

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BIJI ANGGUR  
(*Vitis vinifera*) TERHADAP EKSPRESI GEN CASPASE 3  
DAN ATG 6 PADA LEVEL mRNA DI KOLON MENCIT  
YANG DIINDUKSI *AZOXYMETHANE* (AOM) DAN  
*DEXTRAN SODIUM SULPHATE* (DSS)**

**Wilma Angela  
NPM. 130120110082**

**ABSTRAK**

Tujuan: menganalisis pengaruh ekstrak biji anggur terhadap ekspresi gen caspase 3 dan atg-6 pada mRNA kolon mencit yang diinduksi *azoxymethane* (AOM) dan *dextran sodium sulphate* (DSS).

Metode: menggunakan bahan baku tersimpan berupa mRNA kolon mencit yang berasal dari penelitian eksperimental hewan sebelumnya dengan desain penelitian laboratorium komparatif, yaitu 15 ekor mencit yang dibagi menjadi 3 kelompok : kelompok I (kontrol -) berupa mencit yang diinduksi AOM-DSS dan diberikan pelarut CMC, kelompok II (perlakuan) berupa mencit yang diinduksi AOM-DSS dan diberikan ekstrak biji anggur 280mg/kgBB 1x/hari. Kelompok I dan II dilakukan selama 10 minggu, kelompok III (pembanding) merupakan mencit normal. Data yang diukur adalah *delta cycle threshold* ( $\Delta C_t$ ) dari ekspresi gen caspase 3 dan atg-6 yang dianalisis menggunakan uji Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ), dan secara deskriptif menggunakan Livak untuk melihat berapa kali kenaikan suatu ekspresi gen jika dibandingkan kontrolnya.

Hasil: terdapat perbedaan bermakna kadar ekspresi gen caspase 3 antara kelompok kontrol(-) 10,51 *cycles* dengan kelompok perlakuan 11,11 *cycles* ( $p = 0,009$ ), sehingga ekspresi gen caspase 3 lebih tinggi 1,54x pada kelompok kontrol(-). Hal ini tidak terdapat pada kadar ekspresi gen atg-6, yaitu pada kelompok kontrol(-) 8,82 *cycles* dengan kelompok perlakuan 9,49 *cycles* ( $p = 0,347$ ), sehingga ekspresi gen atg-6 lebih tinggi 1,16x pada kelompok kontrol(-).

Simpulan: Pemberian ekstrak biji anggur 280mg/kgBB 1x/hari selama 10 minggu tidak meningkatkan ekspresi gen caspase 3, melainkan menurunkan secara bermakna, sedangkan pada ekspresi gen atg-6 tidak menurunkan secara bermakna. Ditemukan juga peningkatan ekspresi gen caspase 3 dan atg-6 pada inflamasi-displasia awal yang disebabkan induksi AOM-DSS. Hal ini menguatkan bahwa ekstrak biji anggur berefek sebagai anti inflamasi.

**Kata kunci:** AOM-DSS, atg-6/beclin-1, caspase 3, ekstrak biji anggur, kanker kolon

***EFFECT of GRAPE SEED EXTRACT (*Vitis vinifera*)  
ADMINISTRATION to CASPASE 3 AND ATG 6 GENE  
EXPRESSION on mRNA LEVEL of MICE's COLON  
INDUCED with AZOXYMETHANE (AOM) AND  
DEXTRAN SODIUM SULPHATE (DSS)***

**Wilma Angela  
NPM. 130120110082**

***ABSTRACT***

*Objective: This study is aimed to analyze the effect of grape seed extract (GSE) to caspase 3 and atg-6 gene expressions on the colon mRNA of mice induced with Azoxymethane (AOM)-Dextran Sodium Sulphate (DSS).*

*Methods: Colon mRNA from previous animal experimental study with comparative laboratory method, using 15 mice which were divided into 3 groups; group I (negative control) mice were induced with AOM-DSS and given CMC solvent, group II (treatment) mice were induced with AOM-DSS and administered with 280mg/kg body weight GSE (1x/day), group III was normal mice. Group I and II were treated for 10 weeks. Data were measured by delta cycle threshold ( $\Delta$ Ct) of caspase 3 and atg-6 gene expression, which analyzed statistically using Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ) and descriptively with Livak method that was compare to increment in gene expression between treatment and control groups.*

*Results: We found statistically significant difference of caspase 3 gene expression between negative control group (11.11 cycles) and treatment group (10.51 cycles) ( $p = 0.009$ ), which means the caspase 3 gene expression was 1.54x higher in negative control group. This results were not found statistically significant in atg-6 gene; (8.82 cycles) in negative control group and (9.49 cycles) in treatment group ( $p = 0.347$ ), which means atg-6 gene expression was 1.16x higher in negative control group.*

*Conclusions: Administration of 280mg/kg body weight GSE once a day for 10 weeks didn't increase caspase 3 gene expression, otherwise significantly decrease it, while in atg 6 gene expression insignificant decrease were found. Increase in caspase 3 and atg-6 in inflammation-early dysplasia caused by AOM-DSS induction were also found. This confirm that grape seed extract might have anti-inflammatory effect.*

**Key word:** AOM-DSS, atg-6/beclin-1, caspase 3, colon cancer, grape seed extract

## PENDAHULUAN

Kanker kolon merupakan kanker ke 2 terbanyak pada wanita dan ke 3 terbanyak pada pria di seluruh dunia, dengan insidensi 1,6 juta kasus baru dan 50.830 kematian di tahun 2013, terutama di negara Amerika, Australia, dan New Zealand. Sedangkan di negara Asia, WHO (2012) mengatakan insidensi meningkat 2-4x lipat pada Cina, Jepang, Korea Selatan dan Singapura.<sup>1, 2</sup> Di Indonesia sendiri tahun 2011, kanker kolon menduduki peringkat ke 2 penyebab kematian non infeksi setelah penyakit kardiovaskular dan sebagai keganasan saluran cerna ke 2 terbanyak setelah hepatoselular<sup>3</sup>, yang mengalami peningkatan dibandingkan tahun sebelumnya dengan usia relatif muda dibandingkan negara lainnya.<sup>2, 4</sup>

Peningkatan insidensi kanker kolon di negara Asia terutama di Indonesia diakibatkan adaptasi *Western pattern diet* yang kaya lemak dan rendah serat<sup>5</sup>. Beberapa studi epidemiologi menunjukkan bahwa konsumsi makanan tinggi serat dan senyawa fitokimia dapat menurunkan risiko terjadinya kanker kolon.<sup>6</sup> Salah satu senyawa fitokimia yang bersifat antioksidan adalah *oligomeric proanthocyanidin complexes* (OPC) dan *oligomer proanthocyanodolic* (PCOs) yang paling banyak terdapat pada biji anggur.<sup>7</sup> Selain PCOs, biji anggur juga mengandung senyawa fitokimia resveratrol, quercetin, epigallocatechin (EGC) serta beberapa senyawa polifenol lainnya yang berpotensi sebagai antioksidan, anti inflamasi dan antikanker di *cell line* dan berbagai model hewan coba secara in vitro dan in vivo dengan mekanisme multi target.<sup>3, 8-10</sup>

Epitel usus pada dasarnya memiliki turnover sel yang tinggi dimana proliferasi, diferensiasi dan kematian sel diatur secara ketat melalui beberapa jalur sinyal molekular dengan tujuan homeostasis.<sup>11</sup> Terganggunya homeostasis tersebut menyebabkan terjadinya inflamasi hingga abnormalitas proliferasi sel epitel yang dapat berkembang menjadi kanker, dimana melibatkan jalur kematian sel, salah satunya adalah apoptosis dan autofagi. Apoptosis ditandai dengan hadirnya caspase 3 sebagai penanda dari caspase efektor, yang diaktifkan melalui mekanisme kematian ekstrinsik dan intrinsik dan digunakan sebagai penanda

keberhasilan suatu terapi anti kanker.<sup>12</sup> Sedangkan peristiwa autofagi yang dapat berlanjut menjadi kematian autofagi dapat digunakan sebagai penanda alternatif kematian sel melalui proses autofagi pada suatu terapi anti kanker. Hal ini ditandai adanya pembentukan autofagosom, dimana atg-6 merupakan komponen awalnya.<sup>13, 14</sup>

Pada penelitian ini digunakan kolon mencit yang diinduksi *Azoxymethane* (AOM) dan *Dextran Sodium Sulphate* (DSS) dikarenakan zat genotoksik AOM merupakan suatu agen yang dapat menghasilkan *Abberant Crypt Foci* (ACF)<sup>8</sup> dan zat nongenotoksik DSS dapat menyebabkan kolitis, sehingga kombinasi kedua zat tersebut dapat menghasilkan keadaan prekanker-kanker kolon.<sup>15</sup> Penelitian yang melihat pengaruh biji anggur dengan menggunakan kombinasi ekspresi gen apoptosis maupun autofagi belum pernah dilakukan, terutama pada mRNA kolon mencit yang telah diinduksi zat karsinogenik seperti AOM dan DSS. Oleh karena itu, dilakukan penelitian ini untuk mengetahui bagaimana pengaruh ekstrak biji anggur (EBA) terhadap ekspresi gen caspase 3 dan atg-6 pada kolon mencit yang sebelumnya telah diinduksi AOM dan DSS.

## **METODE**

### **Objek penelitian**

Objek penelitian yang digunakan berasal dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Erlangga (2013) (*unpublished data*) pada hewan coba mencit betina *inbreeding* Balb/C galur Wistar (*Mus musculus*), yaitu berupa bahan baku tersimpan (BBT) jaringan kolon mencit yang telah diisolasi mRNA nya.

### **Rancangan Penelitian**

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental laboratorium yang bersifat komparatif dan menggunakan seluruh sampel.

## Metode penelitian

Metode penelitian menggunakan semua sampel yang ada yaitu sebanyak 15 sampel yang masing-masing terdiri dari 5 sampel yang terdiri dari 3 kelompok, yaitu:

- Kelompok I merupakan kontrol negatif yaitu mRNA kolon mencit yang diberikan pelarut CMC dan diinduksi *Azoxymethane* (AOM) dan *Dextran Sodium Sulphate* (DSS).
- Kelompok II merupakan kelompok perlakuan yaitu mRNA kolon mencit yang diberikan ekstrak biji anggur (EBA) dan diinduksi AOM dan DSS.
- Kelompok III merupakan kelompok pembanding yaitu mRNA kolon mencit normal yang hanya diberikan pakan secara *ad libitum*.

## Definisi Operasional

- EBA adalah Ekstrak biji anggur
- AOM adalah *Azoxymethane*, merupakan alkilating agent yang mempengaruhi DNA sehingga dapat menginisiasi kanker. Konsentrasi dosis yang digunakan adalah 200 uL (10mg/kgBB mencit).
- DSS adalah *Dextran Sodium Sulphate*, merupakan zat inflamasi yang memicu terjadinya kolitis kronis pada hewan golongan rodensia sehingga dapat berkembang menjadi kanker kolon. Konsentrasi dosis yang digunakan adalah 2% (5ml larutan per mencit).
- Ekspresi gen caspase 3 merupakan hasil pemeriksaan kadar mRNA caspase 3 dengan menggunakan metode *Reverse Transcription-PCR*. mRNA caspase 3 sendiri merupakan hasil transkripsi gen caspase 3 yang diekstraksi dengan menggunakan kit ekstraksi mRNA dari 1stBase<sup>®</sup> yang memiliki keuntungan rentang linear hasilnya tinggi, lebih sensitif sehingga kandungan RNA yang terdapat di spesimen menjadi lebih akurat.

Urutan basa primer caspase 3 <sup>16</sup>:

- *Forward*: 5'- TGG GCC TGA AAT ACC AAG TC-3'
- *Reverse*: 5'- AAA TGA CCC CTT CAT CAC CA-3'

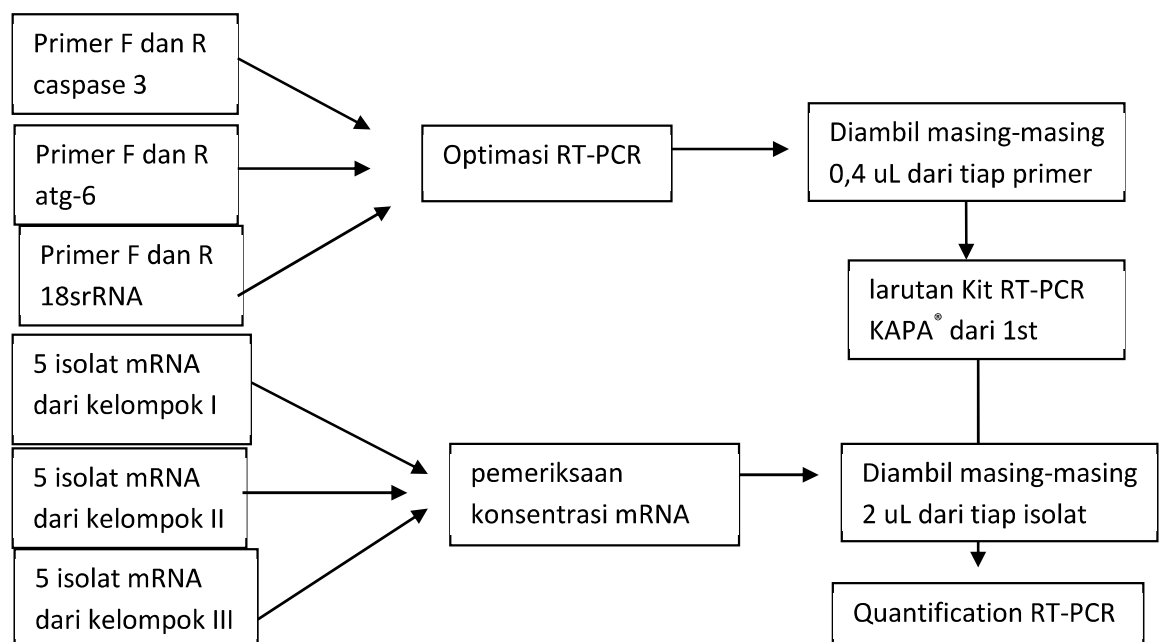
- Ekspresi gen atg-6 merupakan hasil pemeriksaan kadar mRNA atg-6 dengan menggunakan metode *Reverse Transcription-PCR*. mRNA atg-6 sendiri merupakan hasil transkripsi gen atg-6 yang diekstraksi dengan menggunakan kit ekstraksi mRNA dari 1stBase<sup>®</sup> yang memiliki keuntungan rentang linear hasilnya tinggi, lebih sensitif sehingga kandungan RNA yang terdapat di spesimen menjadi lebih akurat.

Urutan basa primer atg-6 dengan urutan basa sebagai berikut <sup>17</sup>:

- *Forward* : 5'-GGC CAA TAA GAT GGG TCT GA-3'
- *Reverse* : 5'-GCT TTT GTC CAC TGC TCC TC-3'.

### Alur penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan yang dilakukan oleh Erlangga (2013) (*unpublished data*) dan telah mendapatkan persetujuan etik untuk hewan coba pada tanggal 3 Oktober 2013 dengan No surat : 365/UN6.C2.1.2/KEPK/PN/201 dan persetujuan etik BBT juga telah mendapat persetujuan etik pada tanggal 4 November 2013 dengan No surat : 413/UN6.C2.1.2/KEPK/PN/2013.



Gambar 3.1 Alur penelitian BBT

Hasil data yang didapatkan akan dianalisis menggunakan 2 cara yaitu: Metode Livak<sup>18</sup> (kuantitatif RT-PCR) dan dengan program SPSS V.17.0 melalui uji Mann-Whitney yang memiliki tingkat signifikansi hasil data yang diuji  $p=0,05$ .

## HASIL

### Analisis Ekspresi gen Caspase 3

Analisis ekspresi gen ini menggunakan perhitungan delta Ct yang merupakan selisih gen caspase 3 dengan gen kontrol 18srRNA pada tiap sampelnya,

Tabel 4.1. *Delta Cycle Threshold ( $\Delta$ Ct)* gen Caspase 3 pada ketiga kelompok

<b>I. Kontrol – (pelarut CMC) : kel I</b>		<b>II. Perlakuan (EBA) : kel II</b>		<b>III. Pembanding (tidak diinduksi) : kel III</b>	
1	10,44	6	11,66	K1	14,38
2	10,51	7	10,67	K2	14,34
3	10,41	8	11,11	K3	17,14
4	10,64	9	11,43	K4	16,49
5	10,55	10	11,06	K5	16,21

Dari hasil penelitian yang disajikan dari tabel 4.1, didapatkan bahwa ekspresi gen caspase 3 paling tinggi terdapat pada kelompok I yang diikuti kelompok II kemudian kelompok III dimana proses apoptosis terjadi paling banyak pada yang diinduksi AOM-DSS lalu mengalami penurunan setelah diberikan ekstrak biji anggur dan proses apoptosis paling rendah terdapat pada mRNA kolon mencit yang normal, sehingga dapat diasumsikan bahwa induksi AOM-DSS dimungkinkan berhasil tetapi hanya pada tahap inflamasi saja dan pengaruh EBA yaitu menurunkan proses inflamasi tersebut sehingga apoptosis menurun dan pada mRNA mencit normal memiliki tingkat apoptosis yang rendah dikarenakan proses homeostasis masih terjaga.

Tabel 4.2. Efek induksi AOM-DSS terhadap ekspresi gen Caspase 3 pada mRNA kolon mencit

<b>Induksi AOM-DSS</b>	<b>n</b>	<b>Median (min-maks)</b>	<b><i>P</i>*</b>
Diinduksi	5	10,51 (10,41 – 10,64)	0,009
Tidak Diinduksi	5	16,21 (14,34 – 17,14)	

\*uji *Mann-Whitney*

Pada tabel 4.2 didapatkan bahwa ekspresi gen caspase 3 pada kelompok I lebih tinggi jika dibandingkan kelompok III dan peningkatan ekspresi gen caspase 3 ini terjadi secara signifikan [ $\text{Sig}(p) < 0,05$  ( $P = 0,009$ )]. Fakta ini menunjukkan bahwa induksi AOM-DSS dimungkinkan berhasil tetapi fase yang terjadi baru sampai tahap inflamasi.

Tabel 4.3. Efektivitas EBA terhadap ekspresi gen Caspase 3 pada mRNA kolon mencit yang diinduksi AOM-DSS

<b>Pemberian EBA</b>	<b>n</b>	<b>Median (min-maks)</b>	<b><i>P</i>*</b>
Tidak diberikan	5	10,51 (10,41 – 10,64)	0,009
Diberikan	5	11,11 (10,67 – 11,66)	

\*uji *Mann-Whitney*

Pada tabel 4.3 didapatkan bahwa ekspresi gen caspase 3 pada kelompok II lebih rendah jika dibandingkan kelompok I dan penurunan ekspresi gen caspase 3 terjadi secara signifikan [ $\text{Sig}(p) < 0,05$  ( $P = 0,009$ )]. Fakta ini menunjukkan ekstrak biji anggur memiliki pengaruh menurunkan proses inflamasi yang disebabkan induksi AOM-DSS melalui penurunan proses apoptosis yang dijelaskan lebih lanjut pada pembahasan.

### Analisis Ekspresi gen Atg-6

Analisis ekspresi gen atg-6 ini juga menggunakan perhitungan delta Ct yang merupakan selisih gen atg-6 dengan gen kontrol 18srRNA pada tiap sampelnya.



Tabel 4.4. *Delta Cycle Treshold* ( $\Delta Ct$ ) gen Atg6 pada ketiga kelompok

<b>I. Kontrol – (pelarut CMC) : kel I</b>		<b>II. Perlakuan (EBA) : kel II</b>		<b>III. Pembanding (tidak diinduksi) : kel III</b>	
1	8,79	6	10,1	K1	13,18
2	8,82	7	9,63	K2	12,81
3	9,67	8	9,49	K3	15,84
4	9,92	9	9,16	K4	15,28
5	8,74	10	9,36	K5	15,17

Dari hasil penelitian yang disajikan dari tabel 4.4, didapatkan bahwa ekspresi gen atg-6 bernilai hampir sama/tidak terdapat perbedaan pada kelompok I dan kelompok II yang kemudian diikuti kelompok III yang dapat diasumsikan bahwa induksi berhasil walaupun pada tahap inflamasi dan ekstrak biji anggur sendiri tidak berpengaruh pada proses autofagi/kematian autofagi yang akan dijelaskan lebih lanjut pada pembahasan.

Tabel 4.5. Efek induksi AOM-DSS terhadap ekspresi gen Atg-6 pada mRNA kolon mencit

<b>Induksi AOM-DSS</b>	<b>n</b>	<b>Median (min-maks)</b>	<b><i>P</i>*</b>
Diinduksi	5	8,82 (8,74 – 9,92)	0,009
Tidak Diinduksi	5	15,17 (12,81 – 15,84)	

\*uji *Mann-Whitney*

Pada tabel 4.5 dicantumkan bahwa ekspresi gen atg-6 pada kelompok I lebih tinggi jika dibandingkan kelompok III dan peningkatan ekspresi gen atg-6 ini terjadi secara signifikan [ $\text{Sig}(p) < 0,05$  ( $P = 0,009$ )]. Fakta ini menunjukkan bahwa induksi AOM-DSS dimungkinkan berhasil pada tahap inflamasi yang dijelaskan lebih lanjut pada pembahasan.

Tabel 4.6. Efektivitas EBA terhadap ekspresi gen Atg-6 pada mRNA kolon mencit yang diinduksi AOM-DSS

Pemberian EBA	n	Median (min-maks)	<i>P</i> *
Tidak diberikan	5	8,82 (8,74 – 9,92)	0,347
Diberikan	5	9,49 (9,16 – 10,1)	

\*uji *Mann-Whitney*

Pada tabel 4.6 didapatkan bahwa ekspresi gen atg-6 pada kelompok II lebih rendah jika dibandingkan kelompok I walaupun penurunan ekspresi gen atg-6 ini memiliki nilai signifikansi yang kurang bermakna ( $P=0,347$ ). Fakta ini menunjukkan bahwa terjadi penurunan autofagi/kematian autofagi yang kurang bermakna secara statistik pada kelompok yang diberikan EBA jika dibandingkan yang tidak diberikan EBA yang menandakan bahwa ekstrak biji anggur memiliki pengaruh yang minimal/mungkin tidak berpengaruh terhadap induksi AOM-DSS dikarenakan banyak faktor.

### Kuantifikasi Ekspresi gen Caspase 3

Selain menggunakan penilaian secara statistik yaitu dengan uji Mann Whitney, ekspresi gen caspase 3 juga dihitung berdasarkan metode kuantifikasi Livak untuk menentukan berapa kali lipat nilai suatu ekspresi gen pada jaringan yang diuji jika dibandingkan dengan kontrol-nya yang menggunakan *housekeeping gene* (18srRNA) sehingga metode Livak ini dapat menggambarkan perbedaan antar kelompok secara deskriptif.

Tabel 4.7. Efek AOM-DSS terhadap  $\Delta C_t$  Caspase 3 pada mRNA kolon mencit

	Median $CT_{casp3}$	Median $CT_{18srRNA}$	$D_{casp3}$
induksi AOM-DSS	19,2	8,76	10,44
tidak diinduksi AOM-DSS	20,43	4,47	15,96

Berdasarkan tabel 4.7. dilakukan perhitungan metode Livak yang membandingkan ekspresi gen caspase 3 pada kelompok yang diinduksi AOM-DSS (kelompok I) dengan yang tidak diinduksi AOM-DSS (kelompok III)

1.  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct kelompok I} - \Delta\text{Ct kelompok III} = (10,44-15,96) = -5,52$
2. Ekspresi ratio =  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = 2^{-(-5,52)} = 45,886\text{x}$ , yang artinya ekspresi gen caspase 3 pada kelompok I lebih tinggi 45,886x dari kelompok III

Hasil dari perhitungan secara Livak diatas menguatkan hasil dari uji statistik bahwa ekspresi gen caspase 3 yang mewakili proses apoptosis lebih tinggi pada kelompok yang diinduksi AOM-DSS yang dimungkinkan induksi AOM-DSS berhasil pada tahap inflamasi.

Tabel 4.8. Efektivitas EBA terhadap  $\Delta\text{Ct}$  Caspase 3 pada mRNA kolon mencit yang diinduksi AOM-DSS

	<b>Median CTcasp3</b>	<b>Median CT18srRNA</b>	<b>Dcasp3</b>
tidak diberikan EBA	19,2	8,76	10,44
diberikan EBA	20	8,94	11,06

Berdasarkan data dari tabel 4.8. dilakukan perhitungan metode Livak yang membandingkan ekspresi gen caspase 3 pada kelompok yang tidak diberikan EBA (kelompok I) dengan yang diberikan EBA (kelompok II)

1.  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct kelompok I} - \Delta\text{Ct kelompok II} = (10,44-11,06) = -0,62$
2. Ekspresi ratio =  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = 2^{-(-0,62)} = 1,5368\text{x}$ , yang artinya ekspresi gen caspase 3 pada kelompok I lebih tinggi 1,5368x dari kelompok II

Hasil dari perhitungan secara Livak diatas menguatkan hasil dari uji statistik bahwa ekspresi gen caspase 3 yang mewakili proses apoptosis lebih tinggi pada kelompok yang tidak diberikan ekstrak biji anggur (EBA) yang berarti EBA berpengaruh pada proses apoptosis yang terjadi pada tahap inflamasi.

### Kuantifikasi Ekspresi gen Atg-6

Perhitungan dengan metode kuantifikasi livak juga untuk melihat kenaikan dari ekspresi gen atg-6 jika dibandingkan kontrol-nya.

Tabel 4.9. Efek AOM-DSS terhadap  $\Delta\text{Ct}$  Atg-6 pada mRNA kolon mencit

	<b>Median CTAtg-6</b>	<b>Median CT18srRNA</b>	<b>Datg-6</b>
induksi AOM-DSS	17,9	8,76	9,14
tidak diinduksi AOM-DSS	19,39	4,47	14,92

Berdasarkan data dari tabel 4.9 dilakukan perhitungan metode Livak yang membandingkan ekspresi gen atg-6 pada kelompok yang diinduksi AOM-DSS (kelompok I) dengan yang tidak diinduksi AOM-DSS (kelompok III).

1.  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}$  kelompok I -  $\Delta\text{Ct}$  kelompok III =  $(9,14-14,92) = -5,78$
2. Ekspresi ratio =  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = 2^{-(-5,78)} = 54,948\text{x}$ , yang artinya ekspresi gen atg-6 pada kelompok I lebih tinggi 54,948x dari kelompok III

Hasil dari perhitungan secara Livak diatas menguatkan hasil dari uji statistik bahwa ekspresi gen atg-6 yang mewakili proses autofagi/kematian autofagi lebih tinggi pada kelompok yang diinduksi AOM-DSS yang dimungkinkan induksi AOM-DSS berhasil pada tahap inflamasi

Tabel 4.10. Efektivitas EBA terhadap  $\Delta\text{Ct}$  Atg-6 pada mRNA kolon mencit yang diinduksi AOM-DSS

	<b>Median CTAtg-6</b>	<b>Median CT18srRNA</b>	<b>Datg-6</b>
tidak diberikan EBA	17,9	8,76	9,14
diberikan EBA	18,3	8,94	9,36

Berdasarkan data dari tabel 4.10. dilakukan perhitungan metode Livak yang membandingkan ekspresi gen atg-6 pada kelompok yang tidak diberikan EBA (kelompok I) dengan yang diberikan EBA (kelompok II).

1.  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}$  kelompok I -  $\Delta\text{Ct}$  kelompok II =  $(9,14-9,36) = -0,22$
2. Ekspresi ratio =  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = 2^{-(-0,22)} = 1,1647$ , yang artinya ekspresi gen atg-6 pada kelompok I lebih tinggi 1,1647x dari kelompok II

Hasil dari perhitungan secara Livak diatas menunjukkan bahwa ekspresi gen atg-6 yang mewakili proses autofagi/kematian autofagi lebih tinggi pada kelompok yang tidak diberikan ekstrak biji anggur (EBA) walaupun secara

statistik kurang bermakna, dan secara Livak pun peningkatan hanya 1,1x sehingga dapat dimungkinkan bahwa pengaruh EBA pada proses autofagi/kematian autofagi pada tahap inflamasi yang disebabkan induksi AOM-DSS hanya terjadi minimal saja.

## **PEMBAHASAN**

### **Ekspresi gen caspase 3 dan atg-6 terkait induksi AOM dan DSS**

Terdapat beberapa kemungkinan dari peningkatan apoptosis maupun autofagi pada jaringan yang diinduksi AOM-DSS, yaitu AOM-DSS sendiri menyebabkan terganggunya homeostasis dari suatu sel dimana pada pemberian AOM akan terjadi peningkatan NFkB<sup>19</sup> yang secara langsung akan meningkatkan modulasi dari autofagi<sup>20</sup>. Sedangkan DSS menginduksi proses inflamasi yang mengaktifkan sitokin sebagai pro-inflamasi. Proses inflamasi ini akan dihambat oleh autofagi<sup>21</sup>, oleh karena itu jika inflamasi meningkat, autofagi juga akan meningkat untuk menghambat proses inflamasi tersebut. Inflamasi yang terjadi ini juga dapat mengaktifkan apoptosis untuk meng-apoptosis netrofil (peradangan akut) maupun limfosit (peradangan kronis)<sup>22</sup>, dimana sitokin secara langsung menimbulkan sinyal kematian melalui mitokondria (apoptosis intrinsik)<sup>23</sup> yang pada akhirnya akan mengaktifasi caspase 3 sebagai caspase efektor, kemudian terdapat sejumlah contoh bahwa antioksidan enzim maupun kimia dapat menghambat apoptosis<sup>24</sup>.

Peningkatan autofagi dimungkinkan sebagai pertanda awal adanya suatu inflamasi maupun respon tubuh terhadap inflamasi tersebut. Sedangkan jika inflamasi yang terjadi semakin bertambah parah, maka kematian sel tidak dapat dihindari, terlepas proses kematian tersebut berupa kematian autofagi maupun apoptosis untuk mengeliminasi sel-sel rusak yang tidak dapat diperbaiki lagi, tanpa menimbulkan reaksi pada host yang akan membatasi kerusakan jaringan di sekitarnya<sup>22</sup>. Selain menyebabkan inflamasi dan kerusakan jaringan, homeostasis yang terganggu oleh pemberian AOM-DSS ini secara langsung menghasilkan ROS, dimana ROS juga dihasilkan oleh netrofil dan makrofag<sup>22</sup> dikarenakan

pemberian DSS<sup>25, 26</sup> sehingga kumpulan ROS tersebut menyebabkan apoptosis intrinsik maupun ekstrinsik meningkat yang pada akhirnya juga akan mengaktifkan caspase efektor yaitu caspase 3. Terdapat beberapa literatur yang mengatakan bahwa pemberian DSS pada onset kolitis akan mengurangi aktivitas proliferasi dan meningkatkan apoptosis dari sel-sel kript kolon.<sup>27</sup>

### **Ekspresi gen caspase 3 dan atg-6 terkait pemberian EBA**

Terdapatnya penurunan apoptosis dan autofagi pada kelompok yang diberikan EBA jika dibandingkan kelompok yang tidak diberikan (perlakuan). Hal ini dimungkinkan adanya inflamasi yang lebih ringan setelah diberikan EBA (Erlangga, 2013) (*unpublished*) sehingga sel mengalami perbaikan dan tidak perlu di-apoptosis maupun di-autofagi. Hal ini dikarenakan stadium awal / keadaan ringan suatu cedera sel akan bersifat reversibel jika stimulus kerusakan dihilangkan<sup>22</sup>, dalam hal ini stimulus yang diakibatkan induksi AOM-DSS. Dan pada penelitian ini dimungkinkan *injury* yang dihasilkan masih bersifat reversibel setelah diberikan EBA sehingga sel mengalami perbaikan/regenerasi. Proses regenerasi akan menghasilkan perbaikan yang lengkap dari jaringan yang telah rusak atau hilang<sup>22</sup>.

Pada inflamasi, biji anggur akan memfasilitasi perbaikan pada kolon setelah induksi dari kolitis yang berulang, yang dicantumkan oleh pengurangan rasio berat/panjang dari kolon dan dari nilai kerusakan makroskopis dan mikroskopis<sup>28</sup> dan EBA sendiri terbukti dapat mengurangi stres oksidatif yang dihasilkan ROS<sup>29</sup> maupun peradangan dari induksi AOM-DSS. Antioksidan yang terdapat pada biji anggur akan menangkap radikal bebas (ROS) yang pada penelitian lain dibuktikan bahwa biji anggur dapat mengurangi proses apoptosis pada mukosa tikus dengan meningkatkan rasio glutathione disulfide (GSSG) pada mitokondria maupun sitosol. Selain itu, biji anggur juga dapat menghambat ekspresi dari *epidermal growth factor receptor* (EGFR) pada *head and neck squamous cell carcinoma* (HNSCC) dan menargetkan faktor transkripsi dari NF-κB sehingga progresivitas dari kanker kolon tidak terbentuk<sup>30</sup>. Biji anggur disini dimungkinkan bersifat sebagai antioksidan walaupun hanya digunakan satu dosis saja. Hal ini

dikarenakan ROS maupun pro-inflamasi yang terbentuk karena induksi AOM-DSS diminimalkan sehingga proses apoptosis dan autofagi pun tidak harus meningkat sebagai upaya respon imun tubuh terhadap adanya gangguan homeostasis, selain itu dosis yang lebih tinggi dari suatu zat polifenol dapat bersifat pro-oksidan yang akan meningkatkan proses apoptosis maupun kematian autofagi jika terjadi proses keganasan karena dosis pro-oksidan ini lebih memiliki ke-spesifikan<sup>31</sup>.

Penurunan ekspresi gen caspase 3 pada kelompok yang diberikan EBA sekilas terlihat lebih kuat jika dibandingkan penurunan ekspresi gen atg-6 pada kelompok yang diberikan EBA dikarenakan penurunan caspase 3 bersifat signifikan, sedangkan penurunan atg-6 tidak signifikan walaupun dengan metode livak terjadi kenaikan ekspresi gen atg-6 sebanyak 1,16x pada kelompok yang tidak diberikan EBA. Hal ini masih belum bisa disimpulkan secara pasti karena ada banyak kemungkinan yang dapat terjadi seperti apakah karena mekanisme dari EBA sendiri sebagai antioksidan terlebih dahulu mengurangi proses apoptosis dibandingkan autofagi atau karena hanya terjadi kekurangan nutrisi yang minimal saja setelah diberikan EBA sehingga tidak perlu dilakukan proses kematian sel seperti apoptosis maupun kematian autofagi melainkan hanya terjadi autofagi yang minimal saja sehingga caspase 3 lebih menurun dibandingkan atg-6. Beberapa kemungkinan ini masih perlu penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme serta pengaruh apoptosis maupun autofagi pada saat terjadinya proses inflamasi-displasia awal (Erlangga, 2013) (*unpublished*) yang dipengaruhi oleh *dose-dependence* dari EBA.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Molly. M. Derry. Investigating The Multi-Targeted Anti-Cancer And Chemopreventive Potential of GSE in Pre-Clinical Models of Colorectal Cancer: University of Colorado; 2013.
2. Bijan Moghimi Dehkordi, Azadeh Safaee. An Overview of Colorectal Cancer Survival Rates And Prognosis in Asia. *World Journal of Gastroenterology (WJGO)*. 2012;4(4):71-75.
3. Murdani Abdullah, Aru Wisaksono Sudoyo, Ahmad R Utomo, Ahmad Fauzi, Abdul Aziz Rani. Molecular Profile of Colorectal Cancer in Indonesia: Is There Another Pathway? *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2012;5(2):71-78.
4. Aru W. Sudoyo BH, Ening Krisnuhoni, Ary H. Reksodiputro, Daldiyono Hardjodisastro, Evlina S. Sinuraya. Colorectal Cancer Among Young Native Indonesians : A Clinicopathological And Molecular Assesment on Microsatellite Instability. *Medical Journal of Indonesia (MJI)*. 2010;19:245-251.
5. Cappell MS. The Pathophysiology, Clinical Presentation, And Diagnosis of Colon Cancer And Adenomatous Polyps. *Med Clin N Am*. 2005;89:1-42
6. Sheila A Bingham NED, Robert Luben, Pietro Ferrari, Nadia Slimani, Teresa Norat, dkk. Dietary Fibre in Food And Protection Againts Colorectal Cancer in The European Prospective Investigation Into Cancer And Nutrition (EPIC): An Observational Study. *Lancet*. 2003;361:1496-1501.
7. Murray MT. PCO Sources: Grape Seed vs Pine Bark. *Wellness*; 2007.
8. Balaiya Velmurugan, Rana P. Singh, Rajesh Agarwal, Chapla Agarwal. Dietary-feeding of Grape Seed Extract Prevents Azoxymethane Induced Colonic Aberrant Crypt Foci Formation in Fischer 344 Rats. *Mol Carcinog*. 2011;49(7):641-652.
9. Simona Dinicola, Alessandra Cucina, Alessia Pasqualato, Fabrizio D' Anselmi, Sara Proietti, Elisabetta Lisi. Antiproliferative And Apoptotic Effects Triggered by Grape Seed Extract (GSE) Versus Epigallocatechin And Procyanidins on Colon Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci*. 2012;13:651-664.
10. Manjinder Kaur, Chapla Agarwal, Rajesh Agarwa. Anticancer And Cancer Chemopreventive Potential of Grape Seed Extract And Other Grape-Based Products1. *The Journal of Nutrition*. 2009;139:1806-1812.
11. Freddy Radtke, Hans Clevers, Orbicia Riccio. From Gut Homeostasis to Cancer. *Current Molecular Medicine*. 2006;6(3):275-289.
12. S Ghavami, M Hashemi, S R Ande, B Yeganeh, W Xiao, M Eshraghi. Apoptosis And Cancer: Mutations Within Caspase Genes. *J Med Genet*. 2009;46:497-510.
13. Yang Cao, Daniel J Klionsky. Physiological Functions of Atg6/Beclin 1: A Unique Autophagy-Related Protein. *Cell research*. 2007;17:839-849.
14. Francesca Aredia, Luis Miguel Guamán Ortiz, Vincenzo Giansanti, A. Ivana Scovassi. Autophagy And Cancer. *Cells*. 2012;2012(1):520-534.



15. Tanaka T. Development of an Inflammation-Associated Colorectal Cancer Model And Its Application for Research on Carcinogenesis And Chemoprevention. *International Journal of Inflammation*. 2012;1-16.
16. Zimei Zhou, Minhao Wu, Ronald P. Barrett, Sharon A. McClellan, Yunfan Zhang, Linda D. Hazlett. Role of The Fas Pathway in *Pseudomonas Aeruginosa* Keratitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2010;51(5):2537-2547.
17. Min-Jung Kim, Soo-Jung Woo, Chang-Hwan Yoon, Jae-Seong Lee, Sungkwan An, Yung-Hyun Choi, dkk. Involvement of Autophagy in Oncogenic K-Ras-Induced Malignant Cell Transformation. *J Biol Chem*. 2011;1-7.
18. Kenneth J. Livak, Thomas D. Schmittgen. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR And The 22DDCT Method. *Methods*. 2001;25:402-408.
19. Jiezhong Chen, Xu-Feng Huang. The Signal Pathway in Azoxymethane-Induced Colon Cancer And Preventive Implications. *Cancer biology & therapy*. 2009;8(14):1313-1317.
20. R Kang, HJ Zeh, MT Lotze, D Tang. The Beclin 1 Network Regulates Autophagy And Apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. 2011;18:571-580.
21. Vojo Deretic, Tatsuya Saitoh, Shizuo Akira. Autophagy in Infection, Inflammation And Immunity. *Nature Publishing Group (NPG)* (abstract). 2013;13:722-737
22. Stanley L. Robin, Vinay Kumar. *Robbins And Cotran Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010
23. Scott W. Lowe, Athena W. Lin. Apoptosis in Cancer. *CARCIN* (abstract). 2000;21(3):485-495.
24. H-U. Simon, A. Haj Yehia, F. Levi Schaffer. Role of ROS in Apoptotic Induction. *Apoptosis*. 2000;5(5):415-418
25. Hamed Laroui, Sarah A. Ingersoll, Hong Chun Liu, Mark T. Baker, Saravanan Ayyadurai, Moiz A. Charania. Dextran Sodium Sulfate (DSS) Induces Colitis in Mice by Forming Nano-Lipocomplexes with Medium-Chain-Length Fatty Acids in The Colon. *Plos one*. 2012;7(3):1-12.
26. Lisiane B. Meira, James M. Bugni, Stephanie L. Green, Chung-Wei Lee, Bo Pang, Diana Borenshtein. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *J Clin Invest*. 2008;118:2516-2525.
27. Ingrid B. Renes, Melissa Verburg, Danielle J.P.M. Van Nispen, Jan. A.J.M. Taminiau, Hans A. Buller, Jan Dekker. Epithelial proliferation, Cell Death And Gene Expression in Experimental Colitis: Alterations in Carbonic Anhydrase I, Mucin Muc2, And Trefoil Factor 3 Expression. *Int J Colorectal Dis* 2002;17(5):317-326.
28. Yan-Hong Wang X-LY, Li Wang, Ming-Xia Cui, Yong-Qing Cai, Xiao-Li Li, dkk. Effects of proanthocyanidins from grape seed on treatment of recurrent ulcerative colitis in rats. *J Physiol Pharmacol*. 2010;88:888-898.
29. Joo Yeon Jhun, Su-Jin Moon, Bo Young Yoon, Jae Kyung Byun, Eun Kyung Kim, Eun Ji Yang Grape Seed Proanthocyanidin Extract–Mediated

Regulation of STAT3 Proteins Contributes to Treg Differentiation and Attenuates Inflammation in a Murine Model of Obesity-Associated Arthritis; 2013.

30. Kequan Zhou JJR. Potential Anticancer Properties of Grape Antioxidants. Journal of Oncology. 2012;2012.
31. Estela Guardado Yordi, Enrique Molina Perez<sup>1</sup>, Maria Joao Matos, Eugenio Uriarte Villares. Antioxidant And Pro-Oxidant Effects of Polyphenolic Compounds And Structure-Activity Relationship Evidence. Nutrition, Well-Being and Health. 2012;2012:23-48.