

Efek α -Mangostin terhadap Aktivitas NF-kB, Dan Kaspase-3 Enterosit pada Bayi Tikus Model Enterokolitis Nekrotikans

*α -Mangostin Effect on NF-kB and Caspase-3 Enterocytes
Activities in Necrotizing Enterocolitis Neonatal Rat Model*

Yoke Ayukarningsih

Universitas Padjadjaran

Email Korespondensi : publikasi@pasca.unpad.ac.id / publikasi.pps@gmail.com

Abstrak

Enterokolitis nekrotikans (EKN) merupakan kejadian emergensi pada saluran cerna yang paling sering terjadi pada bayi prematur dengan morbiditas dan mortalitas tinggi. Kombinasi multifaktorial menyebabkan kerusakan integritas mukosa usus sehingga terjadi inflamasi, stres oksidatif, dan apoptosis melalui peran aktivitas tumor necrosis factor (TNF)- α , nuclear factor-kB (NF-kB), dan kaspase-3. Mangostin sebagai salah satu zat aktif kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L) mampu berperan sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Penelitian ini dilakukan untuk menguji efek mangostin terhadap NF-kB, dan kaspase-3 pada model tikus EKN. Penelitian eksperimental dengan percobaan rancangan acak lengkap dilaksanakan pada bulan Juli–September 2013 di Laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, pada model tikus EKN dengan perlakuan iskemik reperfusi, asupan enteral, dan stres dingin. Diberikan α -mangostin per oral 1 jam sebelum induksi. Bayi tikus galur Wistar berjumlah 63 ekor dibagi 4 kelompok, yaitu kontrol negatif (P0), kontrol positif (P1, induksi EKN), kelompok α -mangostin 25 mg/kg bobot badan (P2), dan 50 mg/kgBB (P3). Jaringan usus ileum dinilai pada jam ke-6, ke-24, ke-48, dan jam ke-72 untuk menentukan penurunan aktivitas NF-kB dalam inti sel enterosit dan penurunan aktivitas kaspase-3 di didalam plasma dengan pewarnaan imunohistokimia. Analisis data dilakukan dengan Uji Kruskal-Wallis, Uji Wilcoxon Mann-Whitney untuk menguji signifikansi perbedaan nilai rerata pada lebih dari dua kelompok independen. Median histoskor NF-kB pada (kelompok kontrol positif, induksi EKN) atau kelompok P1, kelompok perlakuan α -mangostin 25 mg/kg bobot badan bayi tikus, atau kelompok P2, dan kelompok perlakuan α -mangostin 50 mg/kg bobot badan bayi tikus atau kelompok P3 berbeda bermakna pada pengamatan jam ke-72 ($p=0,0009$). Median histoskor NF-kB berbeda bermakna pada pengamatan jam ke-72, antara kelompok P1 dan P2 dan antara kelompok P1 dan P3, dan tidak berbeda bermakna antara kelompok P2 dan P3 ($p=0,0027$). Median histoskor kaspase-3 antara kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan bermakna pada pengamatan jam ke-72 ($p=0,0009$). Median histoskor kaspase-3 berbeda bermakna pada pengamatan jam ke-72, antara kelompok P1 dan P2 serta antara kelompok P1 dan P3, sedangkan antara kelompok P2 dan P3 tidak berbeda bermakna ($p=0,0027$). α -mangostin ini mampu menurunkan apoptosis yang bersifat bergantung perjalanan waktu dan tidak ada perbedaan dosis α -mangostin 25 mg/kg dan 50 mg/kg bobot badan aktivitas.

Kata kunci: Enterokolitis nekrotikans, α -mangostin, NF-kB, kaspase-3

Abstract

*Necrotizing enterocolitis (NEC) is a devastating gastrointestinal emergency affecting premature infants with high morbidities and mortalities. Multifactorial combination produced intestinal mucosal injury culminating inflammation, oxidative stress and apoptosis through tumor necrosis factor (TNF)- α , nuclear factor-kB (NF-kB) and caspase-3 activities. *Garcinia mangostana* called mangosteen exhibit antioxidant and anti-inflammatory activities. This study was done to determine mangosteen effects in reducing, nuclear factor-kB (NF-kB), and caspase-3 activities in neonatal rat model of NEC. Experimental study with complete randomized design was conducted from July to September 2013 in Faculty of Veterinary Medicine, Bogor Agricultural University in Bogor, done in rat model induced with ischemic-reperfusion, enteral feeding and cold stress. The neonatal Wistar rat were gavaged with α -mangosteen 25 mg/kg bw and 50 mg/kg bw one hour before NEC induction. Intestinal tissue was assessed within 6, 24, 48 and 72 hours to determine NF-kB and caspase-3 reducing activities by immunohistochemical staining. Statistical analysis was done by using Kruskal-Wallis, and pos hoc non parametric Wilcoxon Mann-Whitney. Comparison of median NF-kB histoscore showed significant differences between treated groups at hour 72 observation. There were also significant differences in median histoscore of NF-kB between control positive group (P1) and α -mangosteen 25 mg/kg bw group (P2) and between P1 group and α -mangosteen 50 mg/kg bw (P3) group but no significant difference between P2 and P3 group at hour 72 observation. Median histoscore of caspase-3 between treated group showed significant difference at 72 hour observation. The median oomparison of caspase-3 showed significant difference at 72 hour observation between control positive (P1) group and α -mangosteen 25 mg/kg bw group (P2) and between P1 and α -mangosteen 50 mg/kg bw (P3) group but not between P2 and P3 group activities. α -mangosteen per oral showed decreased NF-kB, caspase-3 activities in enterocytes in 72 hours observation which means α -mangosteen per oral confirmed the antiapoptotic response in time dependent manner.*

Key words: Necrotizing enterocolitis, α -mangosteen, NF-kB, caspase-3 activities.

PENDAHULUAN

Enterokolitis nekrotikans (EKN) adalah penyakit inflamasi usus pada neonatus yang ditandai dengan distensi abdomen, perdarahan gastrointestinal, ulserasi mukosa, dan pneumatosis intestinalis. Enterokolitis nekrotikans merupakan kejadian emergensi pada saluran cerna yang paling sering terjadi pada bayi baru lahir dan merupakan penyebab morbiditas serta mortalitas utama pada bayi prematur. Enterokolitis nekrotikans (EKN) adalah penyakit inflamasi usus pada neonatus yang ditandai dengan distensi abdomen, perdarahan gastrointestinal, ulserasi mukosa, dan pneumatosis intestinalis. Enterokolitis nekrotikans merupakan kejadian emergensi pada saluran cerna yang paling sering terjadi pada bayi baru lahir dan merupakan penyebab morbiditas serta mortalitas utama pada bayi prematur.

Insidensi EKN di Hongkong sebanyak 28%, di Argentina 14%, di Austria 7%, dan di Jepang 1,5%. Insidensi EKN di Hongkong sebanyak 28%, di Argentina 14%, di Austria 7%, dan di Jepang 1,5%. Penanganan yang tidak adekuat dan pencegahan yang tidak efektif memerlukan tindakan bedah sebanyak 20–40% dengan angka kematian 20–50%,⁶ bahkan dapat mencapai 100% pada EKN yang berat.

Penegakan diagnosis EKN didasarkan pada gambaran klinis, laboratorium, dan radiologis. Bagian usus yang paling sering terkena pada EKN adalah ileum dan kolon proksimal. Keparahan nekrosis usus bervariasi, bergantung pada beratnya kerusakan jaringan serta lamanya gangguan vaskularisasi yang terjadi mulai dari destruksi lapisan mukosa pada stadium awal sampai nekrosis transmural seluruh usus halus dan kolon pada stadium lanjut.

Berdasarkan pengamatan epidemiologis telah banyak diteliti dan disepakati bahwa EKN merupakan penyakit yang kompleks dan bersifat multifaktorial. Patogenesis dan patofisiologis EKN sampai sekarang belum sepenuhnya diketahui. Kombinasi prematuritas, hipoksia/iskemia reperfusi atau perubahan aliran darah usus, asupan formula dan kolonisasi mikrobiota usus yang abnormal, merupakan faktor risiko mayor EKN. Hewan coba yang paling banyak digunakan sebagai model EKN adalah bayi tikus dengan mereproduksi multifaktor, waktu pengamatan selama 72–96 jam dengan luaran EKN yang sama dengan pasien EKN. Kombinasi faktor tersebut akan menyebabkan kerusakan integritas barier mukosa usus yang akan mengeluarkan mediator proinflamasi antara lain *tumor necrosis factor-α* (TNF-α), *platelet activating factor* (PAF), interleukin (IL)-6, IL-12, IL-18, lipopolisakarida (LPS), *nitric oxide* (NO), dan radikal bebas oksigen. Mediator proinflamasi dalam plasma dan jaringan diregulasi faktor transkripsi *nuclear factor kappa B* (NF-κB).

Faktor transkripsi NF-κB dapat diaktivasi pula oleh beragam stimuli antara lain LPS, senyawa oksigen reaktif (SOR), dan protein kinase C.

Tumor necrosis factor-α dapat mengaktivasi NF-κB melalui aktivasi enzim inhibitor-κB kinase (IKK).

Aktivasi enzim IKK menyebabkan disosiasi ikatan faktor transkripsi NF-κB dengan inhibitor *kappa B* (IκB) sehingga menyebabkan translokasi NF-κB ke dalam inti dan mentranskripsi gen penghasil sitokin proinflamasi.

Penelitian pada hewan coba tikus mendapatkan NF-κB tetap teraktivasi pada hari pertama dan kedua disertai dengan penurunan protein inhibitor NF-κB (IκB) pada hari kedua percobaan. Penelitian pada manusia dan hewan coba menunjukkan bahwa TNF-α berperan dalam induksi apoptosis yang mengawali proses nekrosis di enterosit. *Tumor necrosis factor-α* memfasilitasi apoptosis melalui aktivasi kaspase. Apoptosis epitel ditemukan pada spesimen reseksi usus pada penderita EKN dan dapat terjadi pada 24 jam setelah induksi EKN pada hewan coba tikus. Peningkatan apoptosis pada epitel usus terutama terjadi di daerah apikal vili usus pada hewan coba tikus. Awal peningkatan aktivitas kaspase-3 terjadi pada 6 jam pertama dan mencapai puncak pada jam ke-24 percobaan pada hewan coba tikus yang diinduksi endotoksin dan intermiten hipoksia untuk menginduksi EKN.

Berbagai penelitian yang dilakukan juga menyatakan peran radikal bebas baik oksidatif maupun nitrosatif pada patogenesis EKN. Penumpukan radikal bebas berperan meningkatkan risiko EKN. Peningkatan stres oksidatif merupakan kontributor utama pada perkembangan EKN.

Besarnya dampak yang diakibatkan oleh EKN telah mendorong beragam upaya penelitian untuk mencari pengobatan alternatif, baik untuk pencegahan atau pengobatannya.

Berbagai usaha intervensi dilakukan untuk menurunkan insidensi EKN termasuk air susu ibu (ASI), *trophic feeding*, probiotik, dan antioksidan.

Suatu penelitian pada hewan coba tikus menyatakan pemberian vitamin E sebagai antioksidan intrasel menurunkan risiko iskemia dan membantu mengatasi kerusakan peroksidase yang berhubungan dengan iskemia dan reperfusi. Pentoksifilin merupakan derivat *methylxanthine* yang berperan menurunkan produksi TNF-α melalui penurunan degranulasi dan pembentukan superoksid dismutase (SOD) yang distimulasi oleh neutrofil. *N-acetylcysteine* (NAC) merupakan prekursor asam amino yang digunakan sebagai antioksidan, sebagai pemecah radikal bebas, dan sebagai agen antiinflamasi. Penelitian pada hewan coba tikus mendapatkan pemberian glutamin enteral atau arginin dapat meningkatkan kadar SOD dan glutathione peroksidase (GPx) serta menurunkan kadar malondialdehid (MDA). Resveratrol, suatu *phytoalexin* alami menunjukkan aktivitas menekan radikal bebas dengan menghambat peroksidase lipid dan memodulasi berbagai enzim penting seperti *cyclooxygenase* (COX), *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), protein kinase C, dan yang lainnya.

Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) adalah komponen utama madu propolis berfungsi sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Terapi hiperbarik oksigen dapat menurunkan stres oksidatif dan nitrosatif, meningkatkan antioksidan endogen, serta menurunkan sel-sel inflamasi seperti sitokin.

Pemerintah Indonesia berupaya menggalakkan penelitian untuk mencari bahan obat yang berasal dari tanaman melalui program pengembangan dan pemanfaatan tanaman obat. Salah satu tanaman tropis yang telah digunakan di Asia Tenggara termasuk Indonesia sebagai obat tradisional adalah kulit buah manggis (*Garcinia mangostana*. Linn, GML). Kulit buah manggis telah lama diakui dan digunakan sebagai obat untuk infeksi kulit, luka, penyakit diare, disentri, dan gastritis kronik. Penelitian eksperimental menunjukkan ekstrak GML memiliki aktivitas antijamur, antimikobakterium, antiinflamasi, antitumor, dan sebagai antioksidan. Salah satu zat aktif yang terdapat di kulit buah manggis adalah mangostin. Mangostin telah berhasil diisolasi dari ekstrak kulit buah manggis, dengan rumus kimia *1,3,6-trihidroxy-7-methoxy-2,8-bis(3-methyl-2-butenyl-9-xanthenone)* dan sudah dipasarkan dalam bentuk komersil. Mangostin merupakan senyawa polifenol yang tergolong dalam kelas *ksanton*. Polifenol merupakan metabolit sekunder tanaman yang terlibat pada proses pigmentasi, reproduksi, dan proteksi terhadap patogen. Sampai saat ini telah dikenal >8.000 polifenol dengan struktur kimia gugus hidroksil pada cincin aromatik dengan konstituen yang berbeda. Flavonoid merupakan polifenol yang paling banyak terdapat pada tanaman dan umumnya banyak ditemukan pada kulit buah serta daun tanaman.

Gugus fenol memiliki rumus kimia C_6H_5OH dan gugus fungsional berupa gugus hidroksil yang terdapat pada salah satu atom karbon dari cincin benzen. Suatu penelitian lain pada hewan coba mencit mendapatkan dosis efektif mangostin sebagai antioksidan di hepar adalah 25 mg per oral pada hari ketiga percobaan, namun pada dosis 75 mg/kgBB dapat merusak jaringan hati. Nakatani dkk.68 melaporkan bahwa mangostin bekerja sebagai penghambat aktivitas enzim *inhibitor- κ B kinase* (IKK) yang diujikan pada sel glioma tikus. Dikemukakan pula bahwa senyawa fenol dapat berperan sebagai suatu *oxidising agent*. Senyawa fenol pada konsentrasi relatif rendah berfungsi sebagai antioksidan, tetapi sebaliknya pada konsentrasi relatif tinggi berperan sebagai prooksidan yang mudah mengalami oksidasi dan membentuk senyawa oksigen reaktif (SOR).

Senyawa mangostin tersebut mengandung gugus hidroksil yang berperan untuk menangkap radikal bebas dan bersifat sebagai antioksidan. Mangostin juga menghambat aktivitas enzim *inhibitor- κ B kinase* (IKK) yang diujikan pada sel glioma tikus dengan IC_{50} 10 μ M selama paparan 18 jam.

Sampai saat ini, peran mangostin khususnya α -mangostin per oral sebagai bahan obat yang bersifat sebagai antioksidan dan antiinflamasi dalam dosis dan waktu yang berbeda dalam proses menekan atau melindungi EKN belum pernah diteliti, terutama terhadap penurunan aktivasi faktor transkripsi NF- κ B, TNF-, dan pengurangan aktivitas kaspase-3 sehingga diharapkan dapat dipakai sebagai pencegahan EKN. Peneliti bermaksud untuk melakukan penelitian melalui hewan coba bayi tikus galur Wistar yang diberikan mangostin dosis 25 mg/kg bobot badan dan 50 mg/kgbobot badan secara oral yang diinduksi iskemik reperfusi dan asupan formula dengan parameter berupa NF- κ B dan kaspase-3.

METODE

Objek penelitian ini adalah Objek penelitian ini adalah tikus neonatus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar dari famili *Muridae* yang diperoleh dari Laboratorium Hewan IPB dengan kriteria inklusi bayi tikus yang berasal dari induk tikus galur Wistar, baru lahir sampai 21 hari), bobot badan rerata 10 gram, dan kondisi sehat. Jumlah sampel dihitung dengan menggunakan rumus Federer. Terdapat 4 kelompok perlakuan dan kelompok pengamatan yang terdiri atas 4 sub-kelompok pengamatan. Berdasarkan salah satu dari tiga prinsip 3R yaitu *reduction* (pengurangan), maka jumlah total sampel pada penelitian ini adalah 63 ekor bayi tikus.

Teknik pengambilan sampel tiap kelompok perlakuan dan kelompok pengamatan dilakukan dengan rancangan acak lengkap (RAL) dengan menggunakan tabel bilangan acak Gomez.

Perhitungan dosis α -mangostin yang digunakan adalah 25 dan mg/kg bobot badan berdasarkan uji pada hewan coba tikus. Luas permukaan tubuh tikus dan mencit berbeda sehingga diperlukan faktor konversi yaitu: 0,14 variabel Bebas pada penelitian ini adalah α -mangostin per oral dengan dosis 25 mg/kg bobot badan dan α -mangostin per oral dengan dosis 50 mg/kg bobot badan 1 jam sebelum perlakuan variabel Tergantung pada penelitian ini adalah aktivitas NF- κ B dan aktivitas kaspase-3. Untuk variabel tergantung NF- κ B, dan kaspase-3 dilakukan dengan imunoeksresi.

Imunoeksresi adalah intensitas dan distribusi TNF- α , kaspase-3 dalam sitoplasma dan NF- κ B dalam inti dan sitoplasma. Intensitas warna dibagi menjadi 3 skor: Skor 1=Intensitas lemah (terwarna coklat muda), Skor 2=Intensitas sedang (terwarna coklat) dan Skor 3=Intensitas kuat (terwarna coklat tua sesuai kontrol positif pada kanker kolorektal).

Distribusi dinilai positif 1=(+) jika sel yang imunoreaktif $\leq 0-25\%$, positif 2 (++) jika sel yang imunoreaktif $>21-50\%$, positif (+++) jika sel yang imunoreaktif $>51-75\%$ dan positif (+++++) jika sel yang imunoreaktif $>75-100\%$. Histoskor adalah perkalian antara distribusi dan intensitas dengan rentang nilai 1-12.

Hewan percobaan dibagi dalam empat kelompok perlakuan, tiap kelompok perlakuan dibagi menjadi 4 sub-kelompok pengamatan terdiri atas 5 ekor bayi tikus. Hewan percobaan dibagi dalam 4 sub-kelompok pengamatan jam ke-6, jam ke 24, ke 48 dan jam ke 72. Perlakuan-perlakuan yang diberikan pada masing-masing kelompok perlakuan adalah sebagai berikut:

1. Kelompok P0 (kelompok normal (pembanding))
2. Kelompok P1 (dilakukan induksi EKN) iskemia (aliran CO_2 97% dan stress dingin 5 menit reperfusi dengan Oksigen 100%, masing-masing 5 menit).
3. Kelompok P3, diberikan α -mangostin 25 mg/kg bobot) per oral satu jam sebelum dilakukan induksi
4. Kelompok P4, diberikan α -mangostin 50 mg/kg bobot) per oral satu jam sebelum dilakukan induksi.

Secara acak (n=5) tikus dikorbankan pada jam ke-6, 24, 48 dan jam ke-72 setelah induksi EKN.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, induksi EKN dilakukan dengan

iskemik reperfusi, melalui pemberian CO₂, stres dingin, reoksigenasi, dan asupan formula yang menyebabkan EKN pada model hewan coba bayi tikus dengan total pengamatan selama 72 jam. Histoskor NF-κB

Perbedaan median histoskor NF-κB pada masing-masing kelompok perlakuan dan waktu pengukuran disajikan pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Histoskor NF-κB Berbagai Kelompok Perlakuan berdasarkan Waktu Pengukuran

b C-kB		Perlakuan				Nilai p*
		P0 (3)	P1 (20)	P2 (20)	P3 (20)	
Jam ke-6	Median	2	2	2	2	0,1053
	Rentang	(2-4)	(2-2)	(2-2)	(2-2)	
Jam ke-24	Median	4	4	4	4	0,3679
	Rentang	(4-4)	(2-4)	(4-4)	(4-4)	
Jam ke-48	Median	4	4	4	4	0,1797
	Rentang	(4-6)	(2-4)	(2-4)	(2-4)	
Jam ke-72	Median	4	6	4	4	0,0009*
	Rentang	(4-4)	(6-6)	(4-4)	(4-4)	

Keterangan : * = Uji nonparametrik Wilcoxon Mann-Whitney;

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian median histoskor NF-κB pada ketiga kelompok perlakuan yaitu kelompok P1, P2, dan P3 menunjukkan perbedaan bermakna pada pengamatan jam ke-72 dengan nilai p=0,0009 dan tidak berbeda bermakna pada pengamatan jam ke-6, jam ke-24, dan jam ke-48.

Histoskor Kaspase-3

Tabel 3.2 menyajikan perbedaan median histoskor kaspase-3 pada masing-masing kelompok perlakuan P1, P2, dan P3 dan waktu pengukuran.

Tabel 3.2 Histoskor Kaspase-3 Kelompok Perlakuan berdasarkan Waktu Pengukuran

Y A. 2014-3		Perlakuan				Nilai p*
		P0 (3)	P1 (20)	P2 (20)	P3 (20)	
Jam ke-6	Median	2	2	2	2	0,3679
	Rentang	(2-4)	(2-2)	(2-2)	(2-2)	
Jam ke-24	Median	4	4	4	4	1,0000
	Rentang	(4-4)	(4-4)	(4-4)	(4-4)	
Jam ke-48	Median	4	4	4	4	0,3679
	Rentang	(4-6)	(4-4)	(4-4)	(4-4)	
Jam ke-72	Median	2	6	4	4	0,0009*
	Rentang	(2-4)	(6-6)	(4-4)	(4-4)	

Keterangan : * = Uji nonparametrik Wilcoxon Mann-Whitney

Median histoskor kaspase-3 antar kelompok perlakuan (P1, P2, dan P3) menunjukkan perbedaan bermakna pada pengamatan jam ke-72 dengan nilai p=0,0009 dan tidak menunjukkan perbedaan pada pengamatan jam ke-6, jam ke-24, dan jam ke-48.

Analisis Perbedaan Median Histoskor Khusus pada Pengamatan Jam ke-72

Hasil pemeriksaan perbedaan median histoskor antara ketiga kelompok perlakuan khusus pada pengamatan jam ke-72 disajikan pada Tabel 3.3.

Data dari Tabel 3.3 tampak median histoskor NF-κB menunjukkan perbedaan bermakna pada pengamatan jam ke-72 antara kelompok P1 dan P2 serta antara kelompok P1 dan P3, sedangkan antara kelompok P2 dan kelompok P3 tidak berbeda

bermakna. Temuan yang sama didapat pada median histoskor kaspase 3 menunjukkan perbedaan

Tabel 3.3 Perbedaan Median Histoskor NF-κB, dan Kaspase-3 antara Kelompok Perlakuan (pada Pengamatan Jam ke-72)

t s d	ndingan Perlakuan	NF-κB		Kaspase-3	
		Z _{M-W}	p*	Z _{M-W}	p*
P1 dengan P2		-3,000	0,0027*	-3,000	0,0027*
P1 dengan P3		-3,000	0,0027*	-3,000	0,0027*
P2 dengan P3		0,000	1,000	0,000	1,0000

Keterangan : * = Uji nonparametrik Wilcoxon Mann-Whitney;

bermakna pada pengamatan jam ke-72 antara kelompok P1 dan P2 serta antara kelompok P1 dan P3 (p=0,0027). Tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok P2 dan kelompok P3.

Enterokolitis nekrotikans merupakan penyakit dengan morbiditas dan mortalitas tinggi pada neonatus yang ditandai dengan inflamasi, iskemia, dan nekrosis usus. Peningkatan perawatan bayi prematur yang mengalami insufisiensi pernapasan meningkatkan harapan hidup bayi tersebut, namun sebagai dampaknya terjadi peningkatan insidensi EKN. Berbagai faktor risiko diketahui berkontribusi terhadap EKN yang akan merusak integritas mukosa usus. Pada penelitian ini, induksi EKN dilakukan dengan iskemik reperfusi, melalui pemberian CO₂, stres dingin, reoksigenasi, dan asupan formula yang menyebabkan EKN pada model hewan coba bayi tikus dengan total pengamatan selama 72 jam. Sebagian besar studi eksperimental EKN menggunakan model hewan coba bayi tikus karena mudah didapat, mudah dilakukan induksi EKN dengan beragam faktor risiko, serta kelainan yang terjadi secara klinis dan perubahan histopatologis menyerupai kelainan EKN pada manusia serta terminasi hewan coba dilaksanakan setelah 72 jam sampai 96 jam proses penelitian.

Kerusakan integritas mukosa usus mengeluarkan beragam mediator inflamasi dan vasoaktif antara lain TNF-α, senyawa oksigen reaktif (SOR), senyawa *nitric oxide*, dan prostaglandin berperan dalam lajur inflamasi EKN

Tumor necrosis factor-α diregulasi oleh faktor transkripsi NF-κB, sebaliknya TNF-α secara *in vitro* dan *in vivo* dapat mengaktivasi NF-κB.

Pada EKN terjadi peningkatan mediator/sitokin proinflamasi di dalam plasma dan jaringan yang diregulasi oleh NF-κB.

Nuclear factor-kB (NF-κB) merupakan faktor transkripsi yang meregulasi respons selular terhadap beragam stresor eksogen maupun endogen. *Nuclear factor-kB* memiliki peran penting dalam pertumbuhan dan diferensiasi sel, apoptosis, serta respons adaptif terhadap perubahan keseimbangan reduksi oksidasi sel. Molekul NF-κB secara konstitutif terdapat dalam sitoplasma dalam bentuk inaktif dan terikat dengan protein inhibitor κB (IκB). Aktivasi NF-κB terjadi melalui fosforilasi dan degradasi protein inhibitor κB (IκB) melalui aksi kinase spesifik, NF-κB *inducible kinase* (NIK), IKK1 (α) dan IKK2 (β), serta komponen regulator NEMO. Degradasi IκB terjadi melalui peningkatan residu ubiquitin dan proteolisis oleh proteosom 26S.

Median histoskor NF- κ B pada kelompok perlakuan (P1, dengan induksi EKN) memperlihatkan peningkatan pada pengamatan jam ke-24 dari 2 (rentang 2–4) menjadi 6 (rentang 6–6) pada pengamatan jam ke-72 (Tabel 3.1). Hasil penelitian ini mendukung pernyataan De Plaen dkk. yang mendapatkan faktor transkripsi NF- κ B tetap teraktivasi kuat pada hari ke-1 dan ke-2 disertai penurunan bermakna inhibitor NF- κ B (Ik-B α dan Ik-B β) yang dimediasi oleh aktivitas IKK yang mengalami gangguan regulasi, sedangkan pada bayi tikus normal yang diberi asupan ASI terjadi peningkatan transien aktivasi faktor transkripsi NF- κ B saat lahir disebabkan pajanan produk bakteri dan mengalami penurunan dalam satu hari. Schultz dkk. melaporkan peningkatan keparahan EKN berkorelasi dengan peningkatan NF- κ B dan kejadian apoptosis disertai gangguan proliferasi sel epitel usus. Pemberian inhibitor aktivasi NF- κ B, NEMO-binding domain peptide dapat mengurangi inflamasi dan kematian hewan coba tikus tersebut.

Peran α -mangostin sebagai antioksidan ditentukan oleh gugus hidroksil yang ditemukan dalam jumlah banyak. Gugus tersebut mampu mengikat senyawa oksigen reaktif yang terbentuk. Keberadaan mangostin akan menghambat proses fosforilasi dan aktivasi enzim IKK, sehingga faktor transkripsi NF- κ B tetap terikat dengan protein inhibitor κ B (IkB). Hasil analisis perbedaan median histoskor NF- κ B antarkelompok perlakuan yaitu kelompok P1 (induksi EKN), kelompok P2 (α -mangostin 25 mg/kg bobot badan), dan kelompok P3 (α -mangostin 50 mg/kg bobot badan) pada pengamatan jam ke-72 menunjukkan perbedaan bermakna ($p=0,0009$). Analisis lebih lanjut dengan Uji *Pos hoc* nonparametrik Wilcoxon Mann-Whitney, median histoskor NF- κ B pada pengamatan jam ke-72 menunjukkan perbedaan antara kelompok P1 dan P2 dan antara kelompok P1 dan kelompok P3, sedangkan antara kelompok P2 dan P3 tidak berbeda bermakna (Tabel 3.3). Analisis temuan tersebut menunjukkan α -mangostin mampu menurunkan aktivasi NF- κ B pada jam ke-72 dan tidak ada perbedaan efektivitas antara dosis 25 mg/kgBB dan 50 mg/kgBB.

Respons jaringan terhadap iskemia dan reperfusi bergantung pada keparahan dan durasi iskemia, rangkaian kejadian patologis yang mengawali reperfusi, serta perbedaan ciri khas organ masing-masing. Semakin lama berlangsung iskemia reperfusi, semakin parah terjadi kerusakan mukosa.

Jejas iskemia reperfusi pada usus akan menyebabkan jejas usus lokal dan kerusakan organ hati, paru, ginjal, dan organ lainnya. Sewaktu reperfusi, oksigen yang mencapai jaringan akan menghasilkan ROS, sitokin, dan kemokin akibat molekul oksigen masuk bersama aliran darah; kalsium berlebih; terbukanya poros membran mitokondria; disfungsi sel endotel; adhesi leukosit; terbentuk fenotip protrombogenik, dan respons inflamasi.

Bayi prematur lebih rentan terkena stres oksidatif dibandingkan dengan bayi cukup bulan, hal ini berkaitan dengan struktur dan fungsi organ yang masih imatur, menimbulkan metabolisme aerob yang membutuhkan energi yang cepat sehingga meningkatkan pembentukan radikal bebas (hipoksia-iskemia, hiperoksia, infeksi). Stres oksidatif dan inflamasi mendukung gangguan pada proteksi barier saluran cerna melalui berbagai mekanisme, di

antaranya disfungsi mitokondria dan jejas oksidatif yang menimbulkan apoptosis. Penelitian *in vivo* dan *in vitro* menunjukkan mitokondria mempunyai peran yang sangat penting pada stres oksidatif akibat jejas iskemik reperfusi yang menghasilkan senyawa oksigen reaktif dan mengaktivasi jalur sinyal apoptosis kaspase dependen maupun jalur sinyal apoptosis kaspase independen.

Senyawa oksigen reaktif yang dihasilkan akibat jejas iskemik reperfusi pada traktus gastrointestinal diketahui sebagai faktor yang berperan dalam patogenesis EKN dan dapat dihambat oleh senyawa anti oksidan yang telah dilakukan oleh peneliti-peneliti terdahulu. Senyawa oksigen reaktif dapat mengaktivasi NF- κ B melalui aktivasi IKK atau secara langsung meningkatkan fosforilasi IkB (hiperfosforilasi) yang secara cepat mengalami degradasi tanpa peran inhibitor proteasome.

Peran lain senyawa oksigen reaktif adalah menginduksi apoptosis melalui disfungsi mitokondria dan mengeluarkan *cytochrome c* yang akan berikatan dengan *apoptosis protease activation factor 1* (Apaf 1). Kompleks ini akan mengaktivasi kaspase-9 yang menyebabkan aktivasi kaspase-3 sebagai aktivator kaspase menimbulkan proses apoptosis.⁴⁹ Selain itu, TNF- α melalui TNFR akan mengaktivasi TNF receptor death domain (TRADD), Fas associated death domain (FADD), dan aktivasi kaspase-9 yang menyebabkan apoptosis melalui aktivasi kaspase-3.

Usus bayi prematur lebih rentan terhadap apoptosis karena peningkatan respons apoptosis yang tidak adekuat dan imaturitas respons inflamasi yang meningkatkan kerentanan apoptosis epitel usus. *Apoptosis epitel* usus secara *in vitro* dapat diinduksi dengan jejas iskemik reperfusi, invasi bakteri, dan sitokin inflamasi seperti TNF- α dan PAF. Proses apoptosis berlangsung dalam 2 fase yaitu fase inisiasi oleh kaspase-8 dan kaspase-9 yang mengaktivasi katalisasi serta fase eksekusi oleh kaspase-3, kaspase-6, dan kaspase-7 yang mencetuskan degradasi komponen sel. Famili Bcl-2 adalah protein yang mengatur apoptosis enterosit, *Pro apoptotic Bax* dan *antiapoptotic Bcl-2* memiliki peran penting dalam mengatur apoptosis di epitel usus. Kejadian apoptosis ditunjukkan dengan peningkatan enzim kaspase antara lain kaspase 3 dan temuan *apoptotic bodies* hasil degradasi nucleoprotein.

Hasil yang dicantumkan pada Tabel 3.2 menunjukkan peningkatan median histoskor kaspase-3 pada kelompok P1 dari skor 2 (rentang 2–4) meningkat menjadi 6 (rentang 6–6) pada pengamatan jam ke-72. Jilling dkk. dan Lee dkk. menemukan peningkatan aktivitas kaspase-3 serta apoptosis luas dengan fragmentasi DNA di enterosit pada vili di apeks yang berlangsung selama 48 jam pada model hewan coba tikus yang diinduksi EKN. Pan-kaspase inhibitor (8 *boc-aspartyl (OMe)-fluoromethylketone*) dapat mengurangi insidensi apoptosis secara bermakna pada hewan coba tikus yang diinduksi EKN. Median histoskor kaspase-3 antarkelompok perlakuan yaitu kelompok P1, P2, dan P3 pada pengamatan jam ke-72 menunjukkan perbedaan bermakna ($p=0,0009$; tabel 4.3). Analisis lanjutan dengan Uji *pos hoc* nonparametrik Wilcoxon Mann-Whitney pada pengamatan jam ke-72 memperlihatkan median

histoskor kaspase-3 antara kelompok P1 dan kelompok P2 berbeda bermakna, demikian pula antara kelompok P1 dan kelompok P3, namun antara kelompok P2 dan kelompok P3 tidak berbeda bermakna (Tabel 3.3).

Apoptosis dapat terjadi melalui jalur intrinsik yang mengakibatkan disfungsi mitokondria ditandai dengan edema, hilangnya potensial membran, penurunan ATP intraselular, akumulasi SOR serta pengeluaran *cytochrome c* dan AIF tampak dalam waktu 1–2 jam, namun, α -mangostin tidak memengaruhi ekspresi protein famili bcl-2 dan aktivasi MAP kinase. Hasil penelitian tersebut mengindikasikan bahwa target aksi α -mangostin adalah mitokondria pada fase awal sehingga menghasilkan apoptosis pada *cell line* leukemia manusia.

Mangostin dapat berperan sebagai antioksidan dengan dosis relatif rendah 5 $\mu\text{g/mL}$ per dosis atau 10–20 $\mu\text{g/mL}$ per dosis dan memicu apoptosis dengan dosis 40 $\mu\text{g/mL}$ per dosis. Pada konsentrasi relatif rendah, senyawa fenol berfungsi sebagai antioksidan, namun sebaliknya pada konsentrasi relatif tinggi sebagai prooksidan yang mudah mengalami oksidasi dan membentuk SOR.

Analisis hasil penelitian dengan kaspase-3 menyimpulkan α -mangostin mampu menurunkan aktivasi kaspase-3, akan tetapi belum dapat mengungkap apakah melalui mitokondria atau melalui jalur aktivasi langsung NF- κB .

Keterbatasan Penelitian

Aplikasi sistemik α -mangostin yang dilakukan terhadap bayi hewan coba tikus model EKN melalui induksi iskemik reperfusi, stres dingin, dan asupan formula pada penelitian ini mampu mengurangi keparahan EKN melalui penurunan aktivasi parameter NF- κB dan kaspase-3. α -mangostin diberikan sebelum induksi EKN atau sebelum timbulnya manifestasi EKN, yaitu sebagai upaya preventif. Penelitian ini memiliki kelemahan tidak meneliti disfungsi mitokondria yang mengawali proses apoptosis dan inflamasi.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini didapatkan simpulan bahwa pemberian α -mangostin menurunkan aktivitas NF- κB di enterosit pada hewan coba tikus yang diinduksi menjadi EKN. Pemberian α -mangostin per oral menurunkan aktivitas kaspase-3 di dalam plasma enterosit hewan coba tikus yang diinduksi menjadi EKN. Apoptosis melalui penurunan aktifitas NF- κB dalam inti enterosit sangat bermakna pada ketiga kelompok perlakuan pada pengamatan jam ke-72. Hal yang sama didapat kan apoptosis melalui penurunan aktifitas kaspase-3 dalam plasma enterosit sangat bermakna pada ketiga kelompok perlakuan pada pengamatan jam ke-72.

Saran

Walaupun hasil penelitian ini telah menunjukkan efek α -mangostin sebagai antiapoptosis melalui penurunan aktivitas NF- κB enterosit dan penurunan kaspase 3, namun masih diperlukan penelitian lanjutan

peran α -mangostin dalam mekanisme transduksi sinyal khususnya pada reseptor yang terkait dengan apoptosis melalui jalur intrinsik mitokondria. Untuk melengkapi data ilmiah aspek farmakologik α -mangostin sehingga dapat dikembangkan menjadi herbal terstandar atau fitofarmaka perlu dilakukan rangkaian penelitian pada hewan coba antara lain meliputi uji toksisitas dan uji farmakokinetik. Pemerintah diupayakan melakukan promosi obat herbal terstandar khususnya α -mangostin.

DAFTAR PUSTAKA

- Barlow B, Santulli TV, Heird WC, Pitt J, Blanc WA, Scullinger JN. *An experimental study of acute neonatal enterocolitis—the importance of breast milk*. J Pediatr Surg. 1974;9:587–95.
- Santulli TV, Schullinger JN, Heird WC, Gongaware RD, Wigger J, Barlow B, dkk. *Acute necrotizing enterocolitis in infancy: a review of 64 cases*. Pediatrics. 1975;55:376–87.
- Neu J, Chen M, Beierle E. *Intestinal innate immunity: how does it relate to the pathogenesis of necrotizing enterocolitis*. Semin Pediatr Surg. 2005;14:137–44.
- Holman RC, Stoll BJ, Clarke MJ, Glass RI. *The epidemiology of necrotizing enterocolitis infant mortality in the United States*. Am J Public Health. 1997;87:2026–31.
- Schnabl KL, VanAerde JE, Thomson ABR, Clandinin MT. *Necrotizing enterocolitis: a multifactorial disease with no cure*. World Gastroenterol. 2008;14:2142–61.
- Neu J, Walker WA. *Necrotizing enterocolitis*. N Engl J Med. 2011;364:255–64.
- Hunter CJ, Upperman JS, Ford HR, Camerini V. *Understanding the susceptibility of the premature infant to necrotizing enterocolitis (NEC)*. Pediatr Res. 2008;63(2):117–23.
- Bell MJ, Ternberg JL, Feigin RD, Keating JP, Marshall R, Barton L. *Neonatal necrotizing enterocolitis. Therapeutic decisions based upon clinical staging*. Ann Surg. 1978;187(1):1–7.
- Martin CR, Walker WA. *Intestinal immune defences and the inflammatory response in necrotising enterocolitis*. Semin Fetal Neonatal Med. 2006;11:369–77.
- Dvorak B, Halpern MD, Holubec H, Dvorakova K, Dominguez JA, Williams CS. *Maternal milk reduces severity of necrotizing enterocolitis and increases intestinal IL-10 in a neonatal rat model*. Pediatr Res. 2003;53:426–33.
- Clark JA, Lane RH, MacLennan NK, Holubec H, Dvorakova K, Halpern MD dkk. *Epidermal growth factor reduces intestinal apoptosis in an experimental model of necrotizing enterocolitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2005;288:G755–762.
- Jilling T, Lu J, Jackson M, Caplan MS. *Intestinal epithelial apoptosis initiates gross bowel necrosis in an experimental rat model of neonatal necrotizing enterocolitis*. Pediatr Res. 2004;55:622–9.

- Schultz LMA, Bonnard A, Barreau F, Aigrain Y, Pierre-Louis C, Berrebi D, dkk.. *Expression of TLR-2, TLR-4, NOD2 and pNF-kappaB in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. PLoS One.* 2007;2(10):e1102.
- Ford Y, Watkins S, Reblock K, Rowe M. *The role of inflammatory cytokines and nitric oxide in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. J Pediatr Surg.* 1997;32:275–82.
- Ford HR. *Mechanism of nitric oxide-mediated intestinal barrier failure: insight into the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. J Pediatr Surg.* 2006;41:294–9.
- Miller MJ, McNeill H, Mullane KM, Caravella SJ, Clark DA. *SOD prevents damage and attenuates eicosanoid release in a rabbit model of necrotizing enterocolitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1988;255:G556–65.
- Clark DA, Fornabaio DM, McNeill H, Mullane KM, Caravella SJ, Miller MJ. *Contribution of oxygen derived free radicals to experimental necrotizing enterocolitis. Am J Pathol.* 1988;130:537–42.
- Mercurio F, Manning AM. *NF-kB as a primary regulator of the stress response. Oncogene.* 1999;18:6163–71.
- De Plaen IG, Liu SX, Tian R, Neequaye I, May MJ, Han XB, dkk. *Inhibition of nuclear factor-kappa B ameliorates bowel injury and prolongs survival in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. Pediatr Res.* 2007;61(6):716–21.
- Baregamian NSJ, Bailey E, Papaconstantinou J, Evers MB, Chung DH. *Tumor necrosis factor- α and apoptosis signal-regulating kinase I control reactive oxygen species release, mitochondrial autophagy and c-Jun N-terminal kinase/p38 phosphorylation during necrotizing enterocolitis. Oxidative Med Cell Long.* 2009;5:297–306.
- Lee YK, Kim EK, Kim JE, Kim YJ, Son SH, Kim HS, dkk. *Neonatal rat necrotizing enterocolitis model adopting oral endotoxin and hypoxia exhibits increased apoptosis through caspase-3 activation. J Korean Soc Neonatal.* 2010;17:44–52.
- Zhou Y, Wang Q, Evers BM, Chung DH. *Oxidative stress-induced intestinal epithelial cell apoptosis is mediated by p38 Mapk 52. Biochem Biophys Res Commun.* 2006;350:860–5.
- Lucas A, Cole TJ. *Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. Lancet.* 1990;336:1519–23.
- Henderson G, Craig S, Brocklehurst P, McGuire W. *Enteral feeding regimens and necrotizing enterocolitis in preterm infants: a multicentre case control study. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2009;94:F120–3.
- Khailova L, Mount Patrick SK, Arganbright KM, Halpern MD, Toshi Kinouchi T, Dvorak B. *Bifidobacterium bifidum reduces apoptosis in the intestinal epithelium in necrotizing enterocolitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;299:G1118–27.
- Okur H, Kucukaydin M, Kose K, Kontas O, Dogan P, Kazez A. *Hypoxia induced necrotizing enterocolitis in the immature rat: the role of lipid peroxidation and management by vitamin E. J Pediatr Surg.* 1995;30:1416–9.
- Travadi J, Patole S, Charles A, Dvorak B, Doherty D, Simmer K. *Pentoxifylline reduces the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. Pediatr Res.* 2006;60:185–9.
- Tayman C, Tonbul A, Kosus A, Hirfanoglu IM, Uysal S, Haltas H, dkk. *N-acetylcysteine may prevent severe intestinal damage in necrotizing enterocolitis. J Pediatr Surg.* 2012;47:540–50.
- Güven A, Gundogdu G, Uysal B, Cermik H, Kul M, Demirbag S, dkk. *Hyperbaric oxygen therapy reduces the severity of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. J Pediatr Surg.* 2009;44:534–40.
- Ergun O, Ergun G, Oktem G, Selvi N, Dogan H, Tuncyurek M, dkk. *Enteral resveratrol supplementation attenuates intestinal epithelial inducible nitric oxide synthase activity and mucosal damage in experimental necrotizing enterocolitis. J Pediatr Surg.* 2007;42:1687–94.
- Tayman C, Tonbul A, Kosus A, Hirfanoglu M, Haltas H, Uysal S dkk. *Protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on intestinal damage in necrotizing enterocolitis. Pediatr Surg Int.* 2011;27:1179–89.
- Kul M, Vurucu S, Demirkaya E, Tunc T, Aydinöz S, Meral C, dkk. *Enteral glutamine and/or arginine supplementation have favorable effects on oxidative stress parameter in neonatal rat intestine. J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;49(1):85–9.
- Güven A, Gundogdu G, Vurucu S, Uysal B, Öztas E, Öztürk H, dkk. *Medical ozone therapy reduces oxidative stress and intestinal damage in an experimental model of necrotizing enterocolitis in neonatal rats. J Pediatr Surg.* 2009;44:1730–5.
- Rukmana R. *Budidaya manggis.* Yogyakarta: Kanisius; 2003.
- Gopalakrishnan G, Banumathi B, Suresh G. *Evaluation of the antifungal activity of natural xanthenes from Garcinia mangostana and their synthetic derivatives. J Nat Prod.* 1997;60:519–24.
- Suksamrarn S, Suwanapoch N, Phakhodee SN, Suwanapoch, Thanuhiranlert J, Ratanukul P, dkk. *Antimycobacterial activity of prenylated xanthenes from the fruits of Garcinia mangostana. Chem Pharm Bull.* 2003;51(7):857–9.
- Nakatani K, Norimichi N, Arakawa T, Yasuda H, Ohizumi Y. *Inhibition of cyclooxygenase and prostaglandin E2 synthesis by -mangostin, a xanthone derivate in mangosteen, in C6 rat glioma cells. Biol Pharm Bull.* 2002;63(1):73–9.
- Chen LG, Yang LL, Chiung C, Wang C. *Anti-inflammatory activity of mangostins from Garcinia mangostana. Food Chem Toxicol.* 2007;1–6.
- Nakatani K, Yamakuni T, Kondo N, Arakawa T, Osawa K. *-Mangostin inhibits inhibitor- κ B kinase activity and decreases lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 gene expression in C6 rat glioma cells. Mol Pharmacol.* 2004;66:667–74.
- Nabandith V, Suzui M, Morioka T, Kaneshiro T, Kinjo T, Matsumoto K, dkk. *Inhibitory effects of crude α -mangostin, a xanthone derivative, on two different categories of colon preneoplastic lesions induced by 1, 2-dimethylhydrazine in the rat. Asian Pac J Cancer Prev.* 2004;5(4):433–438.
- Shibata MA, Iinuma M, Morimoto J, Kurose H, Akamatsu K, Okuno Y, dkk. *α -Mangostin extracted from the pericarp of the mangosteen (Garcinia mangostana Linn) reduces tumor growth and lymph node metastasis in an immunocompetent xenograft model of metastatic mammary cancer carrying a p53 mutation. BMC Med.* 2011;9(69):1–18.
- Wendra. *Efek antioksidan mangostin terhadap nekrosis hepatosit dan proliferasi sel Kupffer pada mencit (Mus musculus) galur DDY yang diinduksi CCl4.* J Eukaryotic. 2003;3(1):34–9.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. *Polyphenols: food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr.* 2004;79:727–47.
- Wahyuno S, Astuti P, Artama WT. *Characterization of a bioactive substance-mangosten isolated from the hull of Garcinia mangostana L. Majalah Farmasi Indonesia.* 1999;10(3):127–34.
- Yoshikawa M, Harada E, Miki A, Tsukamoto K, Liang SQ. *Antioxidant constituents from the fruits hulls of mangosteen (Garcinia mangostana Linn) originating from Vietnam. Yakagu Zasshi.* 1994;114(2):129–33.
- Santangelo C, Vari R, Scaccocchio B, Benedetto RD, Filesi C, Masella R. *Polyphenols, intercellular signaling and inflammation. Ann Ist Super Santa.* 2007;43(4):394–405.
- Shan T, Ma Q, Guo K, Liu J, Li W, Wang F, dkk. *Xanthenes from mangosteen extracts as natural chemopreventive agents: potential anticancer drugs. Curr Mol Med.* 2011;11(8):666–77.
- Aggarwal BB. *Tumor necrosis factors receptor associated signaling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NFkB. Am Rheum Dis.* 2000;59(suppl):i6–16.
- Sasaki M, Joh T. *Oxidative stress and ischemia-reperfusion injury in gastrointestinal tract and antioxidant, protective agents. J Clin Biochem Nutr.* 2007;40:1–12.
- Perrone S, Cornacchione S, Tei M, Stazzoni G, Bertrando S, Tataranno ML dkk. *The role of oxidative stress in the necrotizing enterocolitis of preterm. J of the Siena Academy of Science.* 2011;3:30–3.
- Lee JW, Davis JM. *Future applications of antioxidants in premature infants. Curr Opin Pediatr.* 2011;23:161–6.
- Baregamian N, Song J, Papaconstantinou J, Hawkins HK, Evers M, Chung DH. *Intestinal apoptotic signalling is activated during oxidative stress. Pediatr Surg Int.* 2011;27(8):871–7.
- Robert GD, Torrie SJ. *Principles and procedures statistics.* Edisi ke-4. New York: McGraw Hill Inc; 1995.
- Thomann P. *Ethical principles and guidelines for scientific experiments on animals.* Edisi ke-2. Swiss Academy of Medical Sciences; 1995.
- Gomez KA, Gomez AA. *Statistical procedures for Agricultural Research 2nd ed.* Singapore: John Wiley & Sons Inc.; 1995
- Laurence DR, Bacharach AL. *Evaluation of drug activities. Pharmacokinetics.* Vol 1. London: Academic Press; 1964.
- Edwards J, Mukherjee R, Munro AF, Wells AC, Almushatat A, Bartlett JM. *HER2 and COX2 expression in human prostate cancer. Eur J Cancer.* 2004 Jan;40(1):50–5.