

Ekstrak Metanol Daun Kelor Menurunkan Kadar TNF- α dan IL-6 Serum, serta MDA Kolon Tikus yang Diinduksi DMBA

Methanolic Extract of Moringa oleifera Reduces Serum TNF- α , IL-6, and Colonic Tissue MDA Levels in DMBA-induced Wistar Rats

Tinny Endang H, Dian Sukma H

Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

ABSTRAK

Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dapat berfungsi sebagai anti oksidan, anti radang, dan anti kanker. TNF- α dan IL-6 merupakan sitokin proinflamasi yang berperan penting pada patogenesis kanker, sedangkan pada jaringan kanker sering ditemukan peningkatan kadar MDA. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak metanol daun kelor terhadap kadar TNF- α dan IL-6 serum serta MDA jaringan kolon tikus Wistar yang diinduksi DMBA. Penelitian eksperimental *post test group design* dilakukan pada 20 ekor tikus yang dipilih secara acak. Semua tikus dibagi dalam 5 kelompok yaitu kontrol negatif, kontrol positif, dan kelompok perlakuan ekstrak daun kelor. Tikus diinduksi DMBA 10mg/kgBB/hari peroral selama 44 hari, kemudian ekstrak metanol daun kelor dosis 20mg/kgBB/hari, 40mg/kgBB/hari, dan 80mg/kgBB/hari selama 60 hari dan selanjutnya diperiksa. Pemeriksaan kadar TNF- α dan IL-6 dengan metode ELISA sedangkan pemeriksaan kadar MDA dengan metode kolorimetrik. Data dianalisis dengan uji Anova, uji Tuckey, uji Kruskal-Wallis, uji Mann-Whitney, dan uji korelasi. Hasil penelitian menunjukkan dosis efektif dalam menurunkan kadar TNF- α dan MDA didapatkan pada pemberian ekstrak metanol daun kelor dosis 20mg/kgBB/hari ($p=0,000$; $0,019$), sedangkan penurunan kadar IL-6 terhadap IL-6 ditunjukkan pada dosis 20mg/kgBB/hari ($p=0,019$), tetapi belum mencapai dosis efektif. Pada pemberian dosis 80mg/kgBB/hari didapatkan peningkatan TNF- α , IL-6, dan MDA yang bermakna ($p=0,000$; $0,000$; $0,020$). Dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak metanol daun kelor dapat menurunkan kadar TNF- α , IL-6, dan MDA dengan dosis efektif adalah 20mg/kgBB/hari.

Kata Kunci: Daun kelor, DMBA, IL-6, MDA, TNF- α

ABSTRACT

The leaf extracts of *Moringa oleifera* can act as antioxidant, anti-inflammatory, and anti-cancer agents. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and Interleukin 6 (IL-6) are pro-inflammatory cytokines that play important roles in cancer pathogenesis, whereas increased levels of malondialdehyde (MDA) are often observed in patients with cancer. The aim of this study was to prove the effects of the administration of *Moringa oleifera* leaf extracts on level of TNF- α and IL-6 serum as well as on MDA tissue levels in the colon of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced Wistar rats. A posttest-group experimental design was used in this study. Twenty rats were randomly selected and divided into negative control group, positive control group and *Moringa oleifera* treated group. The rats were given 10mg/kgBW/day of DMBA orally for 44 days, followed by 20mg/kgBW/day, 40mg/kgBW/day, and 80mg/kgBW/day of methanolic extract of *Moringa oleifera* for 60 days. Serum TNF- α and IL-6 levels were measured using ELISA and the colonic tissue levels of MDA were determined by colorimetric method. Statistical analysis was performed using the ANOVA, Tuckey, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney and correlation tests. The results showed that the effective dose to decrease the TNF- α and MDA levels for the methanolic extract of *Moringa oleifera* was 20mg/kgBW/day ($p=0,000$ and $p=0,019$, respectively). At the same dose, the IL-6 levels were also decreased, but has not yet reached the effective dose. Significantly elevated levels of TNF- α , IL-6, and MDA were observed at the dose of 80mg/kgBW/day ($p=0,000$, $p=0,000$, and $p=0,020$, respectively). Thus, it can be concluded that oral administration of the methanolic extract of *Moringa oleifera* at 20mg/kgBW/day was able to reduce the TNF- α , IL-6, and MDA levels.

Keywords: DMBA, IL-6, MDA, *Moringa oleifera*, TNF- α

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. 29, No. 1, Februari 2016; Korespondensi: Dian Sukma H. Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, Jl. Veteran 65145 Malang, Telp (0341) 357407 Email: ds.hanggara@gmail.com

PENDAHULUAN

Kanker kolon merupakan kanker urutan nomor tiga yang paling sering didiagnosis dan penyebab kematian akibat kanker nomor tiga pada laki dan perempuan di Amerika Serikat. *American Cancer Society* memperkirakan sekitar 136.830 orang akan didiagnosis kanker kolon dan 50.310 orang akan meninggal karenanya pada tahun 2014 (1). Resiko timbulnya kanker kolon dan rektum selama hidup adalah 5% dan 6-8% dari kasus terjadi sebelum umur 40 tahun. Insiden meningkat setelah umur 50 tahun. Di Indonesia terdapat kenaikan jumlah kasus tetapi belum ada angka yang pasti insiden penyakit kanker kolon dan rektum ini (2).

Beberapa sitokin proinflamasi yang dilepaskan oleh sel imun telah diketahui berperan dalam pertumbuhan sel kanker. Salah satu diantaranya yaitu interleukin-6 (IL-6) merupakan sitokin kunci dalam perkembangan kanker. Peningkatan IL-6 diketahui berhubungan dengan prognosis buruk pada penderita kanker kolon (3). Selain IL-6, *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) juga berperan dalam patogenesis kanker kolon. Peningkatan TNF- α ditemukan pada biopsi kolon pasien kanker kolon dan diduga berperan dalam proses metastasis kanker (4,5). Adanya inflamasi juga dapat menghasilkan radikal bebas pada jaringan kolon yang berperan dalam patogenesis kanker kolon, dimana dapat ditemukan peningkatan kadar *malondialdehyde* (MDA) pada jaringan kolon penderita kanker kolon (6).

DMBA (7,12-dimethylbenz[a]anthracene), adalah sebuah karsinogen spesifik organ, yang pada aktivasi metabolitnya memproduksi karsinogen pokok, yaitu *dihydrodiol epoxide*, yang dapat memediasi transformasi neoplastik dengan menginduksi kerusakan DNA, dan membentuk *Reactive Oxygen Species* (ROS) berlebihan, serta memediasi proses inflamasi kronis. Sejumlah besar karsinogen kimia, termasuk DMBA, menimbulkan karsinogenesis melalui kerusakan oksidatif jaringan dan sel yang dimediasi radikal bebas. Produksi besar-besaran ROS karena stres oksidatif pada sistem dapat menginduksi kerusakan rantai dan dapat memodifikasi basa DNA sehingga terjadi mutagenesis dan karsinogenesis (7).

Di Indonesia, secara khusus di Nusa Tenggara Timur (NTT), kelor dapat tumbuh dan berkembang biak, hal ini dikarenakan NTT merupakan daerah yang memiliki topografi dan suhu yang cocok sebagai tempat hidup tanaman kelor (8). Pada penelitian ditemukan bahwa kelor mengandung asam amino, kalsium, antioksidan seperti vitamin C, vitamin E, dan senyawa polifenol, serta zat-zat yang lain (9). Berbagai penelitian menunjukkan manfaat daun kelor sebagai antioksidan dan antitumor. Daun kelor diketahui memiliki efek antiproliferasi, meningkatkan apoptosis, hambatan pertumbuhan tumor, antigenotoksik, dan antisitotoksik (10,11). Penelitian ini dilaksanakan untuk membuktikan bahwa pemberian daun kelor yang mengandung antioksidan, antiinflamasi, dan antikanker pada tikus yang diinduksi DMBA akan diikuti dengan penurunan zat-zat inflamasi, terutama TNF- α dan IL-6, dan kadar MDA pada jaringan kolon tikus.

METODE

Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan eksperimen sederhana (*post test*

control group design). Sebanyak 20 ekor tikus Wistar dibagi menjadi 5 kelompok (I sampai dengan V) secara random. Tiap kelompok terdiri dari 4 tikus. Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari komisi etik penelitian kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Untuk kelompok I (kontrol negatif), tikus hanya diberi pakan normal dengan komposisi *comfeed* PARS 53% (dengan kandungan air 12%, protein 11%, lemak 4%, serat 7%, abu 8%, Ca 1,1%, fosfor 0,9%, antibiotika, coccidiostat 53%) dan tepung terigu 23,5% dan air 23,5%. Kelompok II hingga V diberi diet normal dan induksi DMBA sebanyak 10mg/kgBB/hari dengan sonde per oral tiap jam 10 pagi selama 44 hari. Setelah hari ke 44, kelompok II diberi diet normal tanpa pemberian ekstrak metanol daun kelor. Kelompok III (perlakuan I) diberi ekstrak metanol daun kelor dengan disonde per oral dengan dosis 20mg/kgBB/hari pada diet normal. Kelompok IV (perlakuan II) diberi ekstrak metanol daun kelor dengan disonde per oral dengan dosis 40mg/kgBB/hari pada diet normal per hari. Kelompok V (perlakuan III) diberi ekstrak metanol daun kelor dengan disonde per oral dengan dosis 80mg/kgBB/hari pada diet normal per hari. Diet ekstrak daun kelor pada semua kelompok diberikan selama 60 hari, sedangkan pakan normal saja selama 105 hari. Tikus dibunuh dengan cara pembusuan eter pada hari ke 104. Toraks dibuka kemudian sampel darah dan jaringan kolon diambil, setelah itu hematokrit dan serum darah dipisahkan. Kemudian dari serum darah diperiksa TNF- α dan IL-6 dan dari jaringan kolon diperiksa kadar MDA.

Proses Ekstraksi Daun Kelor

Tepung daun kelor varietas NTT yang digunakan yaitu tepung daun kelor yang diproduksi oleh PT. Timor Mulia Sentosa. Proses ekstraksi meliputi tiga tahapan proses, yaitu proses pengeringan, proses ekstraksi, dan proses evaporasi. Pada proses pengeringan, daun kelor yang telah disiapkan dicuci bersih, dipotong kecil-kecil, dan selanjutnya dioven dengan suhu 80°C sampai kering. Pada proses ekstraksi, daun kelor yang kering dihaluskan dengan menggunakan blender sampai halus. Selanjutnya daun kering yang telah dihaluskan tersebut ditimbang sampai didapatkan berat sampel 100 gram. Sampel sebanyak 100 gram tersebut dimasukkan ke dalam gelas *erlenmeyer* ukuran 1 liter dan direndam dengan metanol sebanyak 3 kali sampai volume 900ml. Sampel yang direndam tersebut didiamkan semalam sampai mengendap. Pada tahap evaporasi, diambil lapisan atas campuran metanol dengan zat aktif pada sampel yang telah direndam. Lapisan tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam labu evaporasi ukuran 1 liter. Selanjutnya dipasang labu evaporator pada evaporator dan diisi dengan *waterbath* sampai penuh. Selanjutnya juga dipasang semua rangkaian alat, termasuk *rotatory evaporator* dan pemanas *waterbath* (diatur sampai suhu 90°C). Larutan metanol dalam labu tersebut dibiarkan memisah dari zat aktif, ditunggu sampai aliran metanol berhenti menetes pada labu penampung. Hasil ekstraksi yang diperoleh tersebut dimasukkan ke dalam botol plastik dan disimpan dalam *freezer* sampai digunakan.

Pemeriksaan TNF- α dan IL-6 dengan Metode ELISA (Quantikine® ELISA Rat TNF-alpha/IL-6 immunoassay)

Diluen uji RD1-41 sebanyak 50 μ L dimasukkan ke dalam semua sumur. Pada masing-masing sumur dimasukkan

50 μ L standar, kontrol, dan sampel, dicampurkan secara halus selama 1 menit, ditutup dengan perekat, dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu ruang. Tiap sumur diaspirasi dan dicuci 5 kali. Pencucian dilakukan dengan 400 μ L *wash Buffer*. Pada akhir pencucian, sisa dari *wash buffer* dibuang dan dikeringkan dengan kertas pengering. *Rat TNF- α /IL-6 Conjugate* sebanyak 100 μ L dimasukkan ke masing-masing sumur, ditutup dengan perekat, dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu ruang. Kemudian dilakukan pencucian ulang sebanyak 5 kali. Ditambahkan 100 μ L *substrate solution* pada masing-masing sumur, diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang, dan harus dilindungi dari sinar. Ditambahkan 100 μ L *stop solution* ke dalam masing-masing sumur dan dicampurkan. Dalam 30 menit dibaca pada panjang gelombang 450nm.

Pemeriksaan MDA dengan Metode Kolorimetrik (Bioxytech® MDA-586 Assay Kit)

Jaringan kolon dibersihkan dengan 0,9% NaCl dan ditimbang untuk menentukan perbandingan dengan buffer PBS (1gram jaringan per 10ml *buffer*). 10 μ L 0,5 M BHT dalam *acetonitrile* ditambahkan per 1ml homogenat jaringan. Homogenat disentrifus 3000g pada suhu 4°C selama 10 menit. Sebanyak 200 μ L supernatan yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung gelas atau tabung mikrosentrifus polipropilen bersama dengan 650 μ L reagen R1 dan divortex. Kemudian ditambahkan 150 μ L HCl terkonsentrasi (12N), dicampur, dan ditutup. Inkubasi dilakukan pada suhu 45°C selama 60 menit. Sampel kemudian disentrifus 15.000g selama 10 menit untuk mendapatkan supernatan yang jernih dan diukur pada panjang gelombang 586nm.

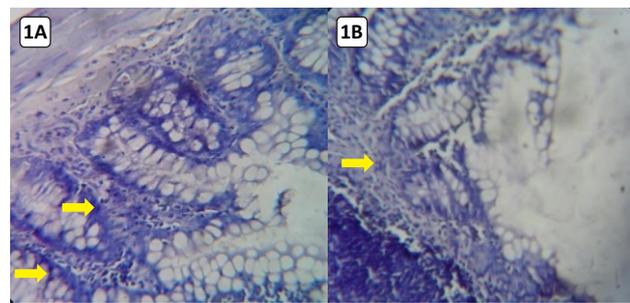
Analisis Statistik

Hasil pengukuran kadar IL-6, TNF- α , dan MDA serum tikus kontrol dan perlakuan dianalisis secara statistik dengan menggunakan Uji ANOVA dan *Kruskal-Wallis* dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$), dilanjutkan dengan Uji *Tuckey* dan *Mann-Whitney* serta uji korelasi.

HASIL

Sejumlah 22 ekor tikus Wistar diikutsertakan pada awal penelitian ini, dengan 18 ekor diinduksi DMBA per oral selama 44 hari dan 4 ekor hanya diberikan diet biasa. Setelah 44 hari, 2 ekor tikus dimatikan dengan pembiusan eter untuk pembuktian telah terjadinya kanker kolon pada tikus kontrol positif. Sehingga ada 20 ekor tikus Wistar yang diikutsertakan dalam eksperimen pemberian ekstrak metanol daun kelor dengan dosis yang berbeda (20mg/kgBB, 40mg/kgBB, dan 80mg/kgBB) selama 60 hari. Kedua tikus yang dimatikan tersebut dilakukan pemeriksaan histologi jaringan kolon sebagai indikator kanker kolon, yaitu dengan pengecatan *Mayer hematoxylen*. Setelah pemberian ekstrak metanol daun kelor, semua tikus percobaan dimatikan untuk diambil serumnya dan dilakukan pemeriksaan kadar TNF- α dan IL-6, serta kadar MDA pada jaringan kolon.

Hasil pemeriksaan jaringan kolon tikus Wistar K+ mengesankan suatu proliferasi displastik ringan dari sel-sel kriptus usus besar dan belum terjadi penetrasi ke mukosa muskularis maupun submukosa (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian DMBA 10mg/kgBB/hari per oral melalui sonde selama 44 hari belum cukup untuk membuat tikus Wistar model kanker kolon.



Gambar 1. Gambaran histologik jaringan kolon tikus Wistar kontrol positif (P 1000x)

Keterangan: Terdapat proliferasi ringan displastik dari sel kriptus kolon disertai dengan inflamasi ringan belum penetrasi ke mukosa muskularis maupun submukosa

Pada 60 hari setelah pemberian ekstrak metanol daun kelor, semua tikus percobaan dimatikan untuk dilakukan pemeriksaan TNF- α dan IL-6 serum, serta kadar MDA jaringan kolon (Tabel 1). Hasil Uji ANOVA dari data pemeriksaan kadar TNF- α menunjukkan perbedaan yang bermakna antar perlakuan ($p=0,000$) dan dilanjutkan dengan uji *Tuckey*. Dari hasil uji *Tuckey* didapatkan peningkatan kadar TNF- α yang bermakna pada K+ dibandingkan dengan K- ($p=0,000$). Terdapat penurunan kadar TNF- α yang bermakna dari PI dan PII jika dibandingkan dengan K+ ($p=0,000$; 0,016), sedangkan jika dibandingkan dengan K-, tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ($p=0,994$; 0,299). Pada PIII terdapat peningkatan yang bermakna jika dibandingkan dengan K- ($p=0,000$) dan tidak berbeda bermakna jika dibandingkan dengan K+ ($p=0,145$). Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian perlakuan daun kelor dosis I dan II (20 dan 40mg/kgBB/hari) mampu memberikan penurunan kadar TNF- α dibandingkan kontrol positif (kondisi induksi DMBA) hingga sama dengan kondisi normal (kontrol negatif). Peningkatan dosis daun kelor menjadi 80mg/kgBB/hari tidak memberikan penurunan kadar TNF- α , bahkan tidak berbeda dengan kondisi kanker dan lebih tinggi dibandingkan kondisi normal.

Hasil Uji Anova dari data pemeriksaan kadar IL-6 menunjukkan perbedaan yang bermakna antar perlakuan ($p=0,000$) dan dilanjutkan dengan uji *Tuckey*. Dari hasil uji *Tuckey* terhadap data IL-6 didapatkan peningkatan kadar IL-6 yang bermakna pada K+ dibandingkan dengan K- ($p=0,000$). Terdapat penurunan kadar IL-6 yang bermakna dari PI jika dibandingkan dengan K+ ($p=0,001$), sedangkan pada PII tidak didapatkan perbedaan yang bermakna jika dibandingkan dengan K+ ($p=0,996$). Pada PIII terdapat peningkatan yang bermakna jika dibandingkan dengan K+ ($p=0,000$). Hasil ini menunjukkan dosis efektif daun kelor pada pada dosis I (20mg/kgBB/hari) karena dapat memberikan penurunan IL-6 bermakna dibandingkan kontrol positif, sedangkan pada dosis II tetap sama dengan kondisi induksi DMBA, dan bahkan pada dosis III menghasilkan kadar IL-6 yang lebih tinggi dari kontrol positif (kondisi induksi DMBA)

Uji *Kruskal-Wallis* yang dilakukan pada data MDA menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna setidaknya pada dua perlakuan ($p=0,002$) dan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*. Dari uji *Mann-Whitney* didapatkan perbedaan yang bermakna antara K- dengan

Tabel 1. Kadar TNF- α dan IL-6 serum serta MDA pada jaringan kolon dalam berbagai dosis

Kelompok Perlakuan	N (20)	TNF- α (rerata \pm SD)pg/ml	IL-6 (rerata \pm SD)pg/ml	MDA (rerata \pm SD) μ M
Diet normal (K-)	4	2,875 \pm 1,974 ^a	472,125 \pm 18,971 ^a	1,064 \pm 0,278 ^a
Diet normal+induksi DMBA (K+)	4	13,750 \pm 0,890 ^b	819,000 \pm 91,047 ^b	5,321 \pm 0,274 ^b
Ekstrak daun kelor 20 mg/kgBB (P I)	4	2,500 \pm 2,102 ^a	582,750 \pm 57,264 ^c	0,979 \pm 0,043 ^a
Ekstrak daun kelor 40 mg/kgBB (P II)	4	5,563 \pm 1,405 ^a	837,250 \pm 60,497 ^b	1,764 \pm 0,208 ^c
Ekstrak daun kelor 80 mg/kgBB (P III)	4	21,625 \pm 4,521 ^b	1725,250 \pm 215,222 ^d	2,124 \pm 0,199 ^c

Keterangan: abc notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan

K+ ($p=0,020$) dan didapatkan penurunan kadar MDA yang bermakna antara K+ dengan ketiga kelompok perlakuan (berturut-turut PI, PII, dan PIII $p=0,019$; $0,020$; $0,020$). Tidak didapatkan perbedaan yang bermakna antara K- dengan PI ($p=0,245$). Terdapat peningkatan kadar MDA yang bermakna pada P III jika dibandingkan dengan K- dan P I ($p=0,020$; $0,021$), tapi tidak bermakna jika dibandingkan dengan P II ($p=0,083$). Artinya pemberian daun kelor pada semua dosis mampu memberikan penurunan signifikan kadar MDA dibandingkan kontrol positif (kondisi induksi DMBA). Dosis 20mg/kgBB/hari merupakan dosis efektif karena memberikan penurunan hingga sama dengan kondisi diet normal, sedangkan peningkatan dosis tidak memberikan penurunan hingga sama dengan normal.

Hubungan antara kadar IL-6 dan MDA dengan TNF- α menunjukkan hubungan yang positif, sangat kuat, dan bermakna ($r=0,837$ $p=0,000$; $r=0,766$ $p=0,000$), sedangkan hubungan antara kadar IL-6 dengan MDA menunjukkan hubungan yang positif, kuat, dan bermakna ($r=0,681$ $p=0,001$) (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil uji korelasi antara TNF- α , IL-6, dan MDA setelah perlakuan

Korelasi antara	Koefisien korelasi (r)	p.value
TNF- α dan IL-6	0,837	0,000
TNF- α dan MDA	0,766	0,000
IL-6 dan MDA	0,681	0,001

DISKUSI

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak metanol daun kelor terhadap kadar TNF- α dan IL-6 pada serum dan MDA pada jaringan kolon tikus Wistar yang diinduksi DMBA. Tikus Wistar diinduksi dengan memberikan bahan karsinogenik yaitu DMBA 10mg/kgBB/hari selama 44 hari untuk selanjutnya dilihat bagaimana pengaruhnya terhadap jaringan kolon tikus. Setelah pemberian DMBA, tikus K+ dimatikan untuk dilihat apakah terdapat kanker pada jaringan kolonny. Dari hasil pemeriksaan histologi jaringan kolon tikus K+ mengesankan adanya proliferasi displastik ringan dari sel kripta kolon dan belum terjadi penetrasi ke submukosa dan mukosa muskularis. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian DMBA 10mg/kgBB/hari selama 44 hari belum mampu menginduksi terjadinya kanker kolon pada tikus. Pada penelitian yang dilakukan oleh Mclellan *et al*, potensi DMBA untuk menginduksi terjadinya kanker kolon diketahui lemah. Pada penelitian tersebut DMBA dilaporkan dapat menyebabkan lesi preneoplastik dengan gambaran sel kripta kolon yang *aberrant* (12).

Pemberian DMBA per oral melalui sonde pada penelitian ini berdampak terhadap bioavailabilitas bahan tersebut dalam darah tikus menjadi lebih rendah sehingga mengurangi efektivitasnya dalam menginduksi terjadinya kanker. Agar memiliki kemampuan menginduksi kanker, DMBA harus dimetabolisme terlebih dulu di hati menjadi bahan metabolitnya yaitu *7-hydroxy-DMBA*. Metabolit inilah yang memiliki sifat oksidan reaktif terhadap DNA dari sel. Beberapa penelitian memperlihatkan bahwa DMBA yang tidak mengalami perubahan menjadi *7-hydroxy-DMBA* gagal dalam menyebabkan kanker (13-16).

Pada beberapa penelitian sebelumnya telah diketahui bahwa ekstrak metanol daun kelor memiliki efek antiinflamasi. Molekul *aurantiamide acetate* dan *1,3-dibenzyl urea* dalam ekstrak metanol daun kelor inilah yang dikatakan memiliki efek antiinflamasi dengan cara menghambat ekspresi TNF- α (17). Efek hambatan terhadap TNF- α ini dapat menurunkan inflamasi fase akut, menekan pertumbuhan kanker kolon, meningkatkan respon imun seluler, menekan proliferasi dan diferensiasi sel inflamasi (18). Pada penelitian ini didapatkan bukti pengaruh DMBA dalam menginduksi peradangan. Hasil menunjukkan kelompok perlakuan yang paling efektif dalam menurunkan kadar TNF- α adalah pada kelompok PI dengan dosis 20mg/kgBB/hari.

Beberapa penelitian terdahulu telah menunjukkan bahwa pemberian antioksidan menyebabkan penurunan kadar IL-6 dalam darah (19). Pemberian ekstrak daun kelor sebagai salah satu sumber antioksidan diketahui dapat menurunkan produksi IL-6 oleh makrofag yang diinduksi asap rokok (20). Pada penelitian ini didapatkan perbedaan kadar IL-6 yang bermakna antara kelompok K- dengan K+, menunjukkan adanya pengaruh induksi DMBA terhadap peningkatan kadar IL-6 pada serum tikus ($p=0,000$). Pada pemberian ekstrak daun kelor dengan dosis 20mg/kgBB/hari (PI), terjadi penurunan kadar IL-6 secara bermakna dibandingkan dengan K+ ($p=0,001$).

Antioksidan dalam daun kelor mempunyai efek hambatan aktivasi NF- κ B melalui kemampuannya mengikat atom dalam radikal bebas sehingga tidak terbentuk ROS berlebihan. Pada percobaan ini ROS terbentuk akibat pemberian DMBA. ROS dapat merangsang proses fosforilasi dari Inhibitor KB (IKB). IKB berfungsi untuk mengikat NF- κ B sehingga tetap tidak aktif di sitoplasma. Apabila IKB terfosforilasi maka ikatan NF- κ B dan IKB terlepas, sehingga NF- κ B menjadi aktif dan berpindah ke inti. Proses ini disebut proses aktivasi NF- κ B. Apabila pembentukan ROS dihambat oleh zat aktif daun kelor, maka aktivasi NF- κ B pun dapat dihambat. Hambatan aktivasi NF- κ B ini selanjutnya akan menghambat produksi sitokin proinflamasi, diantaranya adalah TNF- α dan IL-6 (21-23).

MDA merupakan hasil akhir dari reaksi peroksidasi lipid, yang menunjukkan kerusakan akibat dari radikal bebas dan

stres oksidasi (24). Radikal bebas tersebut mampu merusak DNA dan memodifikasi struktur dan fungsi protein yang berhubungan dengan kanker secara langsung (25). Dapat disimpulkan bahwa kadar MDA menunjukkan besarnya stress oksidatif yang terjadi. Hasil Uji *Kruskal-Wallis* pada penelitian ini menunjukkan terdapat perbedaan kadar MDA yang bermakna antar kelompok ($p=0,002$). Kadar MDA pada K+ lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan K- ($p=0,020$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian DMBA secara per oral dapat menginduksi terjadinya peroksidasi lipid pada jaringan kolon, walaupun belum timbul sel kanker pada pemeriksaan histologi. Hasil menunjukkan bahwa pemberian ekstrak metanol daun kelor dengan dosis berturut-turut 20mg/kgBB/hari, 40mg/kgBB/hari, dan 80mg/kgBB/hari dapat menurunkan kadar MDA pada jaringan kolon tikus Wistar yang telah diinduksi DMBA, dimana dosis efektif ditunjukkan pada dosis 20mg/kgBB/hari.

DMBA merupakan zat karsinogen yang pada aktivasi metabolik dapat memproduksi ROS dalam jumlah yang banyak dan memediasi proses inflamasi yang diikuti oleh dikeluarkannya zat-zat proinflamasi seperti TNF- α dan IL-6. Selanjutnya, ROS akan menstimulasi aktivasi faktor transkripsi, salah satunya adalah NF- κ B, yang pada tahap berikutnya akan mengekspresikan gen proinflamasi. Gen-gen pro-inflamasi ini akan memproduksi zat-zat proinflamasi, termasuk TNF- α dan IL-6, sehingga kadarnya semakin meningkat. Inflamasi kronis akan menghasilkan ROS dan RNOS yang dapat secara langsung merusak DNA dan menyebabkan mutasi genetik. Selain itu, ROS dan RNOS ini akan memicu reaksi peroksidasi lipid dan kaskade asam arakidonat. Kedua reaksi tersebut akan menghasilkan MDA (7,26). Efek daun kelor dalam menurunkan kadar TNF- α , IL-6, dan MDA terutama akibat bahan antioksidannya yang dapat menurunkan ROS.

Hasil uji korelasi menunjukkan terdapat hubungan positif yang kuat dan bermakna dari kadar TNF- α , IL-6, dan MDA dimana dengan meningkatnya dosis pemberian ekstrak daun kelor didapatkan kadar TNF- α , IL-6, dan MDA yang juga makin meningkat. Pada kelompok PIII ditemukan peningkatan kadar TNF- α dan IL-6 yang bermakna dibandingkan dengan K- ($p=0,000$; $0,000$). Tidak didapatkan perbedaan kadar TNF- α yang bermakna antara PIII dengan K+ ($p=0,145$) dan kadar IL-6 antara PII dengan K+ ($p=0,996$). Hal ini menunjukkan kemungkinan adanya efek prooksidasi dari ekstrak metanol daun kelor pada dosis 80mg/kgBB/hari.

Pada penelitian sebelumnya diketahui adanya efek prooksidasi dari daun kelor dengan adanya peningkatan dosis tertentu. Penelitian yang dilakukan oleh Sudha et al menunjukkan dengan meningkatnya dosis ekstrak metanol daun kelor dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif (27). Sebaliknya pada penelitian yang lain

diketahui bahwa *quercetin* memiliki efek prooksidasi pada pemberian dengan konsentrat tinggi, dengan menghasilkan ROS melalui proses autooksidasi dan redoks siklik (28). Efek prooksidasi ini tidak selalu berbahaya karena pembentukan ROS kemungkinan toksik selektif terhadap sel kanker dan pada akhirnya menghasilkan efek antioksidan dalam membantu sistem pertahanan tubuh (29).

Keterbatasan penelitian ini adalah tidak terjadinya sel kanker pada jaringan kolon tikus Wistar yang diinduksi DMBA secara oral. Pemeriksaan histologi hanya menemukan displasia dan inflamasi ringan. Pada penelitian sebelumnya pada tikus strain Wistar yang diberikan DMBA secara peroral dengan dosis 20mg/kgBB/hari, juga hanya ditemukan erosi mukosa tanpa adanya sel kanker pada kolon (30). Penelitian yang lain dengan memeriksa jaringan kolon tikus Wistar yang diberikan DMBA per oral dengan dosis 10mg/kgBB/hari selama 30 hari juga hanya ditemukan proliferasi abnormal tanpa adanya perubahan menuju keganasan (31). Hal ini diperkuat dengan adanya peningkatan jumlah sel yang mengalami mitosis pada jaringan kolon tikus Wistar yang diinduksi DMBA (32). Pada penelitian yang dilakukan oleh Boy et al, dengan pemberian ekstrak metanol daun kelor, tidak ditemukan adanya peningkatan aktivitas apoptosis pada jaringan kolon tikus Wistar yang diinduksi DMBA. Meskipun demikian dapat ditemukan efek antiinflamasi dari ekstrak metanol daun kelor dengan didapatkan penurunan ekspresi TRAIL-R1 dan protein bcl-2 pada jaringan kolon tikus Wistar yang diinduksi DMBA (33).

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak metanol daun kelor varian NTT terbukti berpengaruh terhadap kadar TNF- α dan IL-6 serum serta kadar MDA jaringan kolon tikus Wistar yang diinduksi DMBA. Dosis efektif dalam menurunkan kadar TNF- α dan MDA ditemukan pada pemberian ekstrak metanol daun kelor dosis 20mg/kgBB/hari, sedangkan penurunan kadar IL-6 ditunjukkan pada dosis 20mg/kgBB/hari tetapi belum mencapai dosis efektif. Pada penelitian ini juga ditemukan peningkatan kadar TNF- α dan IL-6 yang bermakna pada pemberian ekstrak daun kelor 80mg/kgBB/hari jika dibandingkan dengan kontrol positif.

Pemberian DMBA per oral pada penelitian ini menginduksi terjadinya displasia ringan dan inflamasi pada jaringan kolon tikus. Pada penelitian selanjutnya untuk dapat menginduksi terjadinya kanker kolon, penulis menyarankan untuk menggunakan bahan karsinogen yang berbeda. Terdapat dua cara dalam membuat tikus Wistar model kanker kolon, yaitu dengan menggunakan *azoxymethane* dengan dosis 10mg/kgBB yang diberikan secara intraperitoneal selama 25 minggu atau DMAB dengan dosis 100mg/kgBB secara subkutan selama 20 minggu.

DAFTAR PUSTAKA

1. Alteri R, Bandi P, Brooks D, et al. *Colorectal Cancer Facts and Figures: 2011-2013*, American Cancer Society. (Online) 2013. <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-028323.pdf>
2. Zahari A. *Deteksi Dini, Diagnosa, dan Penatalaksanaan Kanker Kolon dan Rektum*. Di dalam: Suplemen Majalah Kedokteran Andalas, Dalam Rangka Dies Natalis 53 FK Unand. Padang: Universitas Andalas: 2008; hal. 98-121.
3. Waldner MJ, Foersch S, and Neurath MF. *Interleukin 6 – A Key Regulator of Colorectal Cancer Development*. International Journal of Biological Sciences. 2012; 8(9); 1248-1253.
4. Egberts JH, Cloosters V, Noack A, et al. *Anti Tumor*

- Necrosis Factor Therapy Inhibits Pancreatic Tumor Growth and Metastasis*. *Cancer Research*. 2008; 68(5); 1443-1450.
5. Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, et al. *Blocking TNF- α in Mice Reduces Colorectal Carcinogenesis Associated with Chronic Colitis*. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008; 118(2); 560-570.
 6. Upadhy S, Upadhy S, Mohan SK, Vanajakshamma K, Kunder M, and Mathias S. *Oxidant-Antioxidant Status in Colorectal Cancer Patients Before and After Treatment*. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2004; 19(2); 80-83.
 7. Manoharan S, Balakrishnan S, Menon VP, Alias LM, and Reena AR. *Chemopreventive Efficacy of Curcumin and Piperine during 7,12-Dimethylbenz [a] anthracene- induced Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis*. *Singapore Medical Journal*. 2009; 50(2): 139-146.
 8. Therik and Johannis WD. *Pemanfaatan Moringa oleifera Varietas Lokal (Dalam Upaya Peningkatan Status Gizi Balita, Anak Usia Sekolah, dan Ibu Hamil)*. (Online) 2009. <http://www.timorexpress.com> [diakses tanggal 02 Desember 2014].
 9. Chumark P, Khunawat P, Sanvarinda Y, et al. *The In Vitro and Ex Vivo Antioxidant Properties, Hypolipidaemic, and Antiatherosclerotic Activities of Water Extract of Moringa oleifera Lam Leaves*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008; 116(3):439-446.
 10. Sreelatha S, Jeyachitra A, and Padma PR. *Antiproliferation and Induction of Apoptosis by Moringa oleifera Leaf Extract on Human Cancer Cells*. 2011; 49(6); 1270-1275.
 11. Khalil WKB, Ghaly IS, Diab KAE, and Elmakawy AI. *Antitumor Activity of Moringa oleifera Leaf Extract Against Ehrlich Solid Tumor*. 2014; 4(3); 68-82.
 12. McLellan EA and Bird RP. *Specificity Study to Evaluate Induction of Aberrant Crypts in Murine Colon*. *Cancer Research*. 1988; 48(21): 6183-6186.
 13. Rosenberg DW, Giardina C, and Tanaka T. *Mouse Models for the Study of Colon Carcinogenesis*. *Carcinogenesis*. 2009; 30(2): 183-196.
 14. Izumi K, Otsuka H, Furuya K, and Akagi A. *Carcinogenicity of 1,2-dimethylhydrazine Dihydrochloride in BALB/c Mice, Influence of the Route of Administration and Dosage*. *Virchows Arch. A, Pathology Anatomy and Histology*. 1979; 384(3): 263-267.
 15. Woo YT, Arcos JC, and Lai DY. *Structural and Functional Criteria for Suspecting Chemical Compound of Carcinogenic Activity: State of the Art of Predictive Formalism*. In: Hilman HA and Weisburger (Ed). *Handbook of Carcinogen Testing* 2nd edition. New Jersey: Noyes Publication; 1994; 617-630.
 16. Flesher JW and Sydnor KL. *Carcinogenicity of Derivatives of 7,12-Dimethylbenz(a)-anthracene*. *Cancer Research*. 1971; 31: 1951-1954.
 17. Pandey A, Pandey RD, Tripathi P, et al. *Moringa oleifera Lam- A Plant with a Plethora of Diverse Therapeutic Benefits: An Updated Retrospection*. *Medical & Aromatic Plants*. 2012; 1(1): 1-8.
 18. Nikiteas NI, Tzanakis N, Gazouli M, et al. *Serum IL-6, TNF- α and CRP Levels in Greek Colorectal Cancer Patients: Prognostic Implications*. *World Journal of Gastroenterology*. 2005; 11(11): 1639-1643.
 19. Hopkins MH, Fedirko V, Jones DP, Terry PD, and Bostick RM. *Antioxidant Micronutrients and Biomarkers of Oxidative Stress and Inflammation in Colorectal Adenoma Patients: Results from a Randomized, Controlled Clinical Trial*. *Cancer, Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2010; 19(3): 850-858.
 20. Kooltheat N, Sranujit RP, Chumark P, Potup P, Lewin NL, and Usuwanthim K. *An Ethyl Acetate Fraction of Moringa oleifera Lam. Inhibits Human Macrophage Cytokine Production Induced by Cigarette Smoke*. *Nutrients*. 2014; 6(2): 697-710.
 21. Wihastuti TA, Sargowo D, dan Rohman MS. *The Effect of Moringa Oleifera Leaf Extract in Inhibition of NF- κ B Activation, TNF- α and ICAM-1 Expression in Oxidized LDL treated HUVECS*. *Jurnal Kardiologi Indonesia*. 2007; 28; 181-188.
 22. Nakagawa K, Kawagoe M, Yoshimura M, et al. *Differential Effects of Flavonoid Quercetin on Oxidative Damages Induced by Hydrophilic and Lipophilic Radical Generators in Hepatic Lysosomal Fractions of Mice*. *Journal of Health Science*. 2000; 46(6); 509-512
 23. Tak PP and Firestein GS. *NF- κ B: A Key Role In Inflammatory Diseases*. *The Journal of Clinical Investigation*. 2001; 107(1); 7-11.
 24. Del Rio D, Stewart AJ, and Pellegrini N. *A Review of Recent Studies on Malondialdehyde as Toxic Molecule and Biological Marker of Oxidative Stress*. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Disease*. 2005; 15(4); 316-328.
 25. Hussain SP, Hofseth LJ, and Harris CC. *Radical Causes of Cancer*. *Nature Reviews Cancer*. 2003; 3(4); 276-285.
 26. Bahorun T, Soobrattee MA, Luximon-Ramma V, and Aruoma OI. *Free Radicals and Antioxidants in Cardiovascular Health and Disease*. *Internet Journal of Medical Update*. 2006; 1(2); 25-41.
 27. Sudha P, Asdaq SM, Dhamingi SS, and Chandrakala GK. *Immunomodulatory Activity of Methanolic Leaf Extract of Moringa Oleifera in Animals*. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2010; 54(2): 133-140.
 28. Chang YF, Chi CW, and Wang JJ. *Reactive Oxygen Species Production is Involved in Quercetin-Induced Apoptosis in Human Hepatoma Cells*. *Nutrition and Cancer*. 2006; 55(2): 201-209.
 29. Tourino S, Lizarraga D, Carreras a, et al. *Antioxidant/Prooxidant Effects of Bioactive Polyphenolics*. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural, and Food Chemistry*. 2008; 7(8): 3348-3352.
 30. Hadi AF. *Gambaran Histopatologik Kolon Tikus Sprague Dawley yang Diberi Ekstrak Etanol Akar Pasak Bumi (Eurycoma Longifolia Jack) dan 7,12-dimetilbenz(a)antrasen (DMBA)*. [Skripsi]. Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta. 2009.
 31. Suputro E. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Metanol Daun*

- Moringa oleifera* terhadap Kadar IL-6 Serum pada Tikus Wistar yang Diinduksi DMBA. [Skripsi]. Universitas Brawijaya, Malang. 2011.
32. Miryanthi NL. Pengaruh Ekstrak Metanol Daun *Moringa oleifera* terhadap Jumlah Mitosis Sel pada Jaringan Kolon Tikus Wistar yang Diinduksi DMBA. [Skripsi]. Universitas Brawijaya, Malang. 2012.
33. Sihite BA dan Hernowaty TE. Ekstrak Metanol Daun Kelor Menurunkan Ekspresi BCL-2, TRAIL-R1, dan Kadar Caspase-3 Jaringan Kolon Tikus yang Diinduksi DMBA. Jurnal Kedokteran Brawijaya. 2013; 7(4): 201-206.