitas penelitian ini adalah pemberian ekstrak *P niruri* dosis 13,5 mg/kgBB/hari peroral selama 4 minggu pada tikus tikus *Sprague Dawley*, dilaksanakan secara *in vivo*. Variabel dalam penelitian adalah ekstrak *P niruri* dan ekspresi VEGF sel Adenokarsinoma Kolorektal. Untuk menimbulkan kanker kolon hewan coba diinduksi dengan 1,2 DMH.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### **2.1. *Phylanthus niruri***

Tumbuhan ini merupakan kerajaan *Plantae*, divisi *Magnoliophyta*, kelas *Magnoliopsida*, bangsa *Malpighiales*, suku *Phylanthaceae*, marga *Phylanthus*, jenis *Phylanthus niruri*. Sinonim *Phylanthus amarus*. *P niruri* tumbuh 50-70 cm tinggi dan bercabang. Kulit halus dan berwarna hijau. Buah kecil, butiran halus berisi benih. *P niruri*, dikenal secara lokal di Jawa Tengah sebagai "Meniran", ditemukan di sebagian besar daerah tropis dan daerah subtropis. Tanaman ini mengandung zat aktif *flavonoids*, *alkaloids*, *terpenoid*, *lignan*, *polyphenol*, *tannin*, *coumarin*, *elagic acid* dan *saponin*. Secara tradisional telah digunakan sebagai ekspektoran, anti demam, anti diare, diuretik dan obat untuk masalah kolik ginjal.

11

Efek ekstrak *P urinaria* sebagai antikanker berpotensi untuk menginduksi apoptosis dalam sel kanker manusia yang ditunjukkan oleh perubahan morfologi dan fragmentasi DNA. Ekstrak *P urinaria* tidak menunjukkan efek sitotoksik pada sel-sel manusia normal, termasuk vaskular sel endotel dan sel hati di bawah kondisi yang sama. Ini menunjukkan bahwa ekstrak dari *P urinaria* secara substansial berguna dalam mengobati berbagai jenis sel-sel kanker manusia tanpa efek samping beracun pada sel normal. Aktivitas anti tumor dalam ekstrak *P urinaria* telah dievaluasi efeknya terhadap tumor yang dikembangkan pada tikus dengan implantasi sel Lewis karsinoma paru-paru. Pada pemeriksaan metode

*Tunel* menunjukkan peningkatan apoptosis pada tumor tikus yang diobati dibandingkan dengan tikus kontrol. Neovaskularisasi tumor itu terhambat oleh potensi efek anti-angiogenik *P urinaria*.<sup>1,12</sup>

Aktivitas antitumor dan antikanker *P amarus* mungkin berhubungan dengan penghambatan aktivasi metabolik karsinogen serta penghambatan siklus sel regulator dan perbaikan .<sup>13</sup>

*Elagic acid* adalah komponen aktif *P Urinaria* dalam penelitian terhadap embrio ayam dan human *vascular endotelial cells* (HUVECs) memperlihatkan aktifitas anti-angiogenik dan menghambat sekresi MMP-2 dari HUVECs.<sup>9</sup>

Penelitian pada sel kanker payudara ditemukan pada kelompok dengan pemberian *P amarus* dosis 20 mg, 50 mg, dan 100 mg, tingkat kematian sel semakin meningkat seiring dengan penambahan dosis pemberian ekstrak *P amarus*. Hal ini menunjukkan semakin tinggi pemberian ekstrak *P amarus*, maka kematian sel pada jaringan kanker payudara semakin meningkat.<sup>10</sup>

Penelitian *in vitro* terhadap sel kanker payudara mencit C3H ditemukan bahwa pemberian ekstrak *P niruri L* dosis 10 mg/ml ke sel mononuklear terjadi penurunan viabilisasi sel mononuklear dan berbeda secara bermakna dengan kelompok kontrol.<sup>8</sup>

## **2.2. Adenokarsinoma Kolorektal**

Sebagian besar (lebih dari 95%) adenokarsinoma berkembang ketika mutasi terjadi dalam sel-sel yang melapisi dinding usus besar atau rektum. Penyakit ini sering dimulai sebagai polip usus, juga disebut adenoma, yang

merupakan pertumbuhan abnormal jaringan. Polip secara bertahap dapat menjadi pra-kanker dan kemudian kanker. Adenokarsinoma kolorektal adalah tumor ganas di jaringan epitel, khususnya dalam kelenjar yang terjadi sepanjang kolon sampai rektal.<sup>14,15</sup>

Prinsip mendasar pada kanker dimulai dari kerusakan genetik nonletal merupakan hal penting dalam karsinogenesis. Kerusakan atau mutasi genetik, mungkin didapat akibat pengaruh lingkungan, zat kimia, radiasi, atau virus atau diwariskan. Kanker dianggap sebagai kelompok penyakit selular dan genetik karena dimulai dari satu sel yang telah mengalami mutasi DNA sebagai komponen dasar gen. Sel-sel yang mengalami kerusakan genetik tidak peka lagi terhadap mekanisme regulasi siklus sel normal sehingga akan terjadi proliferasi tanpa kontrol. Mutasi yang terjadi pada DNA di dalam gen yang meregulasi siklus sel (pertumbuhan, kematian dan pemeliharaan sel) akan mengakibatkan penyimpangan siklus sel dan salah satu akibatnya adalah pembentukan kanker atau karsinogenesis.<sup>13,14</sup>

Mekanisme yang menyebabkan kanker menjadi progresif yaitu 1) Beberapa mutasi akan menyebabkan terjadinya proliferasi sel yang tidak normal yang pada gilirannya akan menjadi target untuk terjadinya mutasi yang berikutnya. 2) Beberapa mutasi akan mempengaruhi kestabilan *genom* secara keseluruhan baik pada tingkat DNA maupun pada tingkat kromosom yang meningkatkan laju terjadinya mutasi. Jalur mutasi yang akan mengarah ke arah perbanyakan sel yang tidak normal yaitu: 1) Hiperaktif gen-gen stimulator. Mutasi biasanya terjadi pada salah satu dari dua kopi gen yang terdapat pada sel. Gen yang mengalami mutasi

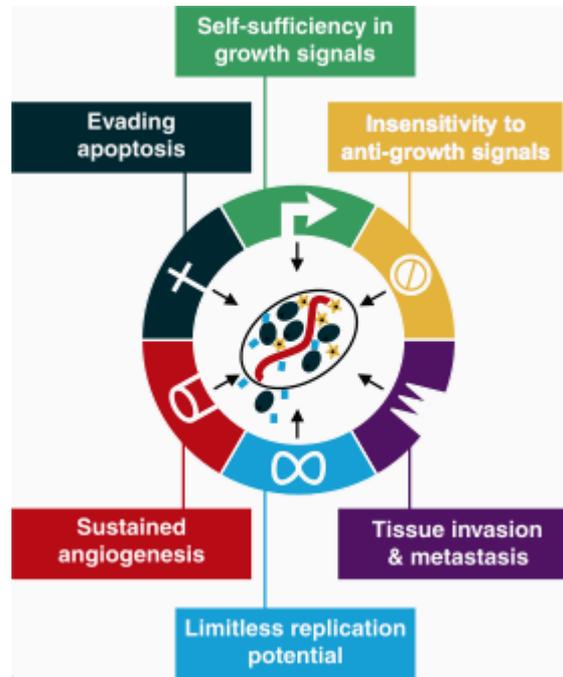
ini dikenal sebagai oncogen. Sementara gen pasangannya yang tidak mengalami mutasi dikenal sebagai protooncogen. 2) Inaktivasi gen-gen inhibitor. Mutasi jenis ini biasanya bersifat resesif artinya kedua gen yang berpasangan tersebut dibuat tidak aktif atau mengalami delesi sehingga tidak ada lagi hambatan terhadap proliferasi sel. Gen penghambat proliferasi sel ini dikenal sebagai tumor supressor gen.<sup>15-17</sup>

Berikutnya adalah gen regulatorik normal dan protooncogen yang mendorong pertumbuhan, gen penekan kanker (*tumor suppressor gen*) yang menghambat pertumbuhan (antionkogen) dan gen yang mengatur kematian sel terencana (*programmed cell death*) atau appoptosis adalah sasaran utama pada kerusakan genetik. Sedangkan gen yang mengatur perbaikan DNA yang rusak, berkaitan dengan karsinogenesis. Gen yng memperbaiki DNA mempengaruhi proliferasi atau kelangsungan hidup sel secara tidak langsung dengan mempengaruhi kemampuan organisme memperbaiki kerusakan nonletal di gen lain, dan gen yang mengendalikan apoptosis. Kerusakan gen yang memperbaiki DNA dapat memudahkan terjadinya mutasi luas dari genom dan trasformasi neoplastik.<sup>15-17</sup>

Patogenesis tumor diawali dari proses pertahanan homeostasis melalui keseimbangan antara proliferasi atau perkembang biakan sel dan kematian sel. Bila keseimbangan antara proliferasi dan kematian ini terganggu maka akan terjadi akumulasi sel atau kehilangan sel. Akumulasi sel terjadi bila laju kematian sel lebih rendah dibandingkan proliferasi sel atau laju proliferasi sel lebih tinggi dibandingkan kematian. Sebaliknya kehilangan sel akan terjadi bila laju kematian

sel lebih tinggi dari proliferasi atau laju proliferasi lebih rendah dari kematian sel.

17,18



Gambar 1 Enam tanda utama kanker.

Gambar ini menunjukkan tanda utama kanker yaitu: 1) *Self sufficiency* (menghasilkan sendiri) sinyal pertumbuhan, 2) Insensitivitas terhadap sinyal penghambat pertumbuhan, 3) Menghindari apoptosis, 4) Potensi replikasi tanpa batas (yaitu mengalahkan penuaan sel), 5) Angiogenesis berkelanjutan, 6) Kemampuan menginvasi dan beranaksebar.<sup>19</sup>

Perbanyakan sel dapat diatur baik secara langsung maupun secara tidak langsung. Regulasi proliferasi sel secara langsung yaitu melalui stimulasi siklus pembelahan sel (*cell division cycle*). Sedangkan secara tidak langsung yaitu dengan regulasi proses apoptosis. Penghambatan terhadap proses apoptosis mengakibatkan sel-sel yang seharusnya sudah "mati" akan mampu bertahan dan pada akhirnya akan mengganggu keseimbangan jumlah sel-sel yang ada. Kemungkinan dari suatu sel mengalami apoptosis dapat dipengaruhi oleh sejumlah rangsangan dari luar sel.<sup>20</sup>

Apoptosis atau sel mati terprogram menghapus sel yang memiliki kerusakan DNA yang berkelanjutan. Protooncogen Bcl-2 adalah inhibitor apoptosis. Peningkatan ekspresi Bcl-2 akan meningkatkan ketidakstabilan dengan menghambat apoptosis pada neoplasma kolorektal. Ekspresi fenotipik Bcl-2 dapat digunakan sebagai penanda molekuler dalam spesifik dari kanker kolorektal.<sup>20,21</sup>

Pembentukan pembuluh darah baru tumor dirangsang oleh faktor-faktor angiogenik seperti VEGF dan NF- $\kappa$ B/RelA. Hasil penelitian Imunohistokimia menunjukkan bahwa faktor ini memberikan kontribusi untuk angiogenesis tumor pada kanker kolorektal. Peningkatan ekspresi faktor ini diperantarai oleh VEGF. Bahkan, peningkatan ekspresi NF- $\kappa$ B/RelA disertai dengan peningkatan ekspresi VEGF. NF- $\kappa$ B/RelA adalah faktor transkripsi pleotropik yang memainkan peran penting dalam mengendalikan proliferasi sel dan apoptosis pada onkogenesis.<sup>21-23</sup>

Telah dilaporkan bahwa terjadi ekspresi yang tinggi *Cyclooxygenase* COX-2 di 70-90% dari kanker kolorektal dan dapat meningkatkan potensi karsinogenik. COX-2 mempengaruhi banyak proses yang berbeda yang penting dalam karsinogenesis seperti *xenobiotic metabolisme*, apoptosis, peradangan, imunosupresi, invasi kanker dan angiogenesis.<sup>24</sup>

*Dukes* mengklasifikasikan stadium adenokarsinoma kolorektal sebagai *Dukes A* tumor menembus ke dalam mukosa dari dinding usus tetapi tidak lebih jauh. *Dukes B 1* tumor menembus ke dalam, tetapi tidak melalui muscularis propria (lapisan otot) dari dinding usus. *Dukes B2* tumor menembus ke dalam dan melalui muscularis propria dari dinding usus. *Dukes C1* tumor menembus ke

dalam, tetapi tidak melalui muscularis propria dari dinding usus; ada bukti patologis kanker usus besar dalam kelenjar getah bening. *Dukes C2* tumor menembus ke dalam dan melalui muscularis propria dari dinding usus; ada bukti patologis usus besar kanker di kelenjar getah bening. *Dukes D* Tumor, yang telah menyebar di luar batas-batas kelenjar getah bening (untuk organ-organ seperti hati, paru-paru atau tulang).<sup>19,20</sup>

Penatalaksanaan konvensional terhadap penyakit Adenokarsinoma Kolorektal yaitu pembedahan, kemoterapi dan radioterapi. Penatalaksanaan pembedahan memerlukan modifikasi diet sampai menyembuhkan saluran pencernaan. Komplikasi mencakup sebagai berikut: reaksi alergi terhadap anestesi, pembentukan penyumbatan usus, pembentukan bekuan darah (misalnya, emboli paru), dan infeksi. Kemoterapi untuk adenokarsinoma kolorektal merupakan pengobatan sistemik (perjalanan ke seluruh tubuh melalui aliran darah) yang sering menggunakan kombinasi obat-obatan untuk memperlambat pertumbuhan tumor dan menghancurkan sel-sel kanker.<sup>21</sup>

Beberapa kasus, obat kemoterapi dapat menyebabkan alergi atau reaksi hipersensitivitas. Reaksi-reaksi ini, yang mungkin berat dan dipicu oleh respon sistem imun, dapat terjadi segera atau beberapa jam atau hari pengobatan. Penatalaksanaan kanker secara konvensional selain menghabiskan biaya yang tinggi juga dapat menimbulkan efek yang tidak ringan dan hasilnya pun masih kurang efektif untuk membunuh sel kanker. Perkembangan pengobatan melalui terapi pendamping menjadi tantangan. Terobosan baru melalui jalur imunomodulator untuk meningkatkan respon imun pasien kanker yang cenderung

mengalami penurunan. Penemuan terapi anti-angiogenesis juga merupakan pendekatan baru dimana angka harapan hidup pasien kanker kolorektal mulai menunjukkan grafik kenaikan. Obat tersebut membidik VEGF yang merupakan kunci terjadinya angiogenesis.<sup>6,7, 25-28</sup>

### **2.3. Proses Angiogenesis Dalam Tumor**

Angiogenesis adalah proses yang penting untuk pertumbuhan neoplasma dari tumor yang berukuran kecil yang terlokalisir menjadi tumor yang besar yang punya kemampuan metastasis. Faktor-faktor angiogenik dapat dihasilkan oleh tumor itu sendiri, oleh jaringan sekitar tumor, atau oleh makrofag dan fibroblas yang menginfiltrasi.<sup>28</sup>

Proses angiogenesis dalam tumor berlangsung dengan urutan sebagai berikut: 1) Tumor atau jaringan yang rusak memproduksi dan melepaskan faktor pertumbuhan angiogenik (protein) yang kemudian berdifusi ke jaringan sekitar. 2) Faktor angiogenik tersebut kemudian berikatan dengan reseptor spesifik yang berada pada sel-sel endotel yang berdekatan dengan pembuluh darah lama. 3) Segera setelah faktor angiogenik berikatan dengan reseptornya sel-sel endotel menjadi aktif. Sinyal-sinyal dikirim dari permukaan sel ke nukleus. Mesin sel endotel mulai memproduksi molekul-molekul baru termasuk diantaranya enzim-enzim. 4) Enzim mencerna lubang-lubang kecil pada membrana basalis, yang menyelubungi seluruh pembuluh darah yang ada. 5) Sel-sel endotel mulai berproliferasi dan kemudian migrasi keluar melalui lubang-lubang pembuluh darah yang telah tercerna tadi menuju jaringan tumor. 6) Molekul-molekul

spesifik seperti molekul adhesi atau integrin berperan sebagai pengait untuk menarik tunas-tunas pembuluh darah yang baru untuk menyebar. 7) Enzim-enzim tambahan *matrix metalloproteinase* (MMPs) diproduksi untuk mencernakan jaringan di depan ujung tunas pembuluh darah sehingga dapat ditempati. Bersamaan dengan perluasan pembuluh darah, jaringan terbentuk disekitar pembuluh darah. 8) Tunas-tunas sel-sel endotel tadi kemudian menggulung untuk membentuk membrana basalis baru yang tumbuh menjadi lumen pembuluh darah. 9) Masing-masing lumen pembuluh darah baru saling beranastomosis membentuk jaringan pembuluh darah yang berfungsi mengalirkan darah. 10) Akhirnya lumen pembuluh-pembuluh darah baru yang telah terbentuk diperkuat oleh sel-sel otot khusus (sel otot polos, perisit) yang melengkapi struktur pendukung. Aliran darah kemudian dimulai.<sup>27-28</sup>

Mekanisme "*Angiogenic Switch*" dipengaruhi oleh faktor pro-angiogenik dan anti-angiogenik. Hal ini menunjukkan bahwa sejumlah faktor yang ada, beberapa di antaranya menyebabkan pembentukan pembuluh darah baru dan yang lain menghambat proses pembentukan pembuluh darah baru. Agar pertumbuhan tumor berlanjut, perlu untuk memiliki faktor pro angiogenik dalam jumlah yang berlimpah. Selain pelepasan faktor angiogenik oleh tumor sel sendiri, sel-sel lain juga direkrut ke dalam proses angiogenik, diantaranya adalah trombosit dan makrofag. Kerapatan pembuluh darah baru sebagai penanda kemajuan angiogenesis mencerminkan adanya pertumbuhan yang baru. Angiogenesis tumor dimulai bersamaan dengan dilepasnya molekul oleh sel kanker yang memberi sinyal ke sekitar jaringan pejamu yang normal. Sinyal ini mengaktifasi gen-gen

tertentu dalam jaringan pejamu yang sebaliknya menghasilkan protein yang memacu neovaskularisasi.<sup>25-30</sup>

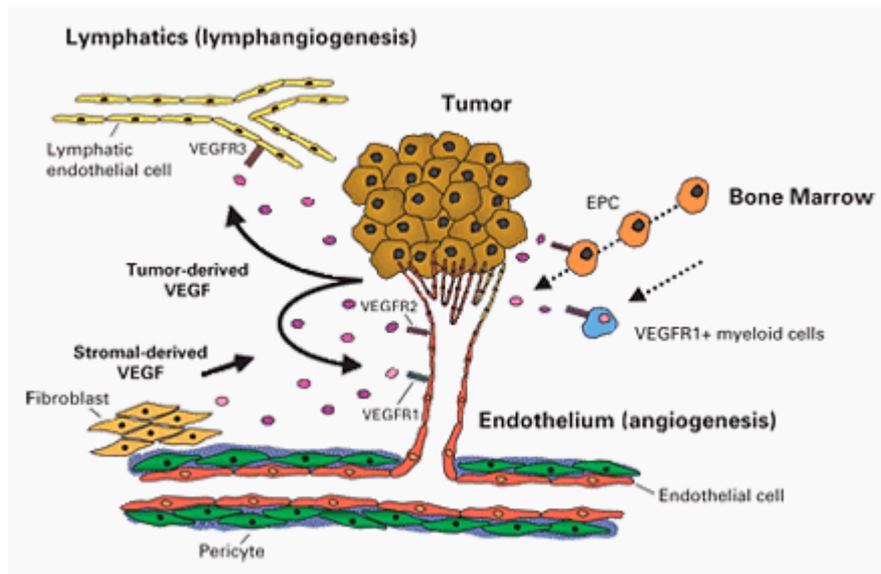
Angiogenesis dalam tumor melibatkan faktor-faktor angiogenik antara lain bFGF, VEGF, *angiogenin*, *transforming growth factor  $\alpha$*  (TGF  $\alpha$ ), *thrombopoitin*, *angiopoitin I*, sitokin, enzim-enzim angiogenik, *indirect activated factor* seperti TNF  $\alpha$  dan sel NK. Faktor-faktor angiogenik dapat dihasilkan oleh tumor itu sendiri, oleh jaringan sekitar atau oleh makrofag dan fibroblas yang menginfiltrasi. Sebagian besar faktor-faktor angiogenik tersebut bekerja melalui reseptor-reseptor pada permukaan sel endotel, dimana mereka berikatan, yang kemudian menyebabkan sekresi dari faktor angiogenik lainnya. Selain itu keadaan-keadaan berikut seperti hipoksi, hipoglikemi, dan stres mekanik dapat menjadi stimulator juga.<sup>31-32</sup>

Dalam keganasan, telah dibuktikan adanya korelasi langsung antara kepadatan pembuluh darah dan perkembangan penyakit. Dalam penelitian dibuktikan bahwa berbagai sitokin atau faktor pertumbuhan berperan penting dalam karsinogenesis dan proliferasi tumor. Faktor pertumbuhan vaskuler (VEGF) adalah sitokin multifungsi yang berpotensi merangsang angiogenesis, termasuk neovaskularisasi neoplastik. Penelitian ini juga membuktikan bahwa ada hubungan antara peningkatan ekspresi dari VEGF, metastasis, dan prognosis buruk pasien dengan adenokarsinoma kolorektal.<sup>25-28</sup>

#### **2.4. Vascular Endotelial Growth Factor (VEGF) dan Perannya dalam Angiogenesis.**

Jaringan tumor diketahui mensekresi faktor angiogenik (faktor angiogenesis tumor) yang mengaktifkan pembentukan pembuluh darah baru di sekitar tumor. Salah satu faktor angiogenik tersebut adalah *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) yang strukturnya mirip dengan *platelet derived growth factor* (PDGF). VEGF adalah sinyal kimia yang diproduksi oleh sel-sel yang merangsang pertumbuhan pembuluh darah baru. Ini adalah bagian dari sistem yang mengembalikan pasokan oksigen ke jaringan-jaringan bila sirkulasi darah tidak memadai. VEGF terdiri dari 6 jenis, yaitu : VEGF-A atau sering disebut VEGF, PlGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D dan VEGF-F.. Yang terakhir yang ditemukan kemudian dari VEGF-A, dan, sebelum penemuan mereka, VEGF-A disebut hanya VEGF. Sejumlah protein VEGF-terkait juga telah ditemukan dikodekan oleh virus (VEGF-E) dan di racun dari beberapa ular (VEGF-F).<sup>26-28</sup>

Aktivitas VEGF, seperti namanya, telah dipelajari terutama pada sel-sel vaskular endotelium, meskipun tidak memiliki efek pada beberapa jenis sel lain (misalnya, stimulasi monosit / migrasi makrofag, neuron, sel-sel kanker, ginjal sel epitel). Pada *vitro*, VEGF telah ditunjukkan untuk merangsang sel endotel mitogenesis dan migrasi sel. VEGF juga merupakan mikrovaskuler vasodilator dan meningkatkan permeabilitas dan awalnya disebut sebagai faktor permeabilitas vaskular.<sup>26-28</sup>



Gambar 2 Efek dari ligand VEGF dan reseptornya terhadap proses angiogenesis. Semua jenis VEGF merangsang tanggapan selular dengan cara mengikat *kinase tirosin* reseptor (VEGFRs) pada permukaan sel, menjadi bentuk dimer dan aktif melalui *transphosphorylation*, VEGF mengikat Fetal liver kinase 1 (Flt-1) VEGFR-1 dan fibroblast like tyrosin kinase (KDR/Flk-1) VEGFR-2. VEGFR-2 muncul untuk menengahi hampir semua tanggapan selular yang dikenal VEGF. Fungsi VEGFR-1 diduga memodulasi sinyal VEGFR-2. Fungsi lain VEGFR-1 dapat bertindak sebagai umpan reseptor, sequestering VEGF mengikat VEGFR-2 (ini tampaknya sangat penting selama vasculogenesis pada embrio). VEGF-C dan VEGF-D adalah ligan untuk reseptor ketiga (VEGFR-3), yang menjadi perantara *lymphangiogenesis*.<sup>26</sup>

Ekspresi VEGF dipengaruhi oleh rangsangan pada pejamu antara lain estrogen, nitric oxide (NO), dan berbagai macam factor pertumbuhan seperti *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ), TGF  $\beta$ , EGF, IGF1 dan sitokin inflamasi seperti IL-6. Sejalan dengan perannya dalam angiogenesis tumor, ekspresi VEGF meningkat oleh adanya perubahan genetic kearah ganas, termasuk hilangnya gen suppressor tumor p 53 dan aktivitas onkogen seperti K-ras, Vsrc, E6 dan Her2.<sup>26-28</sup>

Faktor pertumbuhan angiogenesis adalah VEGF, bFGF, dan faktor pertumbuhan *hepatocyte*. Regulator positif lainnya adalah angiotropin, angiogenin, faktor pertumbuhan epidermal, koloni-merangsang granulocyte

faktor, *interleukin-1* (IL-1), IL-6, IL-8, PDGF, TNF- $\alpha$ , dan matriks protein, seperti kolagen dan integrins. Beberapa enzim proteolitik penting untuk angiogenesis termasuk cathepsin, urokinase-type plasminogen aktivator, gelatinases A / B, dan stromelysin.<sup>26-28</sup>

Produksi VEGF dapat diinduksi dalam sel yang tidak menerima cukup oksigen. Ketika sebuah sel kekurangan oksigen, menghasilkan *induce hipoksia-factor* (HIF), faktor transkripsi. HIF merangsang pelepasan VEGF, antara fungsi-fungsi lainnya (termasuk modulasi erythropoiesis). Beredar VEGF kemudian mengikat Reseptor VEGF pada sel endotel, memicu *Tirosin kinase Pathway* menuju angiogenesis. HIF1  $\alpha$  dan HIF1 $\beta$  terus-menerus diproduksi tetapi HIF1  $\alpha$  O<sub>2</sub> sangat labil, jadi, dalam kondisi aerobik, itu rusak. Ketika sel menjadi hipoksia, HIF1  $\alpha$  tetap dan kompleks HIF1  $\alpha$  /  $\beta$  merangsang pelepasan VEGF. Setelah dibebaskan, VEGF dapat menimbulkan beberapa tanggapan. Ini dapat menyebabkan sel untuk bertahan hidup, memindahkan, atau lebih membedakan. Oleh karena itu, VEGF adalah sasaran potensial untuk pengobatan kanker.<sup>26-30</sup>

Angiogenesis merupakan proses bertahap, dan VEGF bekerja pada beberapa tingkatan yaitu: 1) VEGF adalah mitogen potensial spesifik untuk sel-sel endotel pembuluh darah. 2) VEGF memperantarai sekresi dan aktivasi enzim-enzim yang berperan dalam degradasi matriks ekstra seluler. 3) VEGF berperan sebagai faktor yang mempertahankan sel-sel endotel dari apoptosis. 4) VEGF penting untuk memobilisasi prekursor sel-sel endotel pada sumsum tulang dalam memulai proses vaskularisasi. 5) Selain memulai pembelahan sel-sel endotel,

VEGF juga mempunyai peranan penting dalam merangsang migrasi sel-sel endotel tersebut pada tempat angiogenesis.<sup>28,30</sup>

VEGF dapat dideteksi baik pada sitosol jaringan maupun dalam sirkulasi seperti plasma dan serum penderita. Suatu penelitian menyebutkan bahwa ada hubungan positif antara peningkatan densitas mikrovaskular dengan peningkatan ekspresi VEGF serta beratnya penyakit.<sup>26-28,30</sup>

Angiogenesis merupakan aspek penting dalam pertumbuhan tumor, meneruskan seluruh tahapan degradasi extracellular matrix (ECM) terlebih pengaruh migrasi matrix metalloproteinases (MMPs), proliferasi sel endotel vaskuler dan maturasi respon lokal pembentukan pembuluh darah baru.<sup>9, 24, 26,30</sup>

## **2.5. Jejas Kimia**

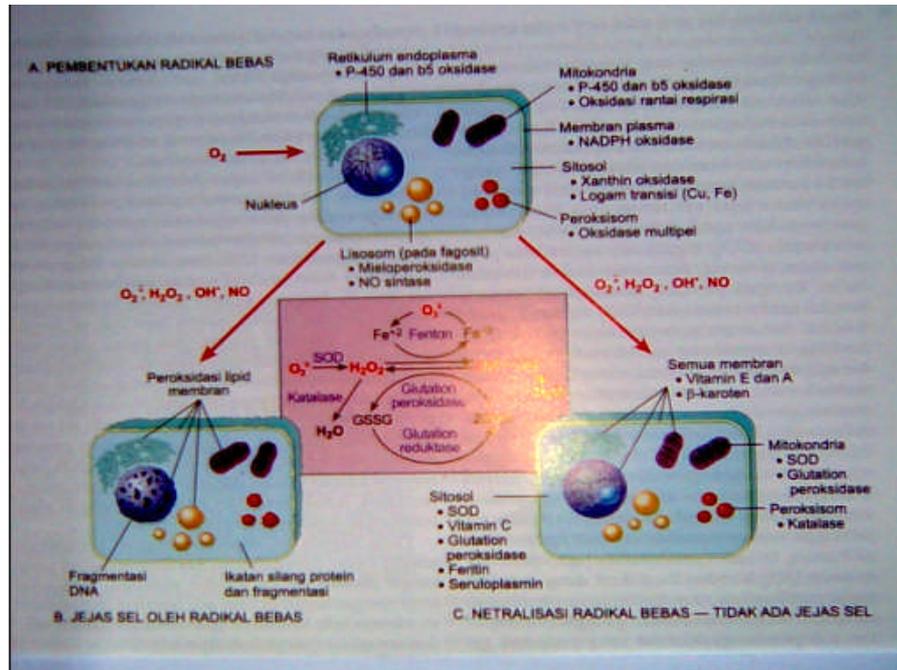
Ketika mengalami stres fisiologis atau rangsang patologis, sel bisa beradaptasi mencapai kondisi baru dan mempertahankan kelangsungan hidupnya. Apabila kemampuan adaptif berlebihan sel mengalami jejas. Dalam batas tertentu bersifat *reversibel* dan sel kembali ke kondisi stabil semula. Stres yang berat atau menetap menyebabkan cedera *irreversibel* dan sel yang terkena mati.<sup>32.</sup>

Salah satu penyebab cedera sel adalah bahan kimia. Semua bahan kimia dapat menyebabkan jejas sel. Bahan tersebut dapat menyebabkan kerusakan pada tingkat seluler dengan mengubah permeabilitas membran, homeostasis osmotik, keutuhan enzim atau kofaktor dan dapat berakhir dengan kematian seluruh organ. Zat kimia menginduksi cedera sel melalui cara langsung yaitu bergabung dengan komponen molekuler kritis atau organel seluler. Kondisi ini kerusakan terbesar

tertahan oleh sel yang menggunakan, mengabsorpsi, mengekskresi, atau mengonsentrasikan senyawa. Banyak zat kimia lain yang tidak aktif secara intrinsik biologis, tetapi pertama kali harus dikonversi menjadi metabolit toksik reaktif yang kemudian bekerja pada sel target.<sup>33</sup>

Bahan kimia seperti 1,2 DMH menerima atau mendonor elektron bebas selama reaksi intrasel sehingga mengkatalisis pembentukan radikal bebas. Terdapat 3 reaksi jejas sel yang diperantarai radikal bebas yaitu peroksidase lipid membran, fragmentasi DNA, ikatan silang protein. Ikatan ganda pada lemak tidak jenuh membran mudah terkena serangan radikal bebas berasal dari oksigen. Interaksi radikal lemak menghasilkan peroksida yang tidak stabil dan reaktif dan terjadi reaksi autokatalitik. Reaksi radikal bebas dengan timin pada DNA mitokondria dan nuklear menimbulkan rusaknya untai tunggal. Kerusakan DNA tersebut telah memberikan implikasi pada pembunuhan sel dan perubahan sel menjadi ganas. Radikal bebas mencetuskan ikatan silang protein yang diperantarai sulfhidril, menyebabkan peningkatan kecepatan degradasi atau hilangnya aktifitas enzimatis.<sup>33</sup>

Reaksi radikal bebas juga bisa secara langsung menyebabkan fragmentasi polipeptida. Mekanisme ini diperjelas pada gambar 3 berikut:



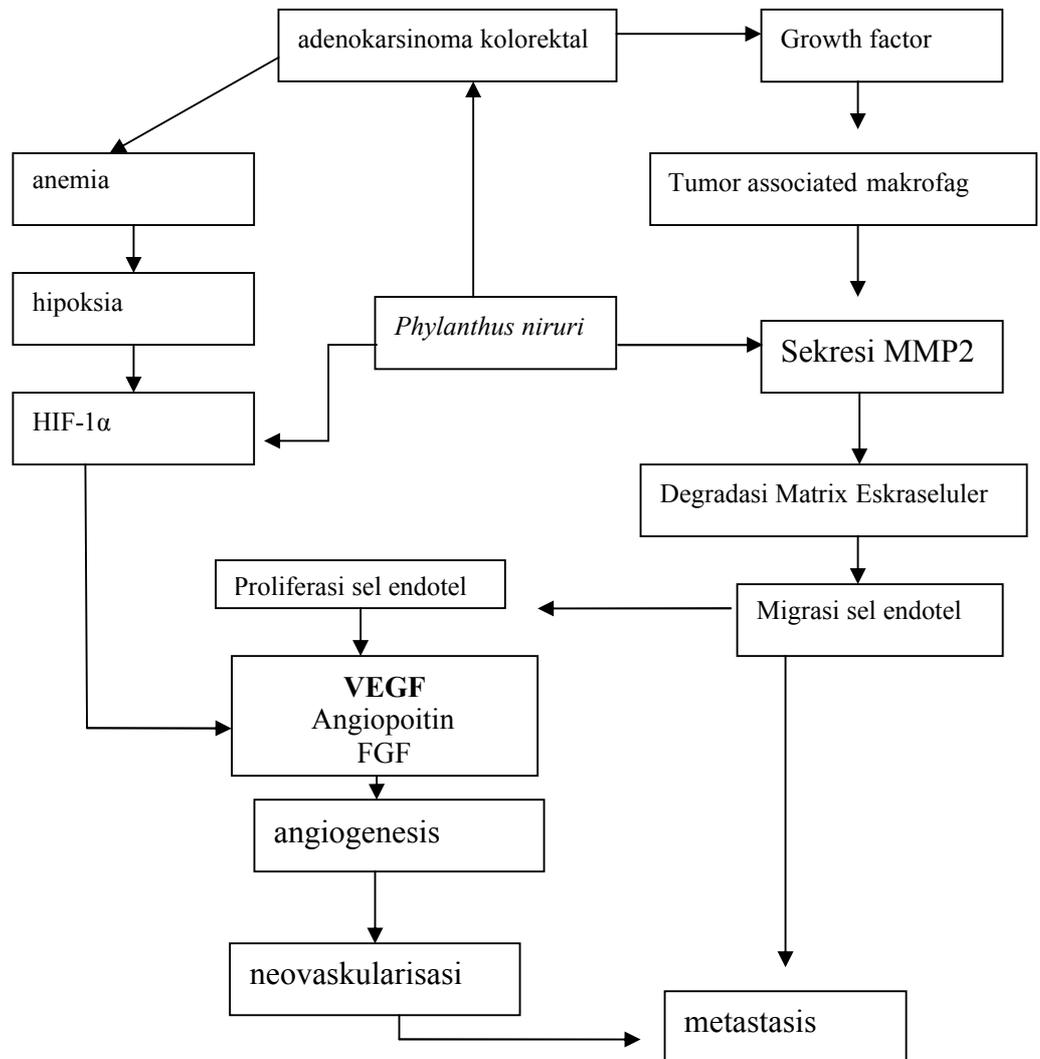
**Gambar 3.**Jejas sel akibat radikal bebas.

Empat sistem sel yang paling mudah terkena jejas atau cedera adalah integritas membran sel, pembentukan ATP, sintesis protein dan integritas aparatus genetik. Dalam keterbatasan sel dapat mengompensasi gangguan tersebut, Namun bila cedera persisten atau berlebihan menyebabkan sel melewati ambang batas dan masuk kepada kondisi *irreversibel*. Keadaan tersebut disertai kerusakan luas pada semua membran, pembengkakan lisosom, vakuolisasi mitokondria, sehingga terjadi penurunan kapasitas untuk membentuk ATP. Kalsium ekstrasel masuk ke dalam sel dan cadangan kalsium intrasel dikeluarkan mengakibatkan aktivasi enzim yang dapat mengatabolisasi membran, protein, ATP dan asam nukleat.<sup>33</sup>

### BAB III

#### KERANGKA TEORI KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

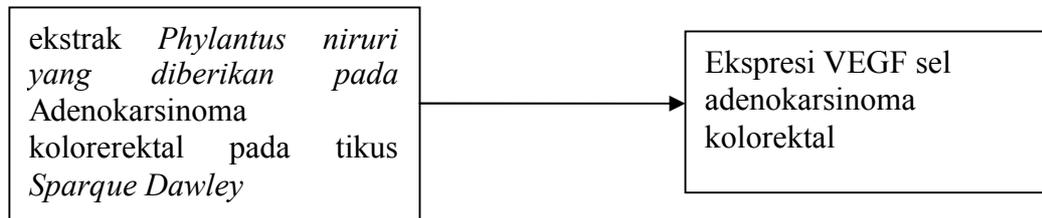
##### 3.1. Kerangka Teori



Gambar 4 Kerangka teori

Faktor yang mempengaruhi angiogenesis diantaranya VEGF, angiopoitin dan FGF. Ekspresi VEGF merupakan penanda yang paling baik untuk menentukan terjadinya angiogenesis pada adenokarsinoma kolorektal. Paparan hipoksia mempengaruhi gen HIF 1 $\alpha$  sehingga menstimulasi VEGF dan menyebabkan adanya perubahan mikrovaskuler. *P. niruri* mengandung isolat protein karbon tetrakloride dapat menetralkan radikal bebas melalui enzim antioksidan utama (SOD, Katalase). Proses ini diharapkan mempengaruhi angiogenesis kanker. *Ellagic Acid* merupakan komponen aktif *P. urinaria* memperlihatkan aktifitas anti-angiogenic dan menghambat sekresi protein MMP-2 dari HUVECs.<sup>9</sup> Hambatan inilah yang membuktikan bahwa elagic acid yang terkandung dalam spesies *Phylanthus* merupakan antiangiogenesis.

### 3.2. Kerangka Konsep



Gambar 5 Kerangka Konsep.  
Pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri* menghambat ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal

### 3.3.Hipotesis

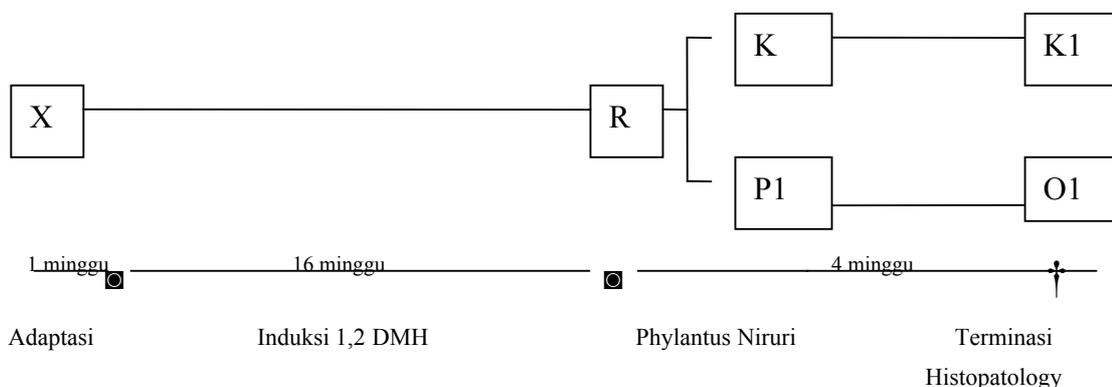
Ada perbedaan ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal pada tikus *Sparque Dawley* dengan pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri* dan tanpa *Phyllanthus niruri*.

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Jenis dan rancangan penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorik menggunakan rancangan *post test* dengan kelompok kontrol (*Randomized post test control-group only design*), dengan rancangan penelitian:



Keterangan:

- X = Masa adaptasi Tikus *Sprague Dawley*.
- R = Randomisasi
- K = Tikus *Sprague Dawley* dengan Adenokarsinoma Kolorektal tanpa diberi ekstrak *Phylantus niruri* sebagai kelompok kontrol.
- P1 = Tikus *Sprague Dawley* dengan Adenokarsinoma Kolorektal diberi ekstrak *Phylantus niruri* dosis 13,5 mg/kg BB/2 ml/ hari peroral sebagai kelompok perlakuan 1.
- OK = kelompok kontrol dibunuh untuk diperiksa jaringan adenokarsinoma kolorektal.
- O1 = kelompok perlakuan 1 dibunuh untuk diperiksa jaringan adenokarsinoma kolorektal.

Pada minggu ke-16 tikus *Sprague Dawley* yang dinyatakan positif adenokarsinoma kolorektal dilakukan randomisasi dengan *Simple random sampling*. Tikus dikelompokkan menjadi dua kelompok. Kelompok pertama adalah tikus dengan adenokarsinoma kolorektal tanpa perlakuan khusus sebagai kelompok kontrol. Kelompok kedua tikus dengan perlakuan memberi ekstrak *P niruri* dengan dosis 13,5 mg/kg BB/2 ml/ hari peroral selama 4 minggu pada tikus *Sprague Dawley* melalui sonde, yang selanjutnya disebut kelompok P1. Dosis ekstrak *P niruri* yang dipakai adalah dosis tunggal 13,5 mg/kg BB/2 ml/ hari peroral selama 4 minggu. Pemeriksaan laboratorium histopatologik jumlah ekspresi VEGF dilakukan setelah Minggu ke-20 dan dibandingkan antara kelompok perlakuan 1 dan kelompok kontrol.

#### **4.2. Lokasi dan waktu penelitian**

Pemeliharaan dan intervensi hewan coba dilaksanakan di Unit Pengembangan Hewan Percobaan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Pemeliharaan semenjak masa seleksi sampai masa perlakuan berlangsung dalam waktu 20 minggu. Pemeriksaan histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RS Dr Sarjito Yogyakarta.

### **4.3. Populasi dan sampel**

#### **4.3.1. Populasi**

Populasi target adalah tikus Sprague Dawley. Populasi terjangkau adalah tikus *Sprague Dawley* jantan pada usia 6-7 minggu, berat badan 200 gram di Unit Pengembangan Hewan Percobaan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

#### **4.3.2. Sampel**

Sampel yang digunakan diambil secara acak dari populasi terjangkau yaitu tikus putih strain *Sprague Dawley* yang berusia usia 6-7 minggu (sesuai usia eksperimental) yang berada di Unit Pengembangan Hewan Percobaan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, dengan syarat sesuai kriteria inklusi dan eksklusi.

##### **Kriteria inklusi :**

1. Berusia 6-7 minggu
2. Berat badan 200 gram
3. Sudah muncul adenokarsinoma kolorektal.

##### **Kriteria eksklusi:**

1. Perilaku berubah (tidak doyan makan, lemas, tidak lincah) selama penelitian.
2. Terjadi perdarahan (melena) terdapat bercak darah pada feses. Atau perdarahan di anus.

##### **Jumlah sampel:**

Penentuan jumlah sampel dilakukan dengan menggunakan rumus penelitian eksperimen laboratorik WHO 1993 jumlah minimal adalah 5 ekor. Jumlah

tikus yang digunakan 20 ekor. Diberi perlakuan induksi 1,2 DMH 20mg/KgBB/1 kali/minggu selama 16 minggu. Setiap 3 minggu sekali tikus diterminasi sebanyak 2 ekor untuk dilihat sejauh mana pertumbuhan sel kankernya. Pada minggu ke 16 dilakukan randomisasi. Kelompok kontrol sebanyak 6 ekor, dan kelompok P1 6 ekor, kemudian kelompok perlakuan 1 diberi ekstrak *P nirury* 13,5 mg/kgBB/2ml/hari peroral selama 4 minggu.

#### **4.4. Variabel penelitian**

##### **4.4.1. Variabel bebas**

Pemberian ekstrak *P niruri* pada tikus *Sprague Dawley* dengan adenokarsinoma kolorektal.

##### **4.4.2. Variabel tergantung**

Sebagai variabel tergantung dalam penelitian ini adalah: Ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal tikus *Sprague Dawley*.

##### **4.4.3. Definisi operasional variabel**

1. Ekstrak *P niruri* adalah tablet Stimuno dengan dosis 13,5 mg/kgBB/2 ml .
3. Ekspresi VEGF adalah jumlah ekspresi VEGF A sel adenokarsinoma kolorektal pada sediaan histopatologi yang di cat menggunakan imunohistokimia. Jumlah ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal dihitung berdasarkan jumlah sitoplasma yang terwarnai coklat, dibagi jumlah seluruh sel tumor per luas bidang pandang, hasil berupa prosentase modifikasi Zlobec *et al* (2009).<sup>6</sup> Pengamatan dilakukan oleh spesialis patologi anatomi.

Untuk mengurangi subyektifitas pengamatan dilakukan oleh dua orang patolog dan hasil pengamatan dilakukan uji *kappa coefficient (k)*.<sup>6</sup>

#### **4.5. Bahan yang digunakan**

##### **4.5.1. Bahan Utama**

1. Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jenis *Sprague Dawley* jantan yang usia 6-7 minggu, berat badan 200 gram yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
2. Pakan standart diberikan *ad libitum (on deman)*.
3. Induksi 1,2 DMH .
4. Pemberian ekstrak *P niruri* yang diencerkan menggunakan *Aquabidestilata* dengan dosis 13,5 mg/KgBB/2 ml diberikan melalui sonde.

##### **4.5.2. Bahan untuk pemeriksaan Jaringan**

1. Parafin.
2. Formalin 10%
3. Alkohol 100%, 96%, 85%, 70%, 50%
4. Xylol
5. VEGF Ab 1 Lab Vision.

#### **4.6. Peralatan Penelitian**

##### **4.6.1. Alat untuk perawatan tikus**

Kandang, timbangan, *disposable siringe* , alat sonde.

#### **4.6.2. Alat untuk prosesing jaringan**

Peralatan bedah mikro untuk terminasi tikus, Parafin, *Basket* cetakan blok.

#### **4.6.3. Alat untuk pemeriksaan jaringan**

1. Preparat obyek dan deck glass
2. *Staining jar*
3. Oven
4. Mikrotom
5. Mikroskop

#### **4.7. Tehnik pengumpulan data**

##### **4.7.1. Prosedur Perlakuan**

1. Pemeliharaan tikus percobaan.

Tikus dipelihara dalam ruangan yang berventilasi cukup, dikandangkan secara individual. Suhu ruangan berkisar 28 – 32 derajat Celcius, dengan kelembaban  $56 \pm 5\%$ . Makanan dan minuman diberikan dalam bentuk pelet tikus, setiap 2 hari dilakukan pembersihan kandang. Selama penelitian dilakukan tikus tidak ada yang mati.

2. Prosedur pemberian pakan

Selama tujuh hari, delapan belas ekor tikus diaklimatisasi terlebih dahulu. Pakan yang diberikan dalam bentuk pakan standart. Delapan belas ekor tikus diinduksi 1,2 DMH selama 16 minggu. Pada minggu ke 16 dilakukan randomisasi dibagi dalam 2 kelompok sehingga masing-masing kelompok terdapat 6 ekor tikus kelompok kontrol, dan 6 ekor tikus kelompok P1.

Kelompok 1 sebagai kelompok kontrol tikus *Sprague Dawley* dengan Adenokarsinoma Kolorektal diberi pakan standar selama 20 Minggu tanpa perlakuan khusus.

Kelompok II sebagai kelompok perlakuan I tikus *Sprague Dawley* dengan Adenokarsinoma Kolorektal diberi pakan standart, diberi ekstrak *P niruri* dosis 13,5 mg/kgBB/2mk/hari peroral selama 4 minggu.

Dosis ekstrak *P niruri* yang diberikan adalah dosis 13,5 mg/KgBB/2 dosis tunggal, dan diberikan pada kelompok perlakuan 1 saja.

### 3. Prosedur pembedahan hewan uji

Prosedur pembedahan ini dilakukan melalui tahap persiapan, pembedahan dan sanitasi. Pada tahan persiapan, disiapkan pot organ yang sudah diberi label sesuai dengan nomor tikus yang akan dbedah. Pot organ diisi dengan formalin 4-10% untuk menyimpan organ. Tahap pembedahan tikus dengan cara dibunuh dengan Ketamin/eter. Dibedah mulai dari bagian perut, masing-masing organ diambil dan dipisahkan kemudian organ dibersihkan. Organ dimasukkan dalam pot berisi formalin 4-10%.

Tahap sanitasi dilakukan dengan cara memasukkan sisa organ tikus yang tidak terpakai ke dalam kantong plastik. Kantong plastik yang berisi sisa organ dimusnahkan dengan cara insinerasi. Area kerja sisa pembedahan dibersihkan dengan sabun dan jika perlu disemprot dengan alkohol.

## **4.8. Prosedur pengumpulan data**

### **4.8.1. Aklimatisasi**

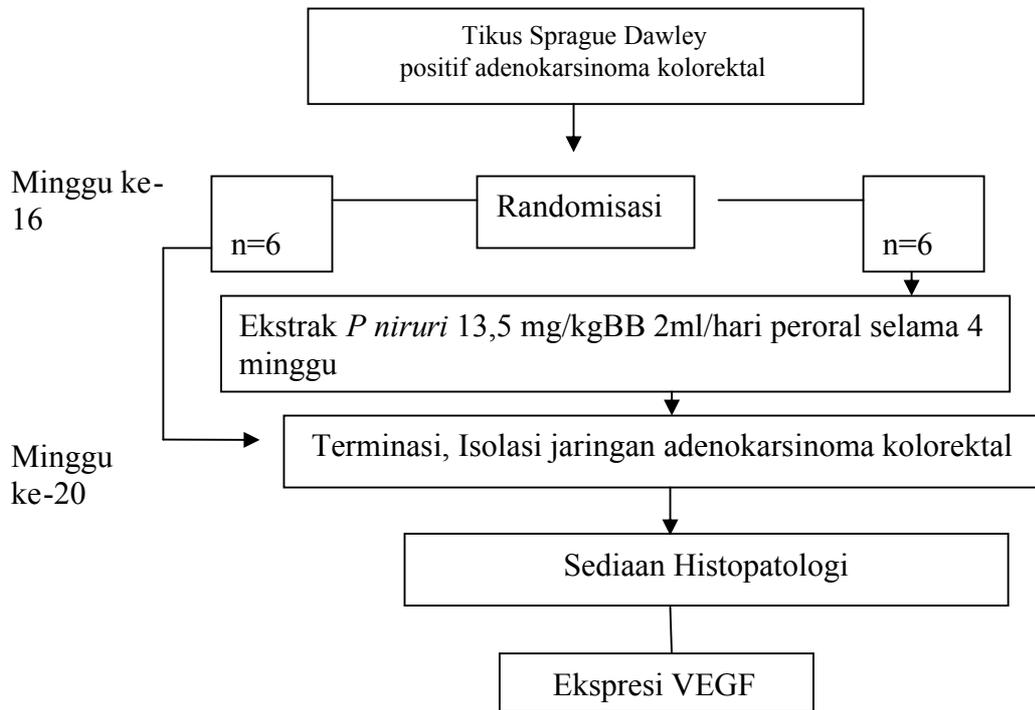
Sebanyak delapan belas ekor tikus putih *Sprague Dawley* usia 6-7 minggu, berat badan 200 gram diaklimatisasi di laboratorium selama 7 hari. Hal ini diharapkan terjadi penyesuaian hewan coba terhadap kondisi lingkungan yang ada sehingga tidak terjadi kematian.

### **4.8.3. Jaringan Adenokarsinoma Kolorektal**

Pembacaan jaringan Adenokarsinoma Kolorektal dilakukan melalui pembedahan tikus putih *Sprague Dawley* pada semua hewan coba baik pada kelompok kontrol maupun perlakuan. Adenokarsinoma Kolorektal yang didapat selanjutnya dilakukan fiksasi menggunakan formalin 10%, dehidrasi dengan menggunakan alkohol bertingkat 50%, 70%, 85%, 96% dan 100%. Setelah dehidrasi maka dilakukan "clearing", "impragnating", "imbedding" dan "mounting". Akhir dari prosesing jaringan selanjutnya akan dilakukan pengamatan atau pembacaan pada kelompok kontrol maupun perlakuan. Pengamatan atau pembacaan preparat dilakukan dengan cara melihat ekspresi VEGF. Jumlah ekspresi VEGF terwarnai dihitung menggunakan prosentase.<sup>5</sup>

### **4.8.4. Alur Penelitian**

Penelitian ini telah dilakukan penelitian pendahuluan yaitu 18 ekor tikus *Sprague Dawley* diberi perlakuan induksi 1,2 DMH 20mg/KgBB/1 kali/minggu selama 16 minggu. Setiap 3 minggu sekali tikus diterminasi sebanyak 2 ekor untuk dilihat sejauh mana pertumbuhan sel kankernya.



Gambar 6. Alur penelitian.

Setelah tikus *Sprague Dawley* benar-benar teridentifikasi adenokarsinoma kolorektal kemudian pada minggu ke 16 dilakukan random alokasi dengan cara *simple random sampling*, tikus dikelompokkan menjadi 2 kelompok. Kelompok kontrol dan kelompok perlakuan 1 atau P1. Kelompok 1 sebagai kelompok kontrol tikus *Sprague Dawley* dengan Adenokarsinoma Kolorektal diberi pakan standar selama 20 Minggu tanpa perlakuan khusus. Kelompok II sebagai kelompok perlakuan I tikus *Sprague Dawley* dengan Adenokarsinoma Kolorektal diberi pakan standart, diberi ekstrak *P niruri* dosis 13,5 mg/kgBB/2mk/hari peroral selama 4 minggu. Dosis ekstrak *P niruri* yang diberikan adalah dosis 13,5 mg/KgBB/2 dosis tunggal, dan diberikan pada kelompok perlakuan 1 saja. Pada minggu ke-20 dilakukan terminasi, kemudian isolasi jaringan adenokarsinoma kolorektal dan dibuatlah sediaan Histopatologi. Setelah itu dilakukan pengamatan dengan metode imunohistokimia untuk melihat ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal. Jumlah ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal dihitung berdasarkan jumlah sitoplasma yang terwarnai, dibagi jumlah seluruh sel tumor per luas bidang pandang.

#### 4.9. Analisis Data

Data yang terkumpul dikelompokkan berdasarkan perlakuan, diberi kode dan dimasukkan dalam file komputer.

Data dianalisis secara statistik dengan proses sebagai berikut:

1. Analisis deskriptif dengan menampilkan diagram dan tabel silang menurut kelompok intervensi. Dikelompokkan dan ditampilkan jumlah ekspresi VEGF pada kelompok kontrol, perlakuan 1. Analisis deskriptif ditampilkan dalam *box plot*.
2. Analisis statistik dengan melakukan uji *Mann Withney*. Batas derajat kemaknaan yang akan dicapai adalah  $\alpha$  0,05 dengan *power* penelitian 80% dan intervensi kepercayaan sebesar 95%.
3. Semua uji statistik tersebut dilakukan menggunakan program komputer SPSS 11.05 *for window*.<sup>29</sup>

#### **4.10. Etika Penelitian**

Dikarenakan penelitian ini adalah penelitian payung yang merupakan rangkaian dari empat penelitian, maka kajian etik pemeliharaan binatang (*animal ethic*) dari komisi etik pemeliharaan kesehatan FK UNDIP/RS DR. Kariadi Semarang menyatu dengan *ethical clearence* yang sama.

#### **4.11. Klarifikasi *Conflict Of Interest***

Penelitian ini tidak dibiayai oleh pihak manapun.

#### **4.12. Keterbatasan Penelitian**

Adapun keterbatasan penelitian ini hanya melihat salah satu faktor angiogenesis yaitu VEGF, hal ini dilakukan karena keterbatasan waktu dan dana penelitian.

## **BAB V**

### **HASIL PENELITIAN**

#### **5.1. Hasil Penelitian**

##### **5.1.1. Gambaran Proses Penelitian**

Telah dilakukan penelitian pendahuluan untuk membentuk sel adenokarsinoma kolorektal terhadap 20 tikus *Sprague Dawley* umur 6-7 minggu, dengan berat badan 200 gram yang diberi pakan standar dan diberi perlakuan induksi 1,2 DMH dengan dosis 20 mg/kgBB/1 kali/ minggu selama 16 minggu. Setiap 3 minggu sekali tikus diterminasi sebanyak 2 ekor untuk dilihat sejauh mana pertumbuhan sel kankernya. Pada minggu ke 12 sel kanker sudah muncul sehingga induksi 1,2 DMH dihentikan. Kemudian dilakukan randomisasi dengan cara *simple random sampling*, tikus dikelompokkan menjadi kelompok kontrol (K) dan kelompok perlakuan (P1) masing-masing 6 ekor tikus.

Kelompok kontrol adalah kelompok tikus *Sprague Dawley* dengan adenokarsinoma kolorektal, sedangkan kelompok perlakuan adalah tikus *Sprague Dawley* dengan adenokarsinoma kolorektal yang diberi ekstrak *P niruri* dosis 13,5 mg/kgBB/hari peroral (sonde) selama 4 minggu. Pada minggu ke 20 dilakukan terminasi terhadap 12 ekor tikus penelitian tersebut, kemudian diambil jaringan kolorektalnya dan dilakukan processing jaringan. Preparat akan dicat menggunakan pengecatan imunohistokimia VEGF Ab 1 *Lab Vision*. Ekspresi VEGF dihitung dalam prosentase sel yang terwarnai. Data dianalisis menggunakan SPSS 11.0 *for windows*

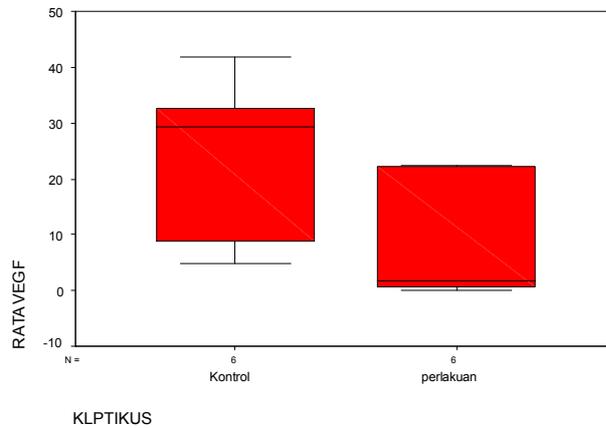
### 5.1.3 Ekspresi VEGF

Pengamatan dan pembacaan dilakukan oleh dua dokter spesialis patologi anatomi terhadap preparat kelompok K maupun kelompok P1. Pengamatan dan pembacaan preparat dilakukan dengan cara menghitung ekspresi VEGF terwarnai coklat dihitung menggunakan prosentase. Hasil lengkap pemeriksaan ekspresi VEGF dapat dilihat pada lampiran 2 dan 3.

Tabel 2. Jumlah ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal *Sprague Dawley* pada kelompok kontrol (K) dan kelompok perlakuan (P1).

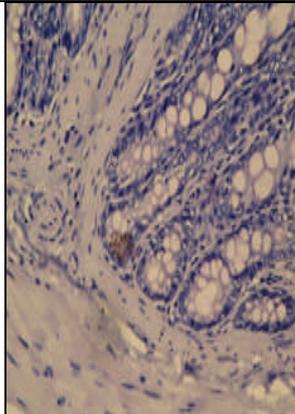
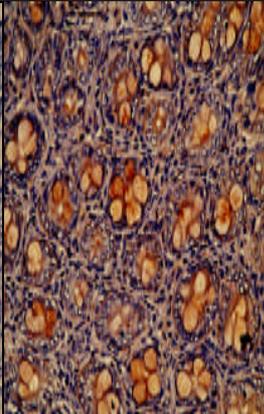
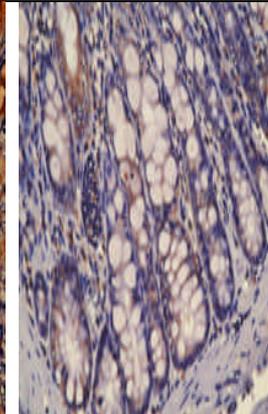
Kelompok	Ekspresi VEGF		
	<i>Median</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
K	29,4	4,9	41,8
P1	1,6	0,1	22,4

Berdasarkan tabel 2 *median* ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal pada kelompok kontrol (K) 29,4 %, *min* 4,9 % dan *max* 41,8%. Kelompok perlakuan (P1) *median* 1,6%, *min* 0,1 % dan *max* 22,4%. Jumlah *median* ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal kelompok K lebih tinggi jika dibandingkan dengan jumlah rata-rata ekspresi VEGF adenokarsinoma kolorektal kelompok P1. Pada gambar 7. Terlihat gambaran *box plot median* ekspresi VEGF kelompok K lebih tinggi dibandingkan kelompok P1.



Gambar 7. *Box plot* median ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal tikus *Sprague Dawley* pada kelompok kontrol (K) dan kelompok perlakuan (P1).

Gambaran ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal tikus *Sprague Dawley* kelompok K dan P1 dapat dilihat pada gambar 8 berikut:

		
(Perb.400x Amin S, 2010) Tidak tampak ekspresi VEGF pada sel kolorektal tikus normal	(Perb.400x Amin S, 2010) K: Ekspresi VEGF pada sel adenokarsinoma kolorektal tanpa pemberian ekstrak <i>P niruri</i> . Terlihat berwarna coklat pada sitoplasma rata-rata 42%.	(Perb.400x Amin S, 2010) P1: Ekspresi VEGF pada sel adenokarsinoma kolorektal dengan pemberian ekstrak <i>P niruri</i> . Terlihat berwarna coklat pada sitoplasma rata-rata 4%.

Gambar 8, Morfologi ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal tikus *SpragueDawley* pada kelompok K, P1.

Untuk mengetahui tingkat kemaknaan hasil pemeriksaan preparat terhadap ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal baik pada kelompok K maupun kelompok P1, dilakukan analisis uji statistik. Berdasarkan uji normalitas data *Shapiro-Wilk*, *skater* dan *box plot* didapatkan data berdistribusi tidak normal yang dapat dilihat pada lampiran 4. Untuk mengetahui perbedaan kedua kelompok penelitian yaitu kelompok kontrol (K) dan perlakuan (P1) pada sel adenokarsinoma kolorektal dilakukan uji *Mann Withney*. Data hasil uji statistik disajikan pada lampiran 5 dan hasil analisis uji statistik *Mann Withney* ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal terdapat perbedaan pada kedua kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol (K), dan perlakuan 1 (P1) dengan nilai  $p < 0,025 (\alpha 0,05)$ .

## **BAB VI**

### **PEMBAHASAN**

#### **6.1. Gambaran Proses Penelitian**

Rancangan penelitian ini adalah *post test* dengan kelompok kontrol (*Randomized post test control-group only design*) terhadap ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal tikus *Sprague Dawley*. Pembentukan sel kanker dipicu dengan induksi 1,2 DMH dengan dosis 20 mg/kgBB/1 kali/ minggu selama 16 minggu. Setiap 3 minggu sekali tikus diterminasi sebanyak 2 ekor untuk dilihat sejauh mana pertumbuhan sel kankernya. 1,2 DMH dapat menginduksi adenokarsinoma kolorektal. Druckry *et. al* (1967) menginduksi adenokarsinoma kolorektal menggunakan 1,2 DMH adalah intestinum, khususnya kolon dan rectum. Spesies hewan coba, rute pemberian, dan dosis mempengaruhi karsinogenitas 1,2 DMH. Selektifitas target organ berdasarkan rute pemberian 1,2 DMH untuk menginduksi kanker kolon ditegaskan oleh Wiebecke *et al* (1982) pada penggunaan tikus dengan spesies yang sama.<sup>33-34</sup>

Corpet DE *et al* (2003) melakukan kajian 35 studi tentang topik adenokarsinoma kolorektal dan menemukan bahwa rata-rata induksi dengan 1,2 DMH diberikan selama 8-14 minggu dengan dosis 15 mg/kgBB tikus.<sup>35</sup> Sedangkan pada penelitian ini perlakuan induksi 1,2 DMH 20mg/KgBB/1 kali/minggu yang direncanakan selama 16 minggu, ternyata pada minggu ke 12 sudah muncul adenokarsinoma kolorektal. Hal ini terlihat pada terminasi 2 tikus pada minggu ke 12. Pada sediaan preparat setelah diperiksa sudah muncul sel

kanker. Waktu induksi sesuai dengan apa yang ada dalam jurnal. Modifikasi dosis diharapkan agar kanker segera terbentuk. Kemudian dilakukan randomisasi dengan cara *simple random sampling*, tikus dikelompokkan menjadi kelompok kontrol (K) dan kelompok perlakuan (P1). Kelompok perlakuan adalah tikus *Sprague Dawley* dengan adenokarsinoma klorektal yang diberi ekstrak *P niruri* dosis 13,5 mg/kgBB/hari peroral (sonde) selama 4 minggu. Penelitian Septiani R (2009) Ekstrak *P amarus* dapat meningkatkan kematian sel pada jaringan kanker yang dilihat melalui pengamatan histologi dan dapat menurunkan proliferasi sel dan ekspresi PCNA pada jaringan kanker payudara mencit galur C3H.<sup>10</sup> Penelitian lain oleh Chadijah (2003) pemberian ekstrak *P niruri L* dosis 10 mg/ml ke sel mononuklear terjadi penurunan viabilisasi sel mononuklear dan berbeda secara bermakna dengan kelompok kontrol<sup>8</sup>.

## **6.2. Karsinogenesis Adenokarsinoma Kolorektal.**

Telah diteliti bahwa induksi 1,2 DMH dapat memicu terjadinya adenokarsinoma kolorektal. 1,2 DMH menerima atau mendonor elektron bebas selama reaksi intrasel sehingga mengkatalisis pembentukan radikal bebas. Interaksi ini menghasilkan peroksida yang tidak stabil dan reaktif sehingga terjadi reaksi autokatalitik. Reaksi radikal bebas menimbulkan rusaknya untai tunggal. Kerusakan DNA tersebut telah memberikan implikasi pada perubahan sel menjadi ganas. Penelitian ini membuktikan setelah induksi 1,2 DMH pada minggu ke 12 sudah mulai terbentuk adenokarsinoma kolorektal dan dua diantaranya mengalami metastasis ke ginjal. Hal ini sesuai dengan pendapat Bruce WR *et al* (2000)

menyatakan bahwa terdapat dua mekanisme yang diduga terjadi dalam karsinogenesis kolon yang berhubungan dengan inflamasi. Pertama terjadi defek pada barier 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 mutageknik dan mitogenik dan mempromosi karsinogenesis kolon. Mekanisme kedua, defek barier epitelial akan menimbulkan ketidak seimbangan 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.<sup>36</sup>

Patogenesis tumor diawali dari proses pertahanan homeostasis melalui keseimbangan antara proliferasi atau perkembangan biakan sel dan kematian sel. Bila keseimbangan antara proliferasi dan kematian ini terganggu maka akan terjadi akumulasi sel atau kehilangan sel. Akumulasi sel terjadi bila laju kematian sel lebih rendah dibandingkan proliferasi sel atau laju proliferasi sel lebih tinggi dibandingkan kematian. Sebaliknya kehilangan sel akan terjadi bila laju kematian sel lebih tinggi dari proliferasi atau laju proliferasi lebih rendah dari kematian sel

17-18.

### 6.3. Peran VEGF pada Angiogenesis Adenokarsinoma Kolorektal.

Angiogenesis merupakan proses pembentukan pembuluh darah baru yang berasal dari pembuluh darah yang telah ada. Tumor membutuhkan angiogenesis dalam mensuplai kebutuhan nutrisi. VEGF berperan penting pada angiogenesis tumor. Telah dibuktikan dalam penelitian ini bahwa secara makroskopis kolon yang mengalami adenokarsinoma terdapat benjolan kanker, rapuh dan mudah mengalami perdarahan. Hasil pemeriksaan imunohistokimia menunjukkan ekspresi VEGF pada kelompok kontrol yaitu kelompok tikus *Sprague Dawley* dengan adenokarsinoma kolorektal mempunyai *median* ekspresi yang tinggi (nilai *median* 29,4) sedangkan pada sel kolorektal tikus normal tidak tampak adanya ekspresi VEGF gambar 8. Gambaran makroskopis kelompok perlakuan, tumor kecil, kolon tidak rapuh dan tidak mudah terjadi perdarahan. Gambaran mikroskopis mempunyai nilai *median* ekspresi VEGF 1,6%.

1,2 DMH mengkatalisis terjadinya radikal bebas, baik melalui proses kerusakan DNA maupun melalui respon inflamasi yang memicu sel radang. Sel radang inilah yang akan melepaskan radikal bebas bersifat mutagenik dan mempromosi karsinogenesis kolon. Radikal bebas juga akan menginduksi COX-2 dan prostaglandin.<sup>30</sup> Pada penelitian ini hanya meneliti ekspresi VEGF, sedangkan ekspresi COX-2 dilakukan oleh peneliti payung lainnya.

Berbagai mekanisme dapat meregulasi VEGF, yang paling penting adalah hipoksia. *Hypoksia Inducible Factor* (HIF1) adalah mediator utama terhadap respon hipoksia tersebut. Ekspresi VEGF dalam sel-sel tumor distimulasi oleh hipoksia, onkogen (*ras*) dan inaktivasi gen suppressor tumor (*p53*) dan oleh

berbagai sitokin seperti COX-2<sup>30</sup>. Pada penelitian ini keberadaan HIF1 $\alpha$  tidak diteliti, akan tetapi secara teoritis keberadaan radikal bebas yang distimulus dari induksi 1,2 DMH berkemungkinan besar untuk meningkatkan HIF1 $\alpha$ . Pada sel yang cukup oksigen HIF1 $\alpha$  disintesis dan didegradasi terus menerus, tetapi pada hipoksia degradasinya dihambat sehingga HIF1 $\alpha$  terakumulasi dan berdimerisasi dengan HIF1  $\beta$ , kemudian mengikat DNA dan merekrut *co activator*, sehingga dapat mengaktifasi transkripsi gen target. Dengan demikian HIF1 ini yang meregulasi berbagai gen yang terkoordinasi bekerja secara angiogenesis.<sup>38</sup>

*Upregulation* misalnya terjadi pada gen yang menyandi NOS, VEGF, MMP2. NOS berperan dalam produksi NO yang akan mendilatasi pembuluh darah, meningkatkan aliran darah, berkontribusi pada peningkatan permeabilitas pembuluh darah dan penyediaan faktor angiogenesis. Peningkatan permeabilitas pembuluh darah dipengaruhi juga oleh VEGF yang memungkinkan molekul protein plasma keluar dari pembuluh darah antara lain untuk membentuk matriks penyangga. Perubahan pada matriks ekstraselular dilakukan juga oleh molekul proteinase yang termasuk dalam keluarga matriks metaloproteinase (MMP). Lisis protein spesifik oleh MMP diperlukan antara lain untuk melepas atau mengaktifasi faktor angiogenik yang terikat pada sel-sel matriks, membuka jalan untuk sel endotel yang mural agar dapat bermigrasi ke daerah yang memerlukan neovaskularisasi.<sup>38</sup>

Aktivasi aksis VEGF reseptor (VEGFR) memicu sinyal ganda jaringan yang menghasilkan sel endotel, mitogenesis, migrasi, diferensiasi dan permeabilitas vaskuler serta mobilisasi sel-sel progenitor endotel dari sumsum

tulang ke sirkulasi perifer. Angiogenesis membentuk kapiler melalui proses intususepsi atau proses *sprouting* pada kapiler. Angiogenesis melalui proses *sprouting* bersifat invasif tetapi relatif lambat karena sangat tergantung pada proliferasi sel. Angiogenesis sebagai salah satu cara untuk mengatasi keadaan hipoksia. Pada tingkat molekuler hipoksia direspon factor transkripsi *Hypoxia Inducible Factor 1* (HIF1) yang terdiri dari sub unit HIF1 $\alpha$  yang diregulasi oksigen dan HIF1 $\beta$  yang diekspresikan secara konstitutif.<sup>37</sup>

#### **6.4. *Phylantus niruri***

Penelitian ini menggunakan ekstrak *P niruri*. Tanaman ini mengandung zat aktif *flavonoids, alkaloids, terpenoid, lignan, polyphenol, tannin, coumarin, elagic acid* dan *saponin*<sup>11</sup>.

Untuk efektifitas dan efisiensi, ekstrak *P niruri* yang digunakan adalah produk Stimuno®. Dosis yang digunakan adalah dosis ajuran manusia dewasa yang dikonversi dalam dosis hewan coba tikus *Sprague Dawley*. *P niruri* adalah satu keluarga dengan *P urinaria*, kandungan zat aktif *P niruri* salah satunya adalah *elagic acid*. Penelitian ini menggunakan ekstrak *P niruri* secara utuh tanpa memisahkan zat aktif yang terkandung didalamnya. Hasil pemeriksaan laboratorium dan analisis uji statistik, ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal Tikus *Sprague Dawley* pada kelompok control (K) dan kelompok dengan pemberian ekstrak *P niruri* dosis 13,5 mg/kgBB/hari peroral (sonde) selama 4 minggu secara mikroskopik menunjukkan perbedaan. Berdasarkan analisis uji statistik perbedaan tersebut signifikan atau bermakna dengan nilai p

0,025 ( $\alpha$  0,05). Pemberian ekstrak *P niruri* dosis 13,5 mg/kgBB/hari peroral (sonde) selama 4 minggu secara mikroskopik menunjukkan perbedaan ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal.

Sel adenokarsinoma kolorektal dengan pemberian *P niruri* mempunyai ekspresi VEGF lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol. Ini menunjukkan bahwa proses angiogenesis yang terjadi pada kelompok perlakuan lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol. Pada gambaran makroskopis juga terlihat bahwa adenokarsinoma kolorektal kelompok perlakuan terlihat lebih kuat dibandingkan kelompok kontrol yang cenderung rapuh dan mudah terjadi perdarahan.

Angiogenesis dimungkinkan dihambat oleh zat aktif *P niruri ellagic acid* dengan menghambat sekresi MMP-2 sehingga mempengaruhi neovaskularisasi dan terjadi jumlah ekspresi VEGF lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol. Hal ini sesuai dengan penelitian Huang *et al* (2009) komponen aktif *P urinaria Ellagic Acid* memperlihatkan aktifitas anti-angiogenik dan menghambat sekresi protein MMP-2 dari HUVECs.<sup>9</sup>

Penurunan proses angiogenesis juga dimungkinkan karena *P niruri* merupakan antioksidan sehingga produksi faktor transkripsi HIF 1 $\alpha$  dihambat. Penghambatan produksi HIF 1 $\alpha$  menyebabkan penurunan ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal karena salah satu faktor yang menstimulus pengeluaran VEGF adalah HIF1 $\alpha$ . Hal ini sesuai dengan pendapat Ali SS *et al* (2007) bahwa *P niruri* mengandung antioksidan *Glutathion* yang dapat memperbaiki DNA akibat radikal bebas yang terjadi akibat induksi zat kimia 1,2 DMH.<sup>39</sup>

## **BAB VII**

### **SIMPULAN DAN SARAN**

#### **7.1. Simpulan.**

Pengaruh pemberian ekstrak *Phylantus niruri* dosis 13,5 mg/kgBB/hari peroral (sonde) pada tikus selama 4 minggu sebagai berikut:

1. Ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal tanpa pemberian *Phylantus niruri* mean 24,5, median 29,4, min 4,9, mak 41,8.
2. Ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal dengan pemberian *Phylantus niruri* mean 8,0, median 1,6, min 0,1, mak 22,4.
3. Ada perbedaan yang signifikan ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal dengan dan tanpa pemberian *Phylantus niruri* nilai p 0,025 ( $\alpha$  0,05). Ekspresi VEGF kelompok perlakuan lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol.

#### **7.2. Saran.**

Saran yang dapat dikemukakan mengacu pada pengalaman selama penelitian dan berdasar hasil penelitian ini: perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap faktor angiogenik jenis VEGF yang lain seperti VEGF B, VEGF C, dan VEGF D.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Khuhaprema T, Srivatanakul P. Colon and rectum cancer in thailand. J Clin Oncol.2008;25(3):1-10.
2. McCracken M, Olsen M, Chen MS, Jemal A, Thun M, Cokkinides V, et al. American cancer society cancer incidence, mortality, and associated risk factors among Asian Americans of Chinese, Filipino, Vietnamese, Korean, and Japanese ethnicities.Canjclin.2007;57(7):190-205.
3. Hanrahan . VEGF expression in colorectal cancer by stage. Am J Pathol. 2004;165(7):35-52.
4. Hicklin DJ, Ellis LM. VEGF expression in colorectal cancer. J Clin Oncol. 2005;23(8):1011-27.
5. Levin V.Colorectal cancer: prevention and early detection. revista2003; 100(10):3828-31.
6. Zlobec I, Steele R, Michel RP, Compton CC, Lugli A, and Jass JR. Scoring of p53, VEGF, Bcl-2 and APAF-1 immunohistochemistry and interobserver reliability in colorectal cancer. Modern Pathology 2006;19:1236-42.
7. Richard H, Wilson. The oncologist novel therapeutic developments other than EGFR and VEGF inhibition in colorectal cancer.[updated 2009 Nov 5,cited 2010 Jan 7]  
Available from: <http://TheOncologist.com /2009/11/5/VEGF/>

8. Harish R, Shivanandappa T. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of phyllanthus niruri. *Foodchem*.2004 Nov 25;11.049.doi:10.1016/j.foodchem.2004.11.049.Elsevier:570020
9. Chadijah. Ekstrak Phyllanthus niruri L viabilizas sel mononuklear adenokarsinoma mamma mencit C3H. [Thesis]. Semarang: Universitas Diponegoro; 2003.
10. Septiyani R. Effect phyllanthus amarus schum. et thonn. Extract on the expression of PCNA protein in mammary tumor of C3H mice. [Skripsi online]. Bandung: ITB, 2009. [Cited 2010 agust 25].  
Available from [http://www.adln.lib.itb.ac.id/2009\\_S1\\_Refita%20Septiani\\_Pengaruh%20Ekstrak%20Phyllanthus%20amarus%20Schum.%20Et%20Thonn%20Terhadap%20Ekspresi%20Protein.pdf](http://www.adln.lib.itb.ac.id/2009_S1_Refita%20Septiani_Pengaruh%20Ekstrak%20Phyllanthus%20amarus%20Schum.%20Et%20Thonn%20Terhadap%20Ekspresi%20Protein.pdf).
11. Huang ST, Wang CY, Yang RC, Wu HT, Yang SH, Cheng YC, et al. Ellagic acid the active compound of phyllanthus urinaria exerts in vivo anti-angiogenic effect and inhibits MMP-2 activity. *eCAM. Advance Access*.2009:1-11.
12. Labrecquel L, Lamy S, Chapus A, Mihoubi S, Durocher Y, Cass B, *et al.* Combined inhibition of PDGF and VEGF receptors by ellagic acid, a dietary-derived phenolic compound. *Carcin*.2005;26:821-26.
13. Akagi K, Vaskular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues. *Bjoc*.2000;83(7):887-91.
14. Raphael KR, Sabu MC, Kumar KBH, Kuttan R, Inhibition of N-Methyl N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)induced gastric carcinogenesis by phyllanthus amarus extract. *Apjcp*.2006;7:1-10.
15. Kumar RC. Buku Ajar Patologi, ed.7.trans:Prasetyo A.Jakarta:Penerbit Buku Kedokteran EGC;2007:185-237.

16. Yamada Y, Mori H. Pre-cancerous lesion for colorectal cancers in rodent: a new concept Carcinogenesis. *Bjoc* 2003;10:1-15.
17. Putra ST. Patologi molekuler kanker dalam biologi molekuler kedokteran, ed.1. Surabaya:Airlangga University Press; 1997:59-84.
18. Gewies A. Introduction to apoptosis this review. *ApoReview*.2003;25:30-45.
19. Folkman J. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, Cancer: principles & practice of oncology. Vol 2. 7th ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins; 2005:2865-82.
20. Ceccarelli C, Concurrent EGFr and Cox-2 expression in colorectal cancer: proliferation impact and tumor spreading. *Annonc*. 2005;15:74-9.
21. Fajar A.Seledri (*Apium graveoens*). *Nirmala*.2002:49-51.
22. Chatterjee M, Sarkar K, Sil PC. Herbal (*Phyllanthus niruri*) protein isolate liver from nimesulide induced oxidative stress. *Pathophysiology*.2006;16: 95-102.
23. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M. VEGF correlates with metastasis in colorectal cancer.*Cancer Res* .1997; 57;1043-46.
24. Lee CG, Heijn M, di Tomaso E, VEGF correlates with metastasis in colorectal cancer .*Cancer Res*. 2000;60:5565-70.
25. Bharatawijaya KG dan Rengganis T. *Imunologi dasar*. Jakarta:Balai penerbit FKUI;2009.

26. Obianime, The phytochemical screening and the effects of methanolic extract of *Phyllanthus amarus* leaf on the biochemical parameters of Male guinea pigs. *J. Appl. Sci.* 2008;12(4):73 – 7.
27. Zheng J, Activation of multiple signaling pathways is critical for fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor-stimulated ovine fetoplacental endothelial cell proliferation. *Biorep*; 2008;78:143–50.
28. Istvan S, Investigation of incident and development of spontaneous tumours typical of crl: CD BR rat strain in two carcinogenicity studies performed under similar circumstances. [Dissertation online]. Iskolajogutodja: Keszthely, 2008. [Cited 2010 Auguts 25]. Available from: <http://www.Iskolajogutodja.com/2010/08/25/angiogenesis>.
29. Dahlan S.M. Statistik untuk kedokteran dan kesehatan. Jakarta: Salemba Medika; 2009.
30. Wan C. Activation of the hypoxia-inducible factor-1 pathway accelerates bone regeneration. *Pnas*. 2008 Jan 15;105:doi:10.1073/pnas0708474105. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/content/full/0708474105/DC1>.
31. Tong Q, VEGF is upregulated by hypoxia-induced mitogenic factor via the PI-3K/Akt-NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Resp Res*. 2006;10:7-37.
32. Richard N, Michel MD, Ramzi S, Cotran. *Jejas, Adaptasi dan Kematian Sel*. In: *Robins Pathologic Basic of Disease*. 7<sup>th</sup> ed. Alih Bahasa: Prasetiyo A, Pendi UB, Priliono T. Vol1. Jakarta: EGC: 2003: 3-28
33. Joseph CA, Woo Y-T, Argus MF. *Chemical of cancer*. London: Academic Press, 1982 : 350-93.

34. Corpet DE, Tache S, Pierre F. Chemoprevention of colon cancer : systematic review of preclinical studies in rats and mice [online].2003 [cited 2010 august 25].  
Available from : URL, :<http://corpet.free.fr/aom.html>.
35. Bruce WR, Giacca, Medline A. Possible mechanism relating diet and risk of colon cancer. *Cancer epidemiology biomarkers and prevention*. [serial on the internet]. 2000 Dec [cited 2010 august 25];9.  
Available from  
URL:<http://cebp.aacrjournals.org/cgi/content/full/9/12/1271>.
36. Semenza, G.L. Vasculogenesis, Angiogenesis, and Arteriogenesis: Mechanism of blood vessel formation and remodeling. *J bioch*, 2007.102: 840-47.
37. Mazure, N.M. Brahimi-Horn, M.C. Protein kinase and the hypoxia inducible factor, two switches in angiogenesis, current pharmaceutical design. *J bioch*, 2003. 9: 531-41.
38. Jain, R.K. Molecular regulation of vessel maturation, *Nature Medicine J bioch*, 2003. 9: 685-93.
39. Ali S.S, Kasoju N, Luthra A, Singh A, Sharanabasava H, Sahu A *et al* Indian medical herbs as sources of antioxidants. *Foodres*, 2009.41: 1-15.

## Lampiran 2: Row data hasil pengamatan ekspresi VEGF

klptks	Kdra1	kdra2	kdra3	kdra4	kdra5	ratadra	kdrb1	kdrb2	kdrb3	kdrb4	kdrb5	ratadrb	ratavegf	filter \$	rdrmean	rdrbmean
1	27	25	27	28	32	27.8	28	24	25	28	30	27	27.4	0	2	2
1	42	40	48	42	40	42.4	40	43	43	41	39	41.2	41.8	0	2	2
1	6	10	12	10	12	10	4	5	7	10	12	7.6	8.8	0	1	1
1	7	6	2	4	2	4.2	8	6	4	6	4	5.6	4.9	0	1	1
1	24	26	27	27	28	26.4	4	52	51	38	37	36.4	31.4	0	2	2
1	28	32	34	32	34	32	6	37	51	37	36	33.4	32.7	0	2	2
2	1	0	1	0	1	0.6	1	1	1	0	0	0.6	0.6	0	1	1
2	22	23	22	25	25	23.4	20	18	23	21	22	20.8	22.1	0	2	2
2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0.2	0.1	0	1	1
2	0	0	0	0	0	0	2	2	1	2	2	1.8	0.9	0	1	1
2	20	20	22	20	28	22	19	21	23	24	27	22.8	22.4	0	2	2
2	2	4	6	4	4	4	0	1	2	1	0	0.8	2.4	0	1	1

**Lampiran 3. Hasil distribusi frekuensi ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal tikus Sprague Dawley kelompok control dan perlakuan.**

**Kelompok Kontrol**

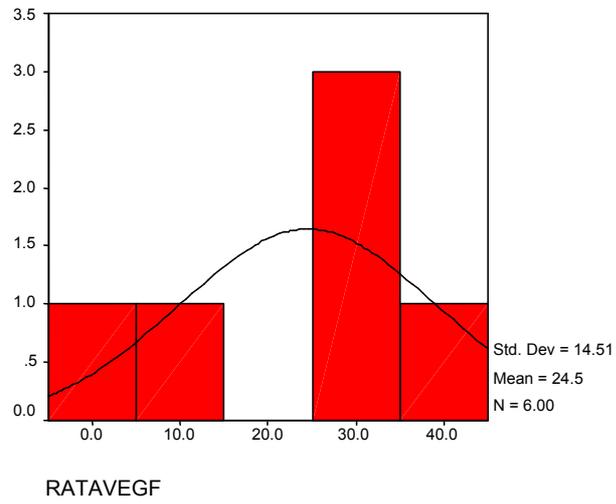
**Statistics**

RATAVEGF		
N	Valid	6
	Missing	0
Mean		24.5000
Median		29.4000
Std. Deviation		14.51344
Variance		210.64000
Skewness		-.522
Std. Error of Skewness		.845
Kurtosis		-1.442
Std. Error of Kurtosis		1.741
Minimum		4.90
Maximum		41.80

**RATAVEGF**

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	4.90	1	16.7	16.7	16.7
	8.80	1	16.7	16.7	33.3
	27.40	1	16.7	16.7	50.0
	31.40	1	16.7	16.7	66.7
	32.70	1	16.7	16.7	83.3
	41.80	1	16.7	16.7	100.0
	Total	6	100.0	100.0	

Rata-rata ekspresi VEGF kelompok kontrol



## Kelompok Perlakuan

### Statistics

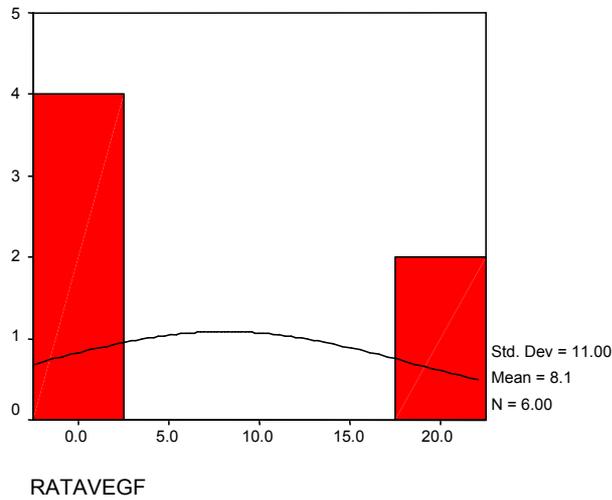
RATAVEGF

N	Valid	6
	Missing	0
Mean		8.0833
Median		1.6500
Std. Deviation		11.00062
Variance		121.01367
Skewness		.948
Std. Error of Skewness		.845
Kurtosis		-1.876
Std. Error of Kurtosis		1.741
Minimum		.10
Maximum		22.40

### RATAVEGF

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid .10	1	16.7	16.7	16.7
.60	1	16.7	16.7	33.3
.90	1	16.7	16.7	50.0
2.40	1	16.7	16.7	66.7
22.10	1	16.7	16.7	83.3
22.40	1	16.7	16.7	100.0
Total	6	100.0	100.0	

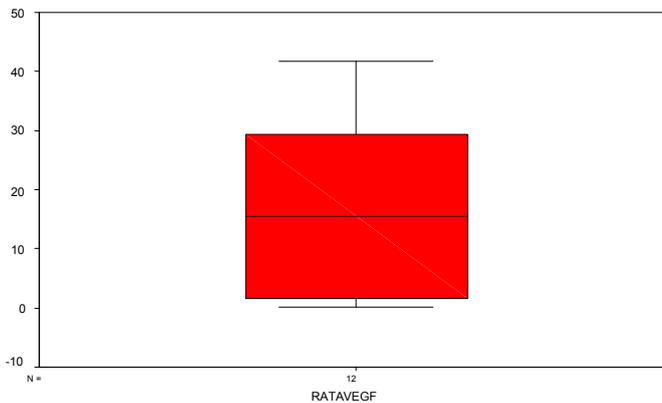
Rata-rata ekspresi VEGF kelompok perlakuan



**Box Plot Kelompok Kontrol**

Case Processing Summary

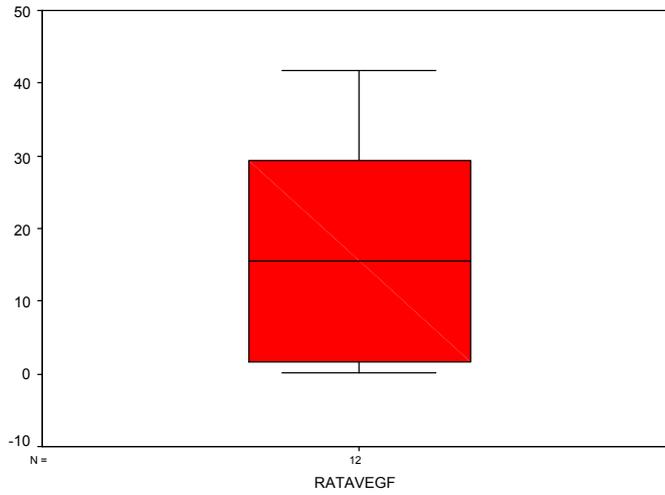
	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
RATAVEGF	12	100.0%	0	.0%	12	100.0%



**Box Plot Kelompok Perlakuan**

Case Processing Summary

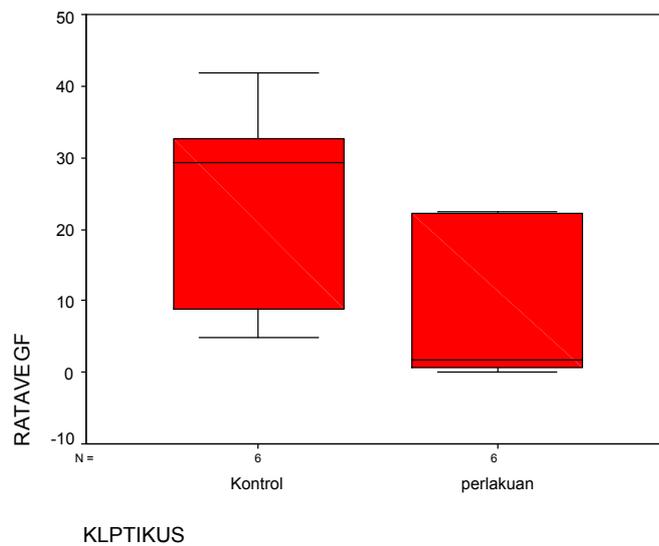
	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
RATAVEGF	12	100.0%	0	.0%	12	100.0%



### Box Plot Kelompok Kontrol dan Perlakuan

Case Processing Summary

		Cases					
		Valid		Missing		Total	
KLPTIKUS		N	Percent	N	Percent	N	Percent
RATAVEGF	Kontrol	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	perlakuan	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%



**Lampiran 4: Hasil Uji Kappa Coeficiency ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal tikus Sprague Dawley.**

**Case Processing Summary**

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
RHARMEAN * RNURMEAN	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%

**Symmetric Measures**

		Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	1.000	.000	2.449	.014
N of Valid Cases		6			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

**Lampiran 5. Hasil Uji normalitas data Ekspresi VEGF sel adenokarsinoma kolorektal Tikus *Sprague Dawley* kelompok tanpa pemberian *Phylantus niruri* (K) dan dengan pemberian *Phylantus niruri*(P1)**

**Case Processing Summary**

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
KLPTIKUS						
RATAVEGF Kontrol	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
perlakuan	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%

**Descriptives**

KLPTIKUS			Statistic	Std. Error	
RATAVEGF	Kontrol	Mean	24.6167	5.95843	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	9.3000	
			Upper Bound	39.9333	
		5% Trimmed Mean	24.7574		
		Median	29.4000		
		Variance	213.018		
		Std. Deviation	14.59512		
		Minimum	4.90		
		Maximum	41.80		
		Range	36.90		
		Interquartile Range	27.6750		
		Skewness	-.534	.845	
		Kurtosis	-1.483	1.741	
		perlakuan	perlakuan	Mean	8.0833
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound			-3.4611	
	Upper Bound			19.6278	
5% Trimmed Mean	7.7315				
Median	1.6500				
Variance	121.014				
Std. Deviation	11.00062				
Minimum	.10				
Maximum	22.40				
Range	22.30				
Interquartile Range	21.7000				
Skewness	.948			.845	
Kurtosis	-1.876			1.741	

kelompok kontrol

koefisien varian 0.589431 n  
 rasio skewness -0.63095 n  
 rasio kurtosis -0.85057 n

kelompok perlakuan

koefisien varian 1.375 n  
 rasio skewness -1.11905 n  
 rasio kurtosis -1.07471 n

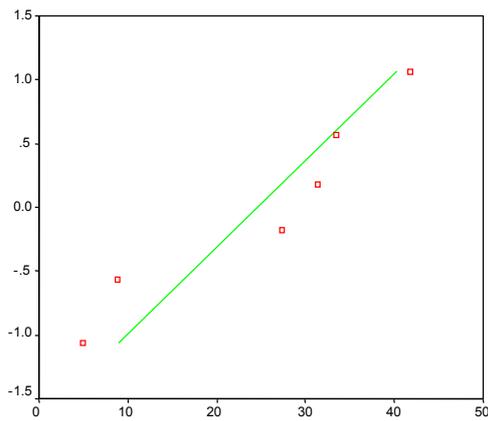
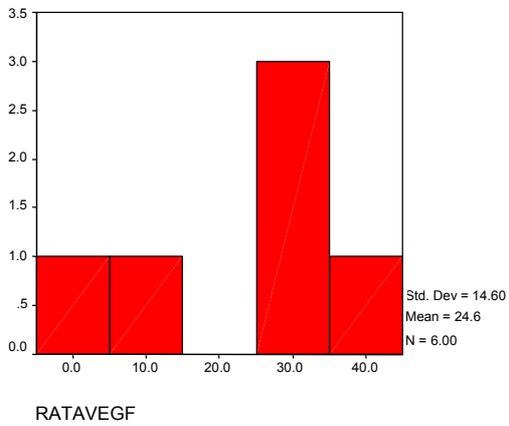
**Tests of Normality**

KLPTIKUS	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
RATAVEGF Kontrol	.242	6	.200*	.901	6	.382
perlakuan	.364	6	.013	.695	6	.005

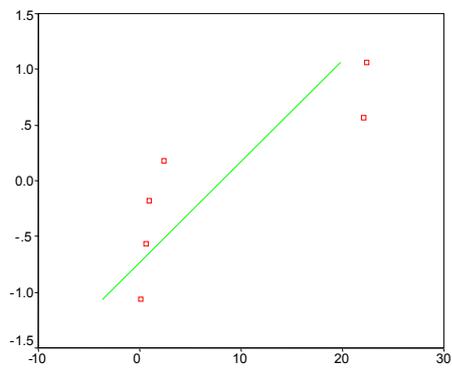
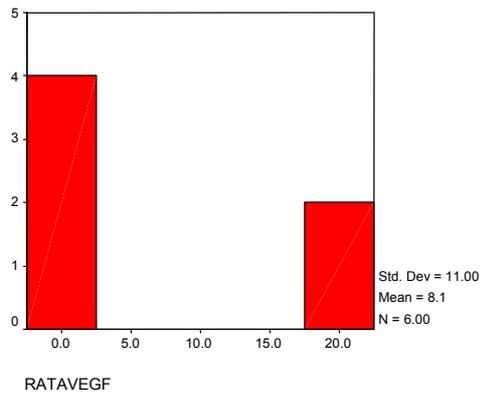
\*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

**kelompok kontrol**



## kelompok perlakuan



## Lampiran 6: Uji Komparasi N Par Mann-Whitney Test

**Ranks**

	KLPTIKUS	N	Mean Rank	Sum of Ranks
RATAVEGF	Kontrol	6	8.83	53.00
	perlakuan	6	4.17	25.00
	Total	12		

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

	RATAVEGF
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	25.000
Z	-2.242
Asymp. Sig. (2-tailed)	.025
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.026 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: KLPTIKUS

## **Lampiran 7. Prosesing jaringan**

### **Langkah:**

1. Fiksasi. Ginjal dimasukkan dalam formalin selama 24 jam.
2. Dehidrasi. Jaringan ginjal dipilih dan dimasukkan dalam alkohol bertingkat, 70%, 80%, 96%, 100%.
3. Clearing. Jaringan dimasukkan dalam xylol secara bertingkat.
4. Impragnating. Media padat parafin dicairkan dan dimasukkan dalam jaringan.
5. Embeding. Pembuatan blok. Cetak blok disiapkan, parafin cair dituangkan, jaringan kecil ditaruh didasar blok, didinginkan diudara kira-kira 1,5-2 jam sampai padat.

Lampiran 8 Foto Hasil Penelitian



Gambar a. Terminasi Hewan Coba



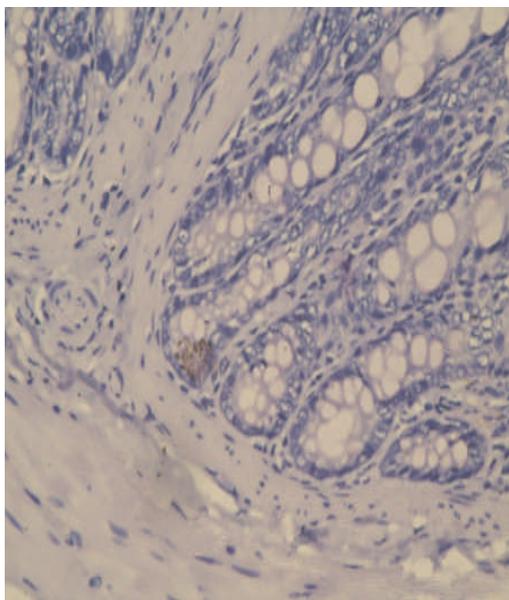
Gambar b. Coding Jaringan Kolorektal



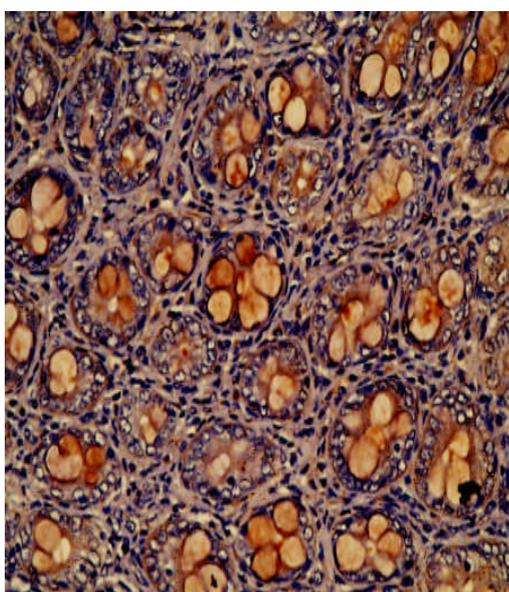
Gambar c.  
Makroskopis kolorektal pada tikus normal



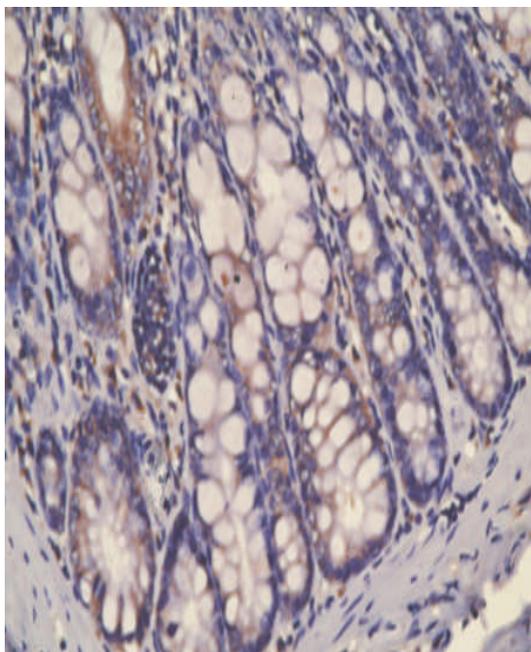
Gambar D  
Makroskopis kolorektal pada tikus  
Adenokarsinoma kolorektal.



Gambar e. Tidak tampak ekspresi VEGF pada tikus normal



Gambar f. Banyak Ekspresi VEGF (42 %) kelompok Kontrol Tanpa pemberian Phylantus niruri ( X1.4. pembesaran 400x).



Gambar f. Sedikit Ekspresi VEGF (4%) kelompok perlakuan dengan pemberian *Phyllanthus niruri* ( X2.12. pembesaran 400x).