

**PENGARUH PEMAPARAN KOMBINASI EKSTRAK
MENIRAN (*PHYLLANTHUS NIRURI LINN.*) DAN
EKSTRAK SIRIH (*PIPER BETLE LINN.*) TERHADAP
VIABILITAS SEL TUMOR *ADENOCARCINOMA*
*MAMMAE MENCIT C3H SECARA IN VITRO***

(The Effect of Exposure of Combination of Meniran Extract (Phyllanthus niruri Linn.) and Sirih Extract (Piper betle Linn.) to Viability of C3H-Mice Adenocarcinoma Mammae Cells, in vitro Study)



TESIS

**Diajukan Untuk Memenuhi Persyaratan Meraih
Derajat Sarjana S-2 Magister Ilmu Biomedik**

Oleh :

TRILAKSANA NUGROHO

NIM : G4A000011

Konsentrasi Patobiologi

**PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
PROGRAM PASCASARJANA UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG**

MEI

2003

HALAMAN PENGESAHAN

TESIS

PENGARUH PEMAPARAN KOMBINASI EKSTRAK MENIRAN (*PHYLLANTHUS NIRURI LINN.*) DAN EKSTRAK SIRIH (*PIPER BETLE LINN.*) TERHADAP VIABILITAS SEL TUMOR *ADENOCARCINOMA MAMMAE MENCIT C3H SECARA IN VITRO*

Disusun oleh:


Trilaksana Nugroho
NIM G4A000011

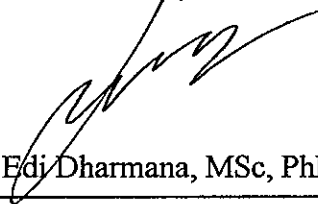
Telah dipertahankan di depan Tim Penguji
pada tanggal 14 Mei 2003
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Semarang, Mei 2003
Menyetujui,
Komisi Pembimbing

Pembimbing Utama

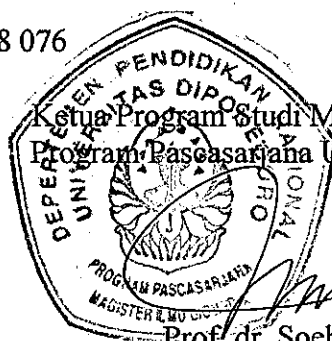
Pembimbing Kedua


Prof. Dr. dr. Tjahjono, Sp.PA, FIAC


dr. Edi Dharmana, MSc, PhD

NIP 130 368 076

NIP 130 529 451



Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Program Pascasarjana Universitas Diponegoro


Prof. dr. Soebowo, Sp.PA

NIP 130 352 549

UPT-PUSTAK-UNDIP	
No. Daft:	215/T/MIB/01
Tgl.	8 Maret 2004

HALAMAN PERNYATAAN

PERNYATAAN

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

Semarang, 1 Mei 2003

Trilaksana Nugroho

NIM G4A000011

RIWAYAT HIDUP

- Nama : dr. Trilaksana Nugroho
Tempat / Tanggal lahir : Surakarta, 27 Januari 1971
Alamat : Jl. Kelud Timur II no 2, Kelurahan Petompon,
Kecamatan Gajahmungkur, Kota Semarang
Nama Istri : dr. Hari Peni Julianti
Nama Anak : Maharani Rizka Pritadesya
Riwayat pekerjaan :
1. Dokter Pegawai Tidak Tetap di Puskesmas : 1996 – 1999
Bandongan, Kecamatan Bandongan,
Kabupaten Magelang, Provinsi Jawa Tengah
 2. Staf pengajar di Bagian Farmakologi dan : 1999 – sekarang
Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas
Diponegoro Semarang

Riwayat Pendidikan Formal :

1. SD Gergaji Semarang : 1976 – 1983
2. SMP Negeri 3 Semarang : 1983 – 1986
3. SMA Negeri 1 Semarang : 1986 – 1989
4. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro : 1989 – 1996
5. Program Magister Ilmu Biomedik Program : 2000 – 2003
Pascasarjana Universitas Diponegoro

KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan “*Alhamdulillahirrabbi 'alamiin*”, penulis memanjatkan puji dan syukur kehadiran Allah Swt. Hanya oleh karena berkah dan kemurahan dari-Nya, penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis ini sesuai dengan waktu yang ditentukan. Dengan tulisan dalam tesis ini, penulis berusaha menunjukkan rasa syukur atas nikmat-Nya karena telah diberi kesempatan untuk meneliti dasar-dasar ilmiah sebagian kecil khasiat dari tumbuhan meniran (*Phyllanthus niruri Linn.*) dan sirih (*Piper betle Linn.*) yang merupakan bahan baku alam yang telah banyak dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai obat tradisional yang murah dan mudah didapatkan di sekeliling kita. Penelitian ini juga berusaha mengemukakan suatu pemikiran baru mengenai penggunaan kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih untuk menurunkan viabilitas sel tumor, khususnya tumor *adenocarcinoma mammae*, yang merupakan “sinergisme” dari interaksi kedua ekstrak.

“Tiada gading yang tak retak”, adalah ibarat yang paling tepat untuk menggambarkan keterbatasan penulis. Sebagai manusia biasa, penulis sangat menyadari masih banyak kekurangan dalam tesis ini meskipun penulis telah berusaha semaksimal mungkin sesuai kemampuan untuk menyusun tesis ini dengan baik.

Dalam kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Rektor Universitas Diponegoro, Prof. Ir. Eko Budihardjo, MSc, Direktur Program Pascasarjana Universitas Diponegoro, Prof. Dr. dr. Suharyo Hadisaputro, Sp.PD, Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Prof. dr. Kabulrachman, Sp.KK, dan Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Diponegoro, Prof. dr. Soebowo, Sp.PA yang telah memberikan

kesempatan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan pada Program Magister Ilmu Biomedik di Universitas Diponegoro.

Ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya juga penulis sampaikan kepada:

1. Prof. Dr. dr. Tjahjono, Sp.PA, FIAC selaku pembimbing utama yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga dan pikirannya untuk membimbing dan memberikan pengarahan dengan penuh kesabaran dalam menyusun tesis ini.
2. dr. Edi Dharmana, MSc, PhD selaku pembimbing kedua yang senantiasa dengan sabar memberikan pengarahan dan memompa semangat serta dorongan untuk selalu percaya diri dalam menghadapi berbagai masalah dalam menyelesaikan tesis ini.
3. dr. Mpu Kanoko S., PhD, Sp.PA selaku Ketua Bagian Patologi Anatomik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (PA FKUI) yang telah memberikan izin kepada penulis untuk melakukan penelitian dan menggunakan fasilitas Laboratorium Patologi Eksperimental Bagian PA FKUI.
4. Prof. dr. Sudarto Pringgantomo, Dra. Puspita Eka Wuyung, MS, dan Drs. Kusmardi, MS selaku pimpinan dan staf Divisi Patologi Eksperimental Bagian PA FKUI yang telah dengan sabar mendampingi dan memberikan bimbingan dan pengarahan selama penelitian di Laboratorium Patologi Eksperimental Bagian PA FKUI.
5. dr. Tauhid Nur Azhar, Mkes sahabat baik, yang juga guru penulis, yang telah mencurahkan ide-ide cemerlang dan pengarahannya, mendampingi penelitian

dengan penuh kesabaran, serta selalu mendoakan dan memompa semangat dalam menghadapi setiap permasalahan yang timbul.

6. dr. Chodidjah, dr. Nugrahaningsih W.H, drg. Gunawan Wibisono, dan dr. Hadi, teman-teman seperjuangan penulis yang dengan gigih senantiasa bahu-membahu sejak awal penelitian sampai dengan penyusunan tesis, serta para keluarganya yang penuh pengertian merelakan banyak waktunya untuk memberikan kesempatan kepada mereka untuk bersama-sama mencurahkan pikiran dalam penelitian dan penyusunan tesis.
7. dr. M.V.C. Margawati D.H selaku Ketua Bagian berserta segenap sejawat di Bagian Farmakologi dan Terapeutik FK UNDIP, Prof. dr. I. Nasution, Sp.FK, dr. Amin Soetarto, Sp.FK, dr. Parno Widjojo, Sp.FK, dr. M. Masjhoer, MSMed, Sp.FK, dr. Budhi Surastri, dan dr. Noor Wijayahadi, Mkes serta Bapak Suharnoto dan Mbak Dyah Herminingtyas, yang telah memberikan segenap dukungan moril dan kebijaksanaan kepada penulis dalam melaksanakan tugasnya di Bagian selama menjalani studi.
8. Segenap Tim Penguji Tesis, Prof. Dr. dr. Tjahjono, Sp.PA, FIAC, dr. Edi Dharmana, MSc, PhD, dr. Parno Widjojo, Sp.FK, Dr. dr. Hertanto Wahyu Subagyo, MS, dr. Andrew Johan, MSc, dan para narasumber, dr. M. Masjhoer, MSMed, Sp.FK, dr. Indra Wijaya, Sp.PA, yang dengan sangat bijaksana senantiasa memberikan pengarahannya dan masukan-masukan demi kesempurnaan tesis ini.

9. Bapak dan Ibu serta Bapak dan Ibu mertua yang tercinta yang selalu mendoakan dan memberikan doa restu kepada penulis dengan ikhlas sehingga berhasil menyelesaikan studi tanpa halangan yang berarti.
10. Ibu anaku, dr. Hari Peni Julianti dan anaku tersayang, Maharani Rizka Pritadesya yang dengan manis dan telaten mendampingi, memberikan dorongan dan merelakan waktu berkumpul hilang selama beberapa saat untuk memberikan kesempatan kepada penulis menjalani dan menyelesaikan masa studinya.
11. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu penyelesaian studi dari awal hingga akhir.
Semoga hasil penelitian ini, sekecil apa-pun, tetap berarti untuk memperkaya khasanah informasi dasar-dasar ilmiah bahan-bahan alami Indonesia yang bermanfaat untuk kesehatan, dan dapat dikembangkan lebih lanjut melalui penelitian-penelitian, khususnya yang berkaitan dengan khasiat anti-tumor.

DAFTAR ISI

BAB		Halaman
	Halaman judul	i
	Halaman pengesahan	ii
	Halaman pernyataan	iii
	Riwayat hidup	iv
	Kata pengantar	v
	Daftar isi	ix
	Daftar tabel	xiii
	Daftar gambar	xiv
	Daftar lampiran	xv
	Abstract	xvi
1	PENDAHULUAN	1
	1.1. Latar belakang	1
	1.2. Rumusan masalah	5
	1.3. Orisinalitas penelitian	5
	1.4. Tujuan	6
	1.4.1. Tujuan umum	6
	1.4.2. Tujuan khusus	7
	1.5. Manfaat penelitian	7
2	TINJAUAN PUSTAKA	9
	2.1. Imunitas terhadap tumor	9
	2.1.1. Antigen tumor	9
	2.1.2. Antigen yang berasal dari glikolipid dan glikoprotein yang berubah	11
	2.1.3. Mekanisme efektor imunitas anti-tumor	13
	2.1.4. Mekanisme lolosnya sel tumor dari imunosurveilans	16

2.2.	Proses glikosilasi	18
2.3.	Ekspresi glikoprotein pada <i>adenocarcinoma</i>	22
2.4.	<i>Adenocarcinoma mammae</i> mencit	24
2.5.	Fungsi dan pertumbuhan subset sel T <i>helper</i> (Th)	26
2.5.1.	Subset Th1 dan subset Th2	26
2.5.2.	Faktor-faktor yang meregulasi diferensiasi sel Th	27
2.6.	Sirih (<i>Piper betle</i> Linn.)	31
2.6.1.	Ciri-ciri penyebaran dan pemanfaatan	31
2.6.2.	Kandungan dan khasiat sirih	32
2.7.	Meniran (<i>Phyllanthus nirri</i> Linn.)	35
2.7.1.	Ciri-ciri, penyebaran, dan pemanfaatan	35
2.7.2.	Kandungan dan khasiat meniran terhadap aktivitas sistem imun	36
2.8.	Interaksi <i>agent</i>	39
2.9.	Landasan teori	39
2.10.	Pemilihan kerangka konseptual	42
3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	43
3.1.	Kerangka teori	43
3.2.	Kerangka konsep	44
3.3.	Hipotesis penelitian	45
3.3.1.	Hipotesis Mayor	45
3.3.2.	Hipotesis Minor	45
4	METODE PENELITIAN	46
4.1.	Rancangan penelitian	46
4.2.	Populasi dan sampel	49
4.2.1.	Populasi	49
4.2.2.	Sampel	50
4.3.	Variabel penelitian	52
4.3.1.	Variabel bebas	52

4.3.2.	Variabel tergantung	52
4.4.	Bahan dan materi	52
4.5.	Alat / instrumen penelitian	53
4.6.	Tempat dan waktu penelitian	54
4.7.	Prosedur pengumpulan data	54
4.7.1.	Tahap penelitian	54
4.7.1.1.	Penelitian pendahuluan	54
4.7.1.1.1.	Penelitian eksplorasi pengaruh langsung pemaparan tunggal ekstrak terhadap viabilitas sel tumor dan sel mononuklear	55
4.7.1.1.2.	Penelitian eksplorasi pengaruh pemaparan tunggal ekstrak sirih atau ekstrak meniran saja terhadap viabilitas sel tumor melalui aktivitas sel efektor imun (sel mononuklear)	56
4.7.1.2.	Penelitian utama: penelitian pengaruh pemaparan kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih terhadap viabilitas sel tumor melalui aktivitas sel efektor imun (sel mononuklear)	57
4.7.2.	Definisi operasional	58
4.8.	Alur kerja	60
4.8.1.	Penelitian pendahuluan pemaparan langsung ekstrak	60
4.8.2.	Penelitian pendahuluan pemaparan tunggal ekstrak	61
4.8.3.	Penelitian utama pemaparan kombinasi ekstrak	63
4.9.	Pemeriksaan viabilitas sel tumor menggunakan metode eksklusi <i>trypan blue</i>	64
4.10.	Analisis data	66
5	HASIL PENELITIAN	67
5.1.	Penelitian pendahuluan	67
5.1.1.	Penelitian eksplorasi pengaruh langsung pemaparan tunggal ekstrak terhadap viabilitas sel tumor dan sel mononuklear	67
5.1.2.	Penelitian eksplorasi pengaruh pemaparan tunggal ekstrak sirih atau ekstrak meniran saja terhadap viabilitas	73

	sel tumor melalui aktivitas sel mononuklear	
5.2.	Penelitian utama: penelitian pengaruh pemaparan kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih terhadap viabilitas sel tumor melalui aktivitas sel mononuklear	80
6	PEMBAHASAN	85
6.1.	Penelitian pendahuluan	85
6.1.1.	Penelitian eksplorasi pengaruh langsung pemaparan tunggal ekstrak terhadap viabilitas sel tumor dan sel mononuklear	85
6.1.2.	Penelitian eksplorasi pengaruh pemaparan tunggal ekstrak sirih atau ekstrak meniran saja terhadap viabilitas sel tumor melalui aktivitas sel mononuklear	88
6.2.	Penelitian utama: penelitian pengaruh pemaparan kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih terhadap viabilitas sel tumor melalui aktivitas sel mononuklear	91
7	SIMPULAN DAN SARAN	96
7.1.	Simpulan	96
7.2.	Saran	96
8	RINGKASAN	98
	DAFTAR PUSTAKA	102
	LAMPIRAN	108

DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1.	Klasifikasi <i>Dunn</i> untuk tumor payudara mencit	25
2.	Viabilitas sel tumor (%) yang dipapari ekstrak sirih	68
3.	Viabilitas mononuklear (%) yang dipapari ekstrak meniran	70
4.	Viabilitas sel tumor (%) yang dipapari ekstrak sirih melalui aktivitas sel mononuklear	74
5.	Viabilitas sel tumor (%) yang dipapari ekstrak meniran melalui aktivitas sel mononuklear	77
6.	Viabilitas sel tumor (%) pada beberapa kelompok perlakuan pemaparan ekstrak meniran dan ekstrak sirih	81

DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1.	Modifikasi protein di retikulum endoplasma	21
2.	Perjalanan proses glikosilasi protein	21
3.	Fungsi dan pertumbuhan subset sel T <i>helper</i>	30
4.	Penghambatan glikosilasi sel tumor oleh ekstrak sirih	34
5.	Stimulasi sistem imun oleh ekstrak meniran	38
6.	Viabilitas sel tumor yang dipapari ekstrak sirih	69
7.	Viabilitas sel mononuklear yang dipapari ekstrak meniran	72
8.	Viabilitas sel tumor (%) yang dipapari ekstrak sirih melalui aktivitas sel mononuklear	76
9.	Viabilitas sel tumor (%) yang dipapari ekstrak meniran melalui aktivitas sel mononuklear	79
10.	Viabilitas sel tumor (%) pada beberapa kelompok perlakuan pemaparan ekstrak meniran dan ekstrak sirih	84

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1.	Preparasi sel tumor	108
2.	Preparasi sel mononuklear	110
3.	Preparasi ekstrak	112
4.	Gambar tumbuhan meniran (<i>Phyllanthus niruri Linn.</i>)	113
5.	Gambar tumbuhan sirih (<i>Piper betle Linn.</i>)	113
6.	Gambar serbuk ekstrak air meniran (<i>Phyllanthus niruri Linn.</i>)	114
7.	Gambar serbuk ekstrak air sirih (<i>Piper betle Linn.</i>)	114
8.	Gambar koloni sel tumor <i>adenocarcinoma mammae</i> mencit <i>C3H</i> yang <i>adherent</i> di dasar <i>flask</i> (tanpa pengecatan)	115
9.	Gambar mencit <i>C3H</i> bertumor <i>adenocarcinoma mammae</i>	116
10.	Output SPSS Sel Tumor + Sirih	117
11.	Output SPSS Sel Mononuklear + Meniran	126
12.	Output SPSS Tsi + MoK	130
13.	Output SPSS TK + MoMe	141
14.	Output SPSS Tsi + MoMe	149
15.	Surat ijin penggunaan fasilitas laboratorium di Bagian PA FKUI	153
16.	Surat keterangan ekstraksi Laboratorium Teknologi Fermentasi PPAU Bioteknologi-ITB	154

ABSTRACT

Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn.) has been used as an immunostimulant and sirih (*Piper betle* Linn.) was known to have an antiseptic effect through an inhibition of glycosylation mechanism. Based on their properties, exposure of combination of meniran extract and sirih extract to tumor cells will influence the viability of the malignant cells. The study was carried out to study the viability of tumor cells differentiation of C3H-mice adenocarcinoma mammae which was exposed to a combination of meniran extract and sirih extract through the activity of mononuclear-cells.

This laboratory-experimental studies was designed as the "post test-only control group" using cultured tumor cells. All samples were divided into nine-treatment groups consisted of three different treatment. The first group was a control-group (TK+MoK), the second group were four single-exposed treatment groups (TK+MoMe(m), TK+MoMe(sm), Tsi(m)+MoK, Tsi(sm)+MoK), and the third group were four combination-exposed treatment groups (Tsi(m)+MoMe(m), Tsi(m)+MoMe(sm), Tsi(sm)+MoMe(m), Tsi(sm)+MoMe(sm)). After 18 hours of incubation, the viability of tumor cells was counted using trypan blue exclusion-method. The difference of the viability of tumor cells among the groups was analyzed using SPSS 10.01 for Windows program.

It was shown in this study that there were significant difference on the viability of tumor cells between the single-exposed treatment groups and the control-group, the combination-exposed treatment groups and the single-exposed treatment groups, and between the combination-exposed treatment groups and the control-groups.

It can be concluded that the combination of meniran extract and sirih extract significantly decreases the viability of tumor cells.

Keywords: *meniran extract, sirih extract, viability of tumor cells*

ABSTRAK

Meniran (*Phyllanthus niruri Linn.*) dikenal sebagai tumbuhan yang berkhasiat imunostimulansia dan sirih (*Piper betle Linn.*) dikenal berkhasiat antiseptik melalui proses penghambatan glikosilasi. Berdasarkan khasiatnya, pemaparan kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih diharapkan dapat memberikan pengaruh terhadap viabilitas sel tumor. Penelitian ini berusaha membuktikan adanya perbedaan viabilitas sel tumor pada sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* yang dipapari kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih dan yang dipapari ekstrak meniran atau ekstrak sirih secara tunggal maupun yang tidak dipapari ekstrak, melalui aktivitas sel mononuklear yang berperan sebagai efektor sel imun.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan *The Post Test-Only Control Group Design* yang menggunakan sel tumor yang dikultur dalam sumuran sebagai objek penelitian. Sampel dikelompokkan menjadi 9 kelompok perlakuan yang terdiri dari 3 kelompok jenis perlakuan yaitu kelompok perlakuan kontrol (TK+MoK), kelompok perlakuan pemaparan tunggal (TK+MoMe(m), TK+MoMe(sm), Tsi(m)+MoK, Tsi(sm)+MoK), dan kelompok perlakuan pemaparan kombinasi (Tsi(m)+MoMe(m), Tsi(m)+MoMe(sm), Tsi(sm)+MoMe(m), Tsi(sm)+MoMe(sm)). Setelah diinkubasi selama 18 jam, viabilitas sel tumor dihitung menggunakan metode eksklusi *trypan blue*. Kemudian dilakukan uji beda pada ke-9 kelompok perlakuan dan antar kelompok perlakuan menggunakan program *SPSS 10.01 for Windows*.

Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna antara kelompok perlakuan pemaparan tunggal dibandingkan dengan kelompok kontrol, adanya perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna antara kelompok perlakuan pemaparan kombinasi dengan kelompok pemaparan tunggal, dan adanya perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna antara kelompok perlakuan pemaparan kombinasi dengan kelompok kontrol. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pemaparan kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih dapat menurunkan viabilitas sel tumor secara lebih bermakna.

Kata Kunci: ekstrak meniran, ekstrak sirih, viabilitas sel tumor

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Tumor ganas tumbuh dalam keadaan yang tidak terkontrol, bersifat invasiv terhadap jaringan normal, dan sering mengalami metastasis ke jaringan yang jauh dari asalnya. Secara umum, sel tumor ganas merupakan derivasi satu atau sedikit sel normal yang mengalami transformasi keganasan. Perilaku pertumbuhan yang abnormal dari tumor ganas merupakan cerminan dari ekspresi gen yang mengalami mutasi keganasan atau gangguan ekspresi gen yang normal. Selain kekacauan genetik pengaturan pembelahan, proliferasi dan kematian sel tumor, teori menurunnya respon imun inang terhadap sel tumor menjadi dasar berkembangnya penelitian-penelitian respon imun anti-tumor selanjutnya.

Secara teoritis, sel-sel yang mengalami transformasi keganasan akan diserang oleh sistem imun tubuh (imunosurveilans) sebelum sempat tumbuh menjadi tumor, atau dibunuh setelah tumbuh menjadi sel tumor. Di lain pihak, sel-sel ganas mempunyai kemampuan menekan respon imun inang terhadap sel-sel ganas tersebut, sehingga sel-sel ganas dapat bertumbuh-kembang dan bermetastasis ke organ lain. Imunosurveilans menjadi faktor yang sangat penting terhadap gagalnya pertumbuhan dan penyebaran sel-sel ganas, sehingga upaya meningkatkan respon imun terus dikembangkan dalam penanganan penyakit keganasan. Namun imunosurveilans terhadap tumor sering kali tidak efektif terutama pada individu yang mengalami imunokompromis. Di lain pihak, sel

tumor mempunyai kemampuan meloloskan diri dari pengawasan imun tubuh. Proses lolosnya sel tumor dari pengawasan sistem imun (*tumor escape*) kemungkinan dapat disebabkan oleh beberapa mekanisme, salah satunya adalah terlindungnya antigen tumor dari imunosurveilans oleh molekul *glycocalyx* seperti *sialic acid* yang mengandung mukopolisakarida yang disebut *sialomucin complex (SMC)*.^{1,2}

Adenocarcinoma mammae, suatu tumor sekretoris, mempunyai *SMC* yang bersifat *rigid* pada permukaan selnya. Sifat *rigid SMC* ini timbul sebagai akibat ekspresi berlebihan *sialic acid* dalam proses glikosilasi protein. Bangunan *rigid* ini secara efektif membentuk halangan yang menghambat fungsi komponen-komponen permukaan sel, termasuk antigen tumor yang disajikan oleh MHC kelas I sekaligus menghalangi proses pengenalan sistem imun terhadap antigen permukaan sel tumor. Hal ini menjadi salah satu alasan lolosnya sel tumor *adenocarcinoma mammae* dari imunosurveilans yang mengakibatkan cepatnya pertumbuhan dan penyebaran sel tumor jenis ini. Menurut angka statistik di Amerika tahun 1996, insidensi tumor ganas (kanker) payudara paling banyak terjadi pada wanita (31%), sedangkan menurut jenis kematian yang disebabkan oleh kanker, kanker payudara menempati urutan kedua terbanyak penyebab kematian (17%) setelah kanker paru (25%). Sedangkan di Semarang pada kurun waktu tahun 1994 sampai dengan 1998, tumor ganas payudara menempati urutan kedua terbanyak setelah tumor serviks uteri.^{1, 3, 4, 5} Fakta ini juga menunjukkan bahwa terapi tumor ganas, khususnya tumor ganas payudara, sampai saat ini masih kurang memuaskan.

Tumbuhan obat, sebagai kekayaan alam yang belum digali dan dikembangkan secara mendalam, masih sangat terbuka untuk diteliti dan dikembangkan untuk menyempurnakan pemanfaatannya sebagai bahan alami berkhasiat. Tumbuhan sirih (*Piper betle Linn.*) adalah jenis tumbuhan yang banyak tumbuh dan mudah didapatkan di daerah tropis seperti Indonesia. Pemanfaatan sirih, khususnya daun sirih, sudah sangat populer di masyarakat. Salah satu manfaat daun sirih yang telah banyak diteliti dan dikembangkan adalah sebagai antiseptik atau antibakteri. Kandungan fenol alam dalam minyak atsiri yang banyak terdapat dalam daun sirih terbukti berkhasiat antiseptik atau antibakteri. Beberapa jenis bakteri, terutama kokus seperti *Streptococcus mutans*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus alfa*, *Staphylococcus aureus*, *Pneumococcus sp.* dan *Gaseous gangrena* dapat dihambat pertumbuhannya oleh ekstrak daun sirih.⁶ Polifenol yang terkandung dalam teh hijau terbukti menghambat pertumbuhan *Streptococcus sobrinus* dengan menghambat enzim *glucosyltransferase I (GTase-I)* yang berperan dalam proses glikosilasi protein.⁷ Fenol alam lain yang terdapat dalam biji coklat juga terbukti menghambat *glucosyltransferase* pada *Streptococcus mutans MT8148R* dan *Streptococcus sobrinus 6715*.^{8,9}

Sebanyak 60% - 80% kandungan minyak atsiri daun sirih adalah terdiri dari fenilpropana (alilbrenkatekin), sehingga sangat mungkin apabila efek hambatan proses glikosilasi ekstrak daun sirih diperankan oleh fenol alam ini.¹⁰ Overekspresi dalam proses glikosilasi protein pada sel *adenocarcinoma mammae* akan menghasilkan *mucin* (musin) yang bersifat *rigid* pada permukaan sel

sehingga dapat menghambat pengenalan antigen tumor oleh sel-sel imun. Pemberian ekstrak sirih pada sel tumor diharapkan akan mengurangi overekspresi sialomusin, sehingga ekspresi sialomusin yang *rigid* dapat dikurangi. Pada akhirnya, pengenalan sel-sel imunosurveilans (sel mononuklear) terhadap antigen tumor yang terlindung selubung sialomusin menjadi lebih efektif.^{1,3}

Eliminasi sel-sel yang menyajikan antigen asing seperti sel tumor, sangat tergantung kepada sistem imun yang adekuat. Sel-sel mononuklear, seperti makrofag, limfosit T, limfosit B dan sel NK, adalah sel-sel imun yang berperan utama dalam proses pengenalan sampai dengan proses efektor (pembunuhan) sel tumor. Tumbuhan meniran (*Phyllanthus niruri Linn.*) telah diteliti efeknya terhadap fungsi dan aktivitas imun, baik imun non-spesifik maupun imun spesifik. Secara umum, fungsi dan aktivitas sistem imun, baik non-spesifik maupun spesifik, meningkat, sehingga meniran dianggap mempunyai efek imunostimulansia. Secara khusus, pengaruh ekstrak meniran akan meningkatkan sitotoksitas sel NK terhadap sel target *S49 (Mouse Lymphosarcoma)*.¹⁰

Penelitian terhadap tumbuhan yang berkhasiat obat saat ini sangat menarik untuk dikembangkan karena selain belum banyak diteliti dan dikembangkan manfaatnya secara mendalam, penelitian terhadap efek dari kombinasi dua atau lebih tumbuhan obat untuk mendapatkan efek yang sinergis juga merupakan pemikiran baru dalam meningkatkan efektivitas yang diharapkan. Meniran dan sirih menarik untuk diteliti karena kedua tumbuhan ini banyak dijumpai tumbuh di alam Indonesia, dikenalnya pemakaian kedua tanaman ini secara luas di masyarakat sebagai bahan alami berkhasiat dan telah dilakukannya penelitian-

penelitian mengenai kandungan dan efek kedua tanaman ini sehingga kombinasi keduanya diharapkan dapat menghasilkan efek menurunkan viabilitas sel tumor.

Peningkatan respon imun sel mononuklear terhadap sel tumor oleh ekstrak meniran dan terurainya halangan *rigid* sialomusin pada permukaan sel tumor oleh ekstrak sirih, diharapkan akan menjadi suatu kombinasi yang mempunyai interaksi sinergis untuk menurunkan viabilitas sel tumor melalui aktivitas sel-sel efektor imun, khususnya sel mononuklear. Penelitian ini merupakan pengembangan hasil-hasil penelitian tumbuhan meniran dan sirih sebelumnya yang akan diarahkan untuk membuktikan apakah efek imunostimulasi terhadap sel mononuklear oleh meniran dan berkurangnya ekspresi sialomusin pada permukaan sel tumor *adenocarcinoma mammae* oleh sirih dapat menurunkan viabilitas sel tumor.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah ada perbedaan viabilitas sel tumor pada sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* yang dipapari kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih apabila dibandingkan dengan yang dipapari ekstrak meniran atau ekstrak sirih secara tunggal dan yang tidak dipapari ekstrak meniran atau ekstrak sirih?

1.3. Orisinalitas Penelitian

Kebanyakan penelitian mengenai efektivitas tumbuhan meniran dan sirih berkisar pada masalah pengaruh masing-masing ekstrak pada hewan coba.

Meniran terbukti meningkatkan respon imun baik seluler maupun humoral sehingga banyak digunakan sebagai imunostimulansia sebagai ajuvan pengobatan untuk meningkatkan daya tahan tubuh, sedangkan sirih mempunyai kemampuan menghambat proses glikosilasi protein dan banyak digunakan sebagai antiseptik. Penelitian ini menawarkan suatu pemikiran baru untuk mengkombinasikan kedua ekstrak tersebut untuk menimbulkan efek anti-tumor, yaitu untuk menekan viabilitas sel tumor. Pemikiran ini timbul dari konsep pengobatan terhadap tumor, yaitu dengan meningkatkan respon imun, khususnya imunitas seluler untuk melawan sel tumor yang telah dihambat proses glikosilasi proteinnya sehingga antigen permukaan sel tumor yang terlindung kompleks sialomusin dapat terpapar secara lebih efektif. Efektifitas kombinasi kedua ekstrak diharapkan dapat memunculkan suatu formulasi baru yang cukup efektif untuk membunuh sel tumor.

1.4. Tujuan

1.4.1. Tujuan Umum

Membuktikan adanya perbedaan viabilitas sel tumor pada sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* yang dipapari kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih dibandingkan dengan yang dipapari ekstrak meniran atau ekstrak sirih secara tunggal dan yang tidak dipapari ekstrak meniran atau ekstrak sirih.

1.4.2. Tujuan Khusus

1. Membuktikan adanya perbedaan viabilitas sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* yang dipapari ekstrak sirih dibandingkan dengan sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* yang tidak dipapari ekstrak sirih.
2. Membuktikan adanya perbedaan viabilitas sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* yang dipapari ekstrak meniran dibandingkan dengan sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* yang tidak dipapari ekstrak meniran.
3. Membuktikan adanya perbedaan viabilitas sel tumor pada sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* yang dipapari kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih dibandingkan dengan sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* yang dipapari ekstrak meniran atau ekstrak sirih saja.
4. Membuktikan adanya perbedaan viabilitas sel tumor pada sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* yang dipapari kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih dibandingkan dengan sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* yang tidak dipapari ekstrak meniran atau ekstrak sirih.

1.5. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat:

1. Menunjang program pemerintah dalam upaya mengembangkan pengobatan dan obat tradisional di masa yang akan datang.
2. Mendukung dan melengkapi data ilmiah obat tradisional yang menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih dapat meningkatkan derajat kematian sel tumor *adenocarcinoma mammae*, sehingga meniran dan sirih dapat

dikembangkan lebih lanjut dalam pengelolaan keganasan, khususnya *adenocarcinoma mammae*, setidaknya sebagai terapi adjuvan.

3. Mendukung upaya untuk meningkatkan status pemakaian tanaman obat meniran dan sirih, dari bersifat empirik tradisional menjadi bersifat ilmiah terapan sebagai formula kombinasi, dalam pemanfaatannya sebagai bahan alami yang berkhasiat.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Imunitas Terhadap Tumor

2.1.1. Antigen Tumor

Meskipun berasal dari jaringan yang dikenal sebagai “diri sendiri” (*self*), tumor lebih cenderung mengekspresikan molekul yang dikenali oleh sistem imun sebagai “bukan diri sendiri” (*non-self*). Pertumbuhan tumor berasal dari akumulasi mutasi gen, disregulasi ekspresi gen yang menyebabkan produksi protein yang tidak mengalami mutasi tidak diekspresikan secara normal, dan transformasi onkogenik virus, yang produknya dapat dikenali sebagai *non-self* oleh limfosit B dan limfosit T. Hal ini disebabkan karena molekul tersebut tidak pernah diekspresikan dalam bentuk *self* sebelum pertumbuhan tumor, atau diekspresikan dalam kadar relatif rendah, sehingga tidak menimbulkan *self-tolerance*. Produk mutasi atau disregulasi gen ini dapat menyebabkan sintesis abnormal molekul-molekul non-protein, seperti karbohidrat dan lipid, sehingga dapat dikenali oleh sel B sebagai antigen tumor. Protein permukaan yang abnormal menjadi sasaran bagi efektor sistem imun lainnya seperti sel *Natural Killer* (sel NK). Antigen tersebut diekspresikan secara berbeda dengan sel normal maupun antara sel tumor.¹

Berdasarkan bentuk ekspresinya, secara umum antigen tumor dapat dikelompokkan menjadi dua jenis, yaitu *tumor-specific antigen* (TSA) dan *tumor-associated antigen* (TAA). TSA adalah antigen yang diekspresikan oleh sel tumor

dan tidak diekspresikan oleh sel normal. TSA menimbulkan respon imun karena dianggap asing oleh inang. TSA hanya diekspresikan oleh satu atau sedikit klon tumor yang mencerminkan mutasi yang khas untuk tumor itu sendiri. Sedangkan TAA adalah antigen yang diekspresikan sama seperti pada sel normal inang dan terbatas atau tidak terbatas pada jaringan asal tumor. Meskipun TAA dapat menimbulkan respon imun inang, oleh karena sifat *self-tolerance*-nya, TAA lebih cenderung untuk tidak menimbulkan respon imun inang.^{1,2}

MHC kelas I secara khusus menyajikan peptida yang berasal dari protein sitosolik pada semua sel berinti. Sel tumor mengekspresikan protein yang tidak diekspresikan oleh sel normal atau mengekspresikan bentuk mutasi dari protein normal. Protein tersebut disajikan oleh MHC kelas I pada permukaan sel tumor, dan dikenali sebagai protein asing oleh limfosit CD8-. Dalam hal ini, tumor berperan sebagai *antigen-presenting cell* (APC) yang menyajikan antigennya sendiri. Protein yang dihasilkan oleh sel tumor tersebut juga dilepaskan dari sel tumor dan ditangkap oleh APC profesional melalui proses endositosis. APC profesional akan mengolah dan menyajikan protein tersebut menjadi peptida melalui jalur MHC kelas II menuju ke permukaan sel. Peptida yang disajikan akan dikenali oleh limfosit *T helper* (Th) CD4-, dan kemudian akan memicu respon imun selanjutnya.^{1,2}

Beberapa jenis antigen tumor lain yang dapat dikenali oleh antibodi adalah antigen onkofetal dan antigen yang berasal dari glikolipid dan glikoprotein yang berubah. Antigen onkofetal, secara normal diekspresikan pada jaringan yang sedang tumbuh dan tidak diekspresikan pada jaringan dewasa. Sel tumor

mengekspresikan antigen onkofetal melalui mekanisme depresi gen yang belum diketahui secara jelas. Antigen onkofetal dapat dianggap sebagai penanda dalam diagnosis tumor. Sifat antigen onkofetal ini adalah non-antigenik pada inang karena diekspresikan sebagai protein *self* selama pertumbuhan. Ada dua antigen onkofetal yang telah banyak diketahui, yaitu *carcinoembryonic antigen (CEA)* dan *alphafetoprotein (AFP)*. Dalam keadaan normal, ekspresi *CEA* yang tinggi terbatas pada usus, pankreas, dan liver selama dua trimester pertama kehamilan, dan menurun pada mukosa kolon dewasa dan jaringan payudara menyusui. Ekspresi *CEA* yang berlebihan, ditunjukkan dengan kadar serum yang sangat tinggi, terjadi pada karsinoma kolon, pankreas, gaster, dan payudara. Kegunaan *CEA* sebagai marker diagnostik kanker, terbatas oleh kenyataan, bahwa kadar serum *CEA* dapat meningkat pada keadaan penyakit non-neoplastik, seperti kondisi inflamasi kronik usus besar atau liver. Sedangkan kadar serum *AFP* yang meningkat dapat dijumpai pada keadaan karsinoma hepatoseluler, tumor sel germinativum, atau pada keadaan rekurensi tumor-tumor tersebut setelah pengobatan. Nilai dignostik *AFP* sebagai marker tumor mempunyai keterbatasan oleh karena kadar serum *AFP* juga meningkat pada keadaan non-neoplastik, seperti sirosis hepatis. ^{1, 2, 11}

2.1.2. Antigen yang Berasal dari Glikolipid dan Glikoprotein yang Berubah

Sebagian besar tumor, baik dalam tubuh manusia maupun dalam eksperimen, menunjukkan bentuk glikolipid atau glikoprotein permukaan yang abnormal, disamping kadarnya yang tinggi. Beberapa diantara glikolipid dan

glikoprotein abnormal tersebut adalah gangliosid, antigen golongan darah, dan musin. Abnormalitas yang terjadi di sini adalah karena adanya perubahan dalam penambahan urutan molekul karbohidrat pada inti molekul protein atau lipid. Perubahan tersebut nampaknya turut berperan dalam sifat invasif dan metastatik tumor. Pada sel *adenocarcinoma mammae*, salah satu glikoprotein tersebut, yaitu musin, diekspresikan secara berlebihan. Musin adalah suatu proteoglikan dengan berat molekul tinggi yang mengandung sejumlah *O-linked carbohydrate side chains* pada inti polipeptidanya. Oleh karena strukturnya yang kompleks tersebut, musin pada sel tumor menjadi bersifat antigenik. Disregulasi ekspresi enzim yang mensintesis rantai samping karbohidrat tersebut menyebabkan musin menjadi relatif bersifat sebagai epitop tumor spesifik, baik pada rantai samping karbohidrat itu sendiri maupun pada inti polipeptidanya. Beberapa jenis musin dapat menjadi penanda diagnostik, seperti halnya *MUC1* yang diekspresikan oleh *adenocarcinoma mammae*. Tidak seperti musin lainnya, *MUC1* merupakan protein membran integral yang dalam keadaan normal diekspresikan hanya pada permukaan apikal epitel duktal payudara. Posisinya yang khas tersebut menjadikan *MUC1* relatif terasing dari sistem imun tubuh. Pada keadaan neoplastik, molekul tersebut terekspresi dalam keadaan tidak terpolarisasi serta mengandung banyak karbohidrat spesifik tumor dan epitop peptida yang baru. Epitop peptida ini dapat membangkitkan respon imun dari antibodi maupun sel limfosit T. Oleh karenanya, epitop peptida ini juga telah dikembangkan sebagai vaksin anti-tumor.^{1, 3, 11}

2.1.3. Mekanisme Efektor Imunitas Anti-tumor

Baik respon imun humoral maupun seluler terhadap antigen tumor, dapat dilihat secara *in vivo* maupun *in vitro*. Peningkatan fungsi efektor imun terhadap tumor, saat ini menjadi perhatian para ahli untuk mengembangkan terapi terhadap tumor melalui jalur yang lebih spesifik. Efektor-efektor imunitas yang berperan sebagai anti-tumor di sini adalah limfosit T, sel NK, makrofag, dan antibodi.^{1,2,11}

Sel limfosit, khususnya *Cytotoxic T Lymphocyte* (CTL), merupakan imunitas anti-tumor yang cukup efektif secara *in vivo*¹¹, maupun secara *in vitro*.¹² Fungsi pembunuhan sel tumor oleh efektor sistem imun terutama diperankan oleh CTL CD8+ dengan mekanisme yang sama dengan sitotoksik pada sel yang terinfeksi virus. Meskipun limfosit T CD4+ bukan merupakan sel sitotoksik langsung, secara tidak langsung limfosit T CD4+ berperan dalam produksi sitokin yang meningkatkan aktifitas CTL. *Tumor Necrosis Factor* (TNF) dan *Interferon Gamma* (IFN- γ) adalah beberapa di antara sitokin yang mengaktivasi CTL dengan meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I dalam menyajikan antigen dan meningkatkan sensitivitas lisis sel tumor terhadap CTL. Sel tumor juga dapat mengaktivasi limfosit T CD4 melalui presentasi antigen tumor oleh MHC kelas II APC profesional setelah melalui proses internalisasi protein dari sel tumor yang mati maupun yang difagositosis oleh APC profesional.^{1,2}

Tahap-tahap proses sitolisis sel tumor oleh CTL sama dengan sitolisis pada sel yang terinfeksi virus. Ada lima tahap sitolisis oleh CTL, yaitu:¹

1. Tahap pengenalan antigen dan pembentukan ikatan CTL dengan sel tumor.

2. Tahap aktivasi CTL. Pada tahap ini, CTL dapat diaktivasi melalui pengikatan pre-CTL CD8+ langsung terhadap sel tumor untuk kemudian teraktivasi dan diaktivasi oleh sitokin-sitokin yang sesuai yang dihasilkan oleh APC profesional dan limfosit T CD4+, atau pengikatan pre-CTL CD8+ terhadap APC yang sudah teraktivasi untuk kemudian teraktivasi dan diaktivasi oleh sitokin-sitokin yang sesuai yang dihasilkan oleh APC profesional dan pre-CTL CD8+ itu sendiri.
3. Tahap pelepasan molekul *lethal hit* oleh CTL CD8+ kepada sel tumor yang diikatnya. Molekul lethal hit ini adalah semacam granul yang dinamakan *perforin granzyme-mediated*.
4. Tahap pelepasan/*detachment* CTL dari sel tumor yang diikatnya.
5. Tahap terjadinya program kematian sel tumor akibat efek molekul *lethal hit* melalui kombinasi proses apoptosis dan lisis osmotik.

Efektor respon imun anti-tumor seluler lainnya adalah sel NK. Sel NK merupakan efektor respon imun umum maupun spesifik yang dapat diaktivasi melalui pengenalan langsung maupun melalui aktivasi dari sitokin yang diproduksi oleh limfosit T spesifik tumor. Secara *in vitro*, sel NK dapat melisis sel tumor hematopoietik yang dikultur. Kemampuan melisis sel tumor tersebut menjadi ukuran aktivitas sitotoksik sel NK. Sel NK secara *in vitro* tidak melisis sel normal oleh karena adanya reseptor inhibitor sel NK yang berikatan dengan antigen yang disajikan oleh MHC kelas I sel normal. Sebaliknya, pada sel yang terinfeksi virus atau sel tumor, reseptor inhibitor tersebut tidak berikatan dengan antigen yang dipresentasikan oleh MHC kelas II sel yang terinfeksi virus atau sel

tumor tersebut. Terjadinya *down-regulation* MHC pada sel tumor, memungkinkan sel tumor lolos dari sitolisis CTL, tapi sel sel tumor tersebut akan menjadi target yang baik untuk sel NK. Aktivitas tumorisidal sel NK dapat ditingkatkan oleh beberapa jenis sitokin, seperti IFN, TNF, *interleukin-2* (IL-2), dan *interleukin-12* (IL-12), sehingga aktivitas tumorisidal tergantung pada stimulasi aktivitas sel T dan makrofag yang memproduksi sitokin-sitokin tersebut. IL-12 dapat mengaktivasi sel NK menjadi *Lymphokine Activated Killer* (LAK) yang secara *in vitro* dapat ditunjukkan oleh kultur sel darah tepi atau limfosit yang menginfiltrasi tumor yang diberi IL-12. ^{1,2}

Makrofag berperan sebagai mediator seluler imunitas anti-tumor yang penting. Secara *in vitro*, makrofag yang teraktivasi ikut berperan dalam melisis sel tumor, tapi tidak melisis sel normal. Mekanisme *killing* sel tumornya sama dengan yang terjadi pada *killing* sel yang terinfeksi, yaitu dengan melepaskan enzim lisosomal, metabolit oksigen reaktif, dan, pada tikus, *nitric oxide* (NO). Makrofag teraktivasi juga memproduksi TNF, yaitu suatu sitokin yang mempunyai peranan penting dalam membunuh sel tumor. Makrofag maupun TNF membunuh sel tumor secara lambat, yaitu antara 24 jam sampai dengan 48 jam. Pada umumnya, tumor yang resisten terhadap TNF juga akan resisten terhadap makrofag. ¹

TNF dapat membunuh sel tumor secara langsung maupun tidak langsung. Secara langsung, TNF berikatan kuat dengan reseptor permukaan sel tumor dan kemudian mengaktivasi jalur kematian sel tumor, sebagaimana induksi kematian sel oleh ligan *Fas* yang berikatan dengan *Fas*. Setelah berikatan, TNF memacu

pelepasan radikal bebas yang bersifat sitotoksik. Sel yang normal tidak akan terbunuh oleh TNF karena sel normal dapat memproduksi enzim *superoxide dismutase* yang dapat menginaktivasi radikal bebas, sedangkan sel tumor tidak memproduksinya. Efek sitotoksik TNF secara langsung dapat berupa disrupsi protein sitoskeletal dan/atau disertai pembentukan *gap junction*. Secara tidak langsung, TNF dapat menginduksi trombosis pada pembuluh darah tumor, sehingga vaskularisasi tumor terganggu dengan sendirinya akan membunuh sel tumor.¹

Jika dibandingkan dengan sel T, antibodi kurang berperan penting dalam respon imun anti-tumor. Belum ada penjelasan yang memuaskan mengenai peran antibodi dalam respon humoral terhadap pertumbuhan dan perkembangan sel tumor. Potensi antibodi sebagai mediator respon imun yang diperantarai antibodi terhadap tumor dibuktikan secara *in vitro*, yaitu berperan dalam aktivasi komplemen atau sitotoksik seluler yang tergantung pada antibodi di mana makrofag yang mempunyai reseptor *Fc* atau sel NK memperantarai proses pembunuhan sel tumor.¹

2.1.4. Mekanisme Lolosnya Sel Tumor dari Imunosurveilans

Meskipun sel tumor ganas mengekspresikan antigen protein yang dikenal sebagai “asing” oleh sistem imun inang, dan meskipun pengawasan sistem imun (imunosurveilans) dapat membatasi progresifitas pertumbuhan tumor, tidak ada jaminan terjadinya pertumbuhan tumor ganas yang mematikan. Hal ini mungkin disebabkan oleh pertumbuhan dan penyebaran sel tumor yang sangat cepat dan

tidak terkendali serta kemampuan sel tumor meloloskan diri dari imunosurveilans. Beberapa mekanisme mungkin mendasari proses *tumor escape* tersebut. Pertama, yaitu terjadinya *down-regulation* ekspresi MHC kelas I beserta molekul ko-stimulator pada sel tumor sehingga kompleks antigen peptida dan molekul MHC kelas I tidak terbentuk. Keadaan ini biasanya terjadi pada sel tumor yang *recurrent* dan tidak terjadi pada sel tumor parental.¹³ Kedua, sel tumor yang mengekspresikan kompleks antigen peptida-MHC kelas I tidak dapat mengaktivasi CTL karena sel tumor tidak dapat mengekspresikan molekul MHC kelas II, sel Th CD4+ spesifik tumor tidak dapat langsung diaktivkan. Selain itu, kurangnya ko-stimulator, seperti B7-1 dan B7-2, pada sel tumor juga menyebabkan gagalnya aktivasi CTL. Ketiga, beberapa produk tumor bersifat immunosupresan. *Transforming growth factor-β* (TGF-β) yang diproduksi berlebihan oleh sel tumor dapat menyebabkan turunnya fungsi limfosit dan makrofag. IL-10 juga dapat menyebabkan turunnya fungsi makrofag. Keempat, terjadinya toleransi terhadap antigen tumor. Kelima, aktivitas imunitas anti-tumor dapat menyebabkan terjadinya beberapa sel tumor mutan yang tidak cukup mengekspresikan kompleks peptida-MHC imunogenik. Keenam, terjadinya modulasi antigenik, dimana ekspresi permukaan antigen tumor hilang. Proses modulasi antigenik terjadi karena adanya endositosis atau pelepasan kompleks antigen-antibodi. Ketujuh, adanya fenomena *sneaking through*, dimana sel tumor dapat terus berkembang dalam konsentrasi yang sedikit tapi terus-menerus sehingga tidak cukup menstimulasi reaksi penolakan oleh sistem imun.^{1,2}

Kedelapan, terjadinya *antigen masking*, di mana antigen permukaan sel tumor dapat tersembunyi dari pengawasan sistem imun oleh molekul *glycocalyx*, seperti *sialic acid* yang mengandung mukopolisakarida. Sel tumor, seperti *adenocarcinoma*, mengekspresikan molekul *glycocalyx* ini secara berlebihan dibandingkan dengan sel normal. Selain *glycocalyx*, sel tumor juga mengaktivasi sistem koagulasi yang menyebabkan ekspresi molekul fibrin yang berlebihan. Antigen tumor juga dapat tersembunyi dari sistem imun akibat lapisan fibrin yang berlebihan pada permukaan sel tumor. ^{1, 2, 3, 14}

2.2. Proses Glikosilasi

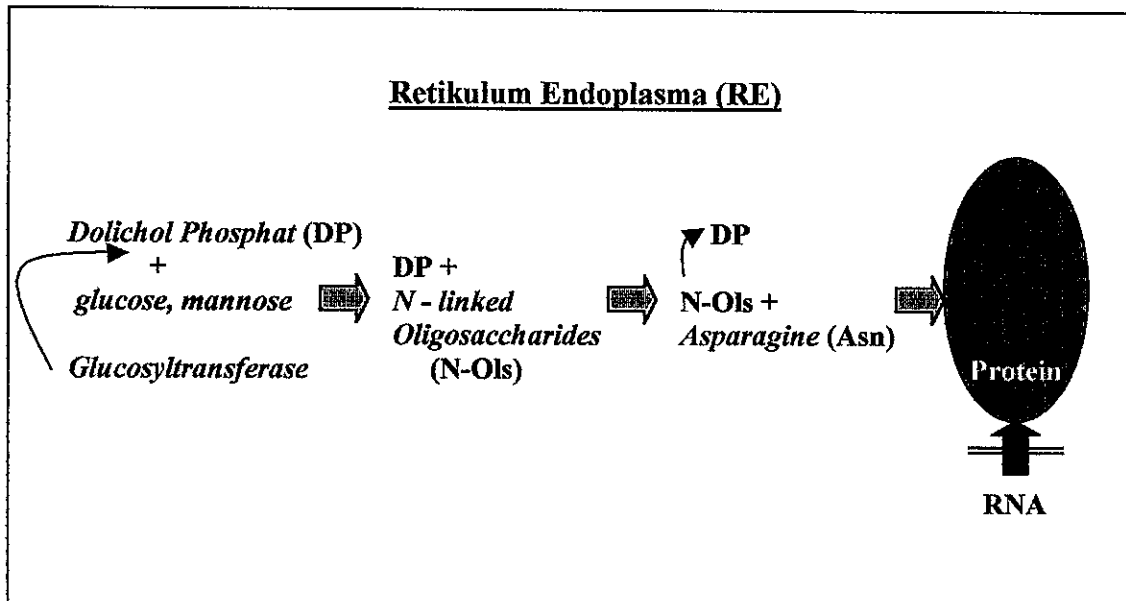
Proses glikosilasi yang terkait N (*N-linked glycosylation*) dijumpai pada hampir semua sel eukariot dan *yeast*, tetapi tidak terjadi pada sel prokariot. ³² Protein yang baru saja disintesis di mRNA akan mengalami modifikasi di dalam retikulum endoplasma (RE). Modifikasi oligosakarida yang terkait N (*N-linked oligosaccharides*) dapat menghasilkan *high mannose oligosaccharides* dan kompleks oligosakarida. *High mannose oligosaccharides* tidak mempunyai tambahan gula baru di dalam kompleks golgi. Oligosakarida yang original hanya mengandung dua *N-acetylglucosamine (GlcNAc)* dan beberapa residu *mannose* saja. Berbeda dengan kompleks oligosakarida, oligosakarida original dapat mengandung lebih dari dua *GlcNAc*, yaitu dengan adanya penambahan *galactose* dan residu *sialic acid*, dan pada beberapa kasus *fuco*se. ^{15, 16} *Sialic acid* merupakan molekul yang istimewa, oleh karena merupakan satu-satunya gula dalam glikoprotein yang mengandung muatan negatif. ¹⁶

Sesuai dengan urutan signal, protein akan mengalami pelipatan, kemudian terbentuk ikatan disulfida, dan beberapa protein akan mengalami glikosilasi. Protein yang mengalami glikosilasi, atau glikoprotein, pada umumnya terkait dengan oligosakaridanya melalui residu *asparagine* (*Asn*). *N-linked oligosaccharides* yang telah termodifikasi bermacam-macam jenisnya, akan tetapi jalur pembentukannya umumnya sama pada tahap awalnya. Pada tahap awal, 14 residu inti oligosakarida dibentuk melalui jalur tertentu, kemudian akan ditransfer oleh suatu enzim transferase dari molekul *dolichol phosphate* donor kepada residu *Asn*. Enzim transferase bekerja pada permukaan luminal RE, sehingga tidak dapat mengkatalisis protein sitosol. Setelah ditransfer, inti oligosakarida mengalami pemangkasan dan penambahan protein tertentu melalui jalur yang berbeda-beda, akan tetapi inti pentasakrida yang berasal dari 14 residu oligosakarida tetap dipertahankan. Beberapa antibiotika bekerja pada satu atau lebih tahap dalam proses penguraian glikosilasi protein ini. Salah satu contoh yang paling klasik adalah *tunicamycin* yang mempunyai struktur sebagai *Uridine Diphosphate-N-acetylglucosamine* (*UDP-GlcNAc*). *Tunicamycin* bekerja sebagai inhibitor pada tahap awal glikosilasi.¹⁶ Polifenol yang banyak terkandung dalam bahan-bahan alami seperti daun sirih dan daun teh hijau juga terbukti menghambat enzim *Glucosyltransferase* (*GT-ase*). Enzim *GT-ase* berfungsi mengkatalisis proses penambahan molekul gula pada proses modifikasi protein di retikulum endoplasma (RE).^{9, 17, 18}

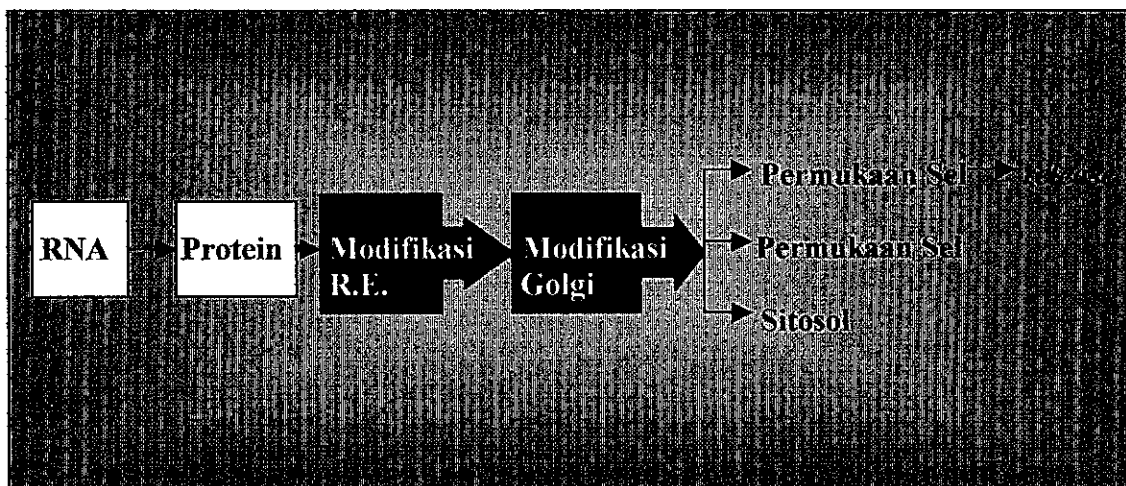
Pada tahap selanjutnya, protein yang sudah mengalami modifikasi akan dikirim ke berbagai tujuan dalam sel. Protein akan dikirimkan ke kompleks golgi

melalui vesikel transport. Di dalam kompleks golgi, *N-linked oligosaccharides* akan mengalami penambahan oligosakarida yang terkait O (*O-linked oligosaccharides*) dan akan mengalami modifikasi selanjutnya. Kemudian protein diurutkan dan dikirimkan ke tujuan akhirnya. Di dalam kompleks golgi, proses penguraian protein yang akan disekresi ke membran plasma atau dikirimkan ke lisosom akan dibedakan antar protein struktural dengan protein pembawa urutan signal yang dilepas dalam lumen RE. Keberadaan struktur tiga dimensi *hydrolase*, yaitu suatu enzim yang mengkatalisis proses transport ke lisosom, di kompleks golgi, dikenali oleh enzim *phosphotransferase* yang mengkatalisis fosforilasi residu *mannose* tertentu pada oligosakarida. Keberadaan satu atau lebih residu *mannose 6-phosphate* pada *N-linked oligosaccharides*-nya ini merupakan signal struktural yang akan mengirim protein ke lisosom.^{15, 16}

Protein reseptor pada membran kompleks golgi akan mengenali signal dari *mannose 6-phosphate* dan akan mengikat *hydrolase*. Kemudian vesikel yang membawa kompleks reseptor-*hydrolase* ini akan menuju sisi *trans* kompleks golgi dan membentuk vesikel *sorting*. Di dalam vesikel *sorting* ini, kompleks reseptor-*hydrolase* akan terurai oleh pH yang rendah dan enzim *phosphatase* mengkatalisis pelepasan kelompok fosfat dari residu *mannose 6-phosphate*. Setelah itu, reseptor akan didaur ulang menuju kompleks golgi dan vesikel transport akan membawa *hydrolase* meninggalkan vesikel *sorting* menuju lisosom.^{15, 16}



Gambar 1. Modifikasi protein di retikulum endoplasma



Gambar 2. Perjalanan proses glikosilasi protein

Proses glikosilasi berperan besar dalam membantu mengarahkan proses transport protein, oleh karena satu atau lebih *N-linked oligosaccharides* terdapat pada sebagian besar protein yang melalui RE dan kompleks golgi. Tetapi walaupun di dalam RE protein tidak mengalami pelipatan secara benar tanpa oligosakarida normalnya, protein-protein tersebut tetap dapat berfungsi secara normal tanpa proses glikosilasi.

Rantai gula dalam oligosakarida mempunyai sifat yang kurang fleksibel, bahkan pada molekul kecil *N-linked oligosaccharides*-nya, sehingga membatasi pendekatan dan *attachment* makromolekul lain terhadap permukaan glikoprotein. Oligosakarida juga menyebabkan glikoprotein relatif resisten terhadap pencernaan oleh enzim protease, sehingga dapat menjadi lapisan pelindung bagi sel eukariot. Tidak seperti rigiditas lapisan dinding sel bakteri, oligosakarida memberikan sifat yang lentur kepada sel eukariot untuk bebas bergerak dan berubah bentuk. Dengan memodifikasi rantai gulanya, oligosakarida dapat menjadi molekul protein permukaan sel, seperti *selectin*, yang berperan dalam proses adhesi antar sel.¹⁶

2.3. Ekspresi Glikoprotein pada *Adenocarcinoma*

Adenocarcinoma, atau tumor epitel sekretoris, mempunyai kompleks *sialomucin* (SMC) pada permukaan selnya. SMC merupakan kompleks sialoglikoprotein heterodimerik yang besar dan terdiri dari sub-unit *mucin sialoglycoprotein-1 ascites* dan sub-unit transmembran *sialoglycoprotein-2 ascites*.¹⁴ SMC mengandung sejumlah besar molekul hasil glikosilasi yang

menyimpang dalam membran plasmanya, dengan panjang 200 – 500 nm, yang bersifat *rigid* dan membentuk payung di superfisial seluruh komponen permukaan sel. Bangunan *rigid* ini secara efektif membentuk halangan yang cukup kuat dan dapat menghambat fungsi komponen-komponen permukaan sel termasuk antigen yang dipresentasikan oleh MHC kelas I.^{3, 19, 20} Molekul yang membentuk bangunan *rigid* tersebut adalah suatu musin yang disebut *MUC1*. *MUC1* merupakan urutan pertama dari 10 seri musin dengan urutan tandem berulang (*MUC1 – 4, MUC5a, MUC5b, MUC6 – 9*).²¹ Terdapat perbedaan ekspresi gen musin pada epitel gaster manusia yang normal, preneoplastik dan neoplastik. Epitel neoplastik menunjukkan peningkatan ekspresi mRNA *MUC1, MUC2, MUC3* dan *MUC4* dengan penurunan ekspresi mRNA *MUC5* dan *MUC6*.²² Pada *adenocarcinoma*, *MUC1* dilepaskan dari membran plasma dalam jumlah yang berlebihan. Ekspresi berlebihan ini disebabkan oleh penyimpangan proses glikosilasi glikoprotein yang terjadi akibat mutasi gen *MUC1*. Proses elongasi rantai samping karbohidrat diakhiri lebih dini dengan penambahan terminal *sialic acid* akibat meningkatnya ekspresi *sialyltransferase* dan menurunnya ekspresi *GalNac (Galactose N-acetylglucosamine) transferase*.²³

Ekspresi sialomusin yang berlebihan ini merupakan barrier yang cukup efektif terhadap serangan imun tubuh. Akhir-akhir ini diketahui bahwa lapisan tebal yang terdiri dari molekul berat musin hasil glikosilasi memegang peranan penting dalam mekanisme lolosnya sel tumor dari pengawasan imun tubuh.^{1, 3, 14} Sama halnya dengan *N-linked glycosylation* lainnya, pembentukan *SMC* dapat dihambat oleh *agent* inhibitor glikosilasi seperti *tunicamycin*. *SMC* sebenarnya

juga mengandung beberapa epitop yang dapat dikenali oleh sistem imun, akan tetapi ekspresi sialoglikoprotein, CD43 pada sel hematopoietik, yang berlebihan dan bersifat *rigid*, menghambat proses pengenalan epitop permukaan sel tumor oleh sistem imun terutama CTL (limfosit T CD8).^{15, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30} Molekul *sialic acid* yang terdapat dalam *SMC* juga berperan dalam resistensi terhadap komplemen pada *Trypanosoma cruzi* *trypomastigotes*.³¹ Penghambatan *N-linked glycosylation* oleh inhibitor glikosilasi juga dapat menyebabkan kematian langsung pada sel tumor ganas melalui mekanisme apoptosis yang diinduksi oleh turunnya jumlah reseptor *insulin-like growth factor*.^{32, 33}

2.4. *Adenocarcinoma Mammae* Mencit

Beberapa klasifikasi tumor payudara mencit pernah dibuat, antara lain klasifikasi oleh Apolant dan klasifikasi oleh Dunn. Klasifikasi histologik tumor payudara oleh Dunn mempunyai beberapa keunggulan dalam kesederhanaan dan aplikasi analisis tipe histologik pada beberapa strain *inbred*.

Penampakan kasar dari tumor payudara mencit adalah bulat-oval, atau bernodul dengan batas yang cukup tegas. Biasanya berwarna keabuan, konsistensi lunak, dan seringkali mengandung kista berisi darah dengan area sentral nekrosis. *adenocarcinoma* tipe A tersusun dari asinus kecil, atau tubulus yang dibatasi oleh lapisan tunggal atau sel epitel kuboid kecil. Jaringan mengalami diferensiasi yang baik dan menunjukkan fokus aktivitas sekretorik.

Tabel 1. Klasifikasi *Dunn* untuk tumor payudara mencit
(Diambil dari: Murphy ED. *Characteristic Tumor's*. Dalam: Eunice U (eds).
Biology of the Laboratory Mouse. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, Inc. 1966: 521)

<i>Histological type</i>		<i>Synonyms</i>
<i>Adenocarcinoma</i>	<i>Type A</i>	<i>Typical mammary tumor, mammary adenoma, mammary tumor of basic acinar structure, alveolar carcinoma, small tubular carcinoma, microtubular carcinoma</i>
	<i>Type B</i>	<i>Variable tumor, papillary cystadenocarcinoma, carcinoma simplex, intratubular carcinoma</i>
	<i>Type C</i>	<i>Fibroadenoma, adenofibroma</i>
<i>Adenoacanthoma</i>		<i>Keratinized mammary tumor, adenosquamous carcinoma, adenocarcinoid, mammary tumor with squamous metaplasia</i>
<i>Carcinosarcoma</i>		<i>Carcinoma with spindle cell formation, anaplastic carcinoma, mixed tumor</i>
<i>Sarcoma</i>		<i>Fibrosarcoma</i>
<i>Miscellaneous</i>		-

Tipe A adalah tipe tumor *adenocarcinoma mammae* yang khas pada mencit strain *C3H*. *Adenocarcinoma* tipe B menunjukkan ciri bentuk epitel glanduler, beberapa diantaranya tampak pada tumor tunggal. Area tipe A juga ditemukan pada tipe B, seperti kista yang berisi darah atau cairan bening, tonjolan papiler intrakistik, serabut dan tubulus yang ireguler, dan gambaran sel yang solid. Jumlah stromanya bervariasi. *Adenocarcinoma* tipe C terdiri dari kista multipel dengan ukuran yang bervariasi dibatasi oleh lapisan tunggal sel epitel kuboid yang dikelilingi lapisan sel spindel. Stroma jaringan penghubung biasanya tampak edematus. Tipe ini seringkali dijumpai pada tikus yang sangat tua.³⁴

2.5. Fungsi dan Pertumbuhan Subset Sel T *helper* (Th)

2.5.1. Subset Th1 dan Subset Th2

Istilah Th1 (sel *T helper* tipe 1) dan Th2 (sel *T helper* tipe 2) merujuk pada subset CD4+ $\alpha\beta$ TCR sel T sebagai sel penolong yang menentukan jenis respon imun baik dalam imunitas alami maupun imunitas yang didapatkan.³⁵ Sel ThP, sebagai prekursor sel *T helper* yang mempunyai penanda antigen-*naïve*, sampai dengan terpapar suatu antigen melalui kontak dengan sel sistem imun alami, akan mengalami diferensiasi yang tidak berfungsi secara khusus yang dinamakan Th0.^{35, 36, 37, 38} Pada tahap diferensiasi ini, sel T dapat terpapar berbagai jenis sitokin yang berbeda-beda yang disekresi oleh berbagai jenis sel. Jenis antigen akan turut menentukan diferensiasi sel T selanjutnya menjadi Th1 atau Th2, baik dalam bentuk sel efektor maupun sel memori. Apabila sel-sel T tersebut secara aktif memproduksi sitokin, Th1 memproduksi IFN- γ , dan Th2 memproduksi IL-4 dan IL-5, sel-sel T tersebut disebut sel efektor primer Th1 atau Th2, sedangkan apabila sel-sel tersebut dalam keadaan *resting* namun terpolarisasi ke arah salah satu tipe Th, maka sel-sel tersebut disebut sel efektor memori Th1 atau Th2.^{39, 40} Sel-sel efektor memori merupakan tipe khusus dari diferensiasi sel T, setidaknya apabila dilihat dari penanda CD8+-nya, dan bukan merupakan bentuk transisi dalam perkembangan sel efektor⁴¹. Sel-sel memori dapat langsung berdiferensiasi dari sel *naïve* yang terstimulasi antigen atau timbul sebagai akibat turunya aktivasi atau fungsi sel efektor.^{39, 42}

Fenotipe Th ditandai oleh jenis sitokin yang diproduksinya. Th1 pada tikus diketahui memproduksi IFN- γ , sedangkan Th2 memproduksi IL-4.^{43, 44} Th1

manusia memproduksi IFN- γ dan Th2 memproduksi IL-4 dan IL-5.⁴⁵ Penelitian-penelitian selanjutnya menambahkan bahwa selain IFN- γ , Th1 manusia memproduksi TNF- β dan IL-2, sedangkan Th2 memproduksi IL-4, IL-5, IL-6, dan IL-13.^{36, 46} IL-10 sering diklasifikasikan sebagai sitokin Th2 pada tikus, namun pada manusia, IL-10 dihasilkan baik oleh subset Th1 maupun Th2.^{38, 47}

Sel ThP (*naïve*) merupakan penghasil IL-2 eksklusif^{36, 40}, namun pada aktivasi inisial, ThP dapat menghasilkan berbagai jenis sitokin seperti IL-2, IL-4, TNF- α , IL-13, dan IFN- γ .^{37, 48} Sel Th0 menghasilkan IL-4 dan IFN- γ , namun keberadaannya masih kontroversial. Oleh karena sitokin-sitokin pada umumnya diukur pada populasi sel yang heterogen, sel Th0 dianggap ada dalam populasi campuran sel-sel Th1 dan Th2.³⁸

Beberapa penanda permukaan sel dapat membedakan subset Th1 dan Th2. Sel-sel Th1 mengekspresikan kedua rantai reseptor IL-12, baik $\beta 1$ maupun $\beta 2$, sedangkan sel-sel Th2 hanya mengekspresikan satu rantai saja, yaitu IL-12R $\beta 1$. Sebaliknya, sel-sel Th2 mengekspresikan kedua rantai reseptor IFN- γ , baik α maupun β , sementara sel-sel Th1 hanya mengekspresikan IFN- γ R α .³⁸

2.5.2 Faktor-faktor yang Meregulasi Diferensiasi Sel Th

Banyak faktor yang berperan dan saling mempengaruhi dalam pertumbuhan subset sel-sel Th1 maupun Th2. Tahap yang paling mendasar adalah adanya interaksi antara APC dengan kompleks TCR/CD3/CD4 pada sel T *naïve*. Interaksi tersebut akan mengaktivasi sel T *naïve* yang kemudian akan mengekspresikan reseptor IL-2 dan mensekresi IL-2, serta akan terjadi

peningkatan (*upregulation*) CD40L. IL-2 dan RIL-2 saling berinteraksi secara autokrin, sedangkan CD40L akan berinteraksi dengan CD40 yang diekspresikan APC pada permukaannya. Interaksi CD40-CD40L akan menstimulasi APC untuk mengekspresikan CD86/B7-2 dan kemudian CD80/B7-1. Molekul-molekul tersebut berperan sebagai ligan ikatan-ikatan membran untuk membran sel T CD28. Interaksi B7-CD28 merupakan koneksi kunci yang penting, oleh karena ikatan CD28 akan:

1. memperkuat sekresi IL-2, yang pada akhirnya akan meningkatkan proliferasi sel T.
2. memunculkan molekul anti-apoptotik *Bcl-x*, dan
3. berperan dalam sekresi-sitokin-sitokin selanjutnya.^{47, 48, 49}

Dengan adanya ligasi dengan CD28, sel T *naïve* dapat berdiferensiasi melalui lebih dari satu jalur sesuai dengan tujuannya.³⁶

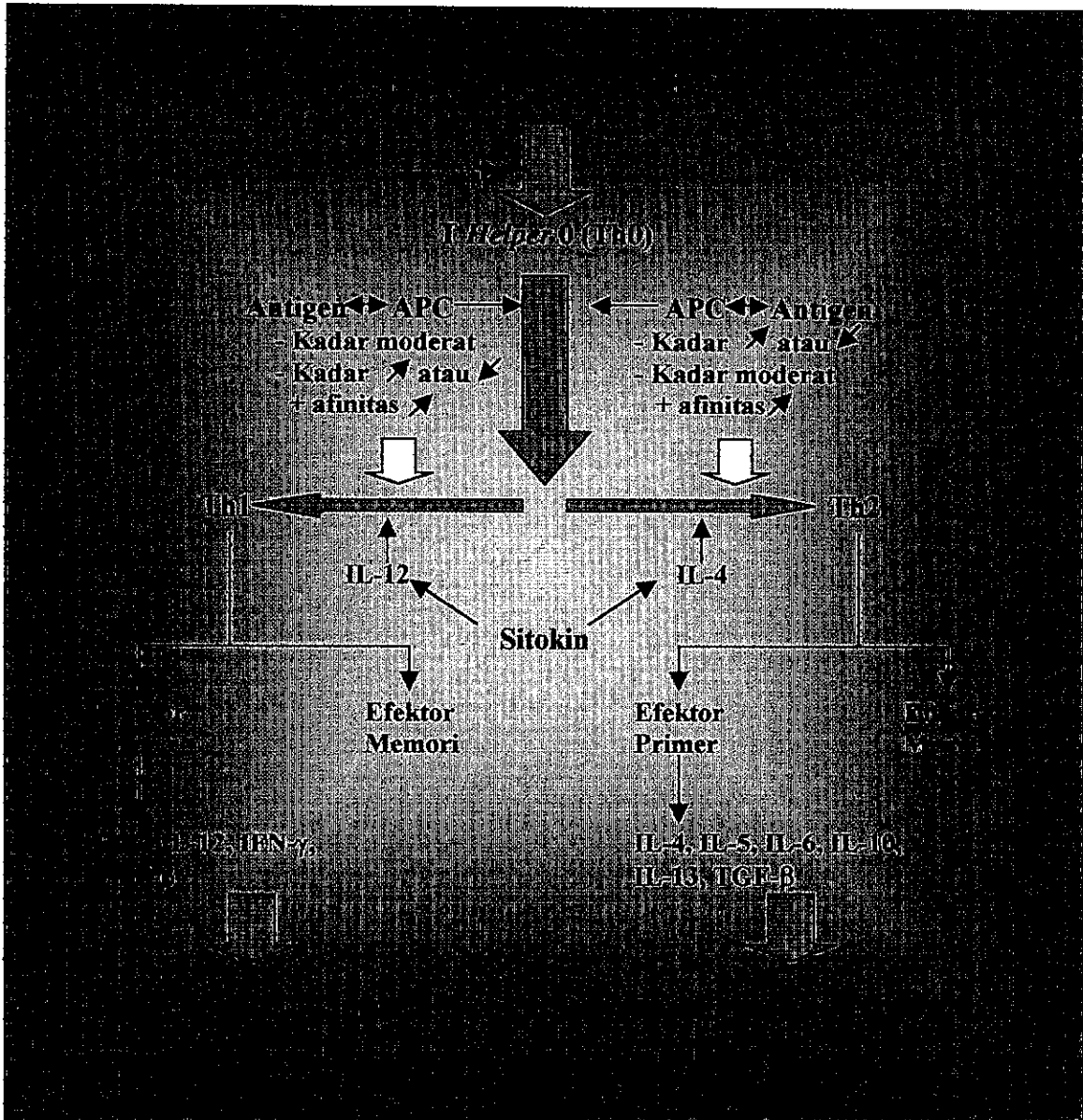
Salah satu faktor yang menentukan dalam diferensiasi ini adalah interaksi MHC-TCR itu sendiri. Kadar antigen yang sangat tinggi atau sangat rendah akan menyebabkan respon Th2, sedangkan kadar antigen yang moderat akan menyebabkan respon Th.⁵⁰ Apabila kadar dan afinitas antigen dipertimbangkan, maka respon yang dihasilkan adalah sebaliknya. Kadar antigen berafinitas tinggi yang tinggi dan yang rendah akan menghasilkan sel-sel Th1, sedangkan kadar moderat antigen berafinitas tinggi akan menghasilkan sel-sel Th2. Sel-sel Th0 akan dihasilkan pada kadar antigen rendah, moderat, maupun tinggi.^{51, 52, 53}

Faktor penentu diferensiasi selanjutnya adalah kadar IL-2, IL-12, dan IL-4. IL12 dan IL-4 merupakan sitokin-sitokin utama yang akan mempengaruhi sel T CD4

yang teraktivasi untuk berkembang menjadi Th1 atau Th2. Apabila sel T CD4 lebih banyak terpapar oleh IL-12, maka respon yang timbul adalah Th1, dan apabila lebih banyak terpapar oleh IL-4, maka respon yang timbul adalah Th2. ¹

33, 35, 54

Selain faktor intrinsik, respon Th juga dipengaruhi oleh faktor ekstrinsik seperti kadar *dehydroepiandrosterone* (DHEA), suatu steroid yang mempunyai banyak fungsi pada sistem imun, yang dipengaruhi langsung oleh sitokin-sitokin sel T. Aktivitas DHEA yang tinggi dijumpai pada keratinosit manusia dan plasenta dan aktivitasnya dipengaruhi oleh enzim DHEA sulfatase yang diproduksi oleh makrofag. DHEA memacu sel T *naïve* untuk memproduksi IL-4. ⁴³



Gambar 3. Fungsi dan pertumbuhan subset sel T helper

2.6. Sirih (*Piper betle* Linn.)

2.6.1. Ciri-ciri, Penyebaran, dan Pemanfaatan

Tumbuhan sirih (*Piper betle* Linn.) atau *Chavica auriculata* MIC, atau *Chavica betle* MIQ, di Indonesia dikenal sebagai *suruh*, *sedah* (Jawa), *seureuh* (Jawa Barat), *sere* (Madura), *base* (Bali), *tanub* (Aceh), *buarangir* (Mandailing), *dembau* (Toba), *sirih*, *cambai* (Minang, Lampung), *ganjung* (Ujung Pandang), *bide*, *lele* (Tidore, Ternate) dan banyak nama daerah lainnya.^{6, 55} Menurut Purselove (1969) dan Burkill (1935), Malaysia Timur dan Tengah dipercaya sebagai daerah asal sirih, kemudian menyebar luas ke seluruh daerah tropis di Asia, Madagaskar dan Afrika Timur. Oleh De Candolle dalam “*Origin of Cultivated Plants*”, kepulauan Malaya diperkirakan, merupakan daerah budidaya tanaman sirih lebih dari 2000 tahun yang lalu. Sir George Watt dalam “*Standard Encyclopedia of Modern Agriculture*”, menyebutkan bahwa Pulau Jawa mungkin juga merupakan daerah asal tanaman sirih, sedangkan menurut J.C. Konigsberger, tanaman sirih belum pernah ditemukan tumbuh liar di pulau Jawa, namun banyak ditemukan tumbuh liar di pulau Sulawesi dan kepulauan Maluku.⁵⁶

Tanaman sirih tumbuh merambat dengan menggunakan akar tambahan yang pendek dan banyak sekali. Panjang rambatannya dapat mencapai 2 – 4 meter, batangnya kuat setengah berkayu, batang muda licin dan tidak berbulu. Bagian buku membesar dan keluar daun yang bentuknya bulat telur melonjong, panjang 6 – 17,5 cm, lebar 3,5 – 10 cm. Tanaman sirih banyak dimanfaatkan dalam masyarakat untuk berbagai keperluan. Mengunyah daun sirih yang dicampur sedikit kapur, pinang dan gambir (*nginang* – Jawa), di masyarakat

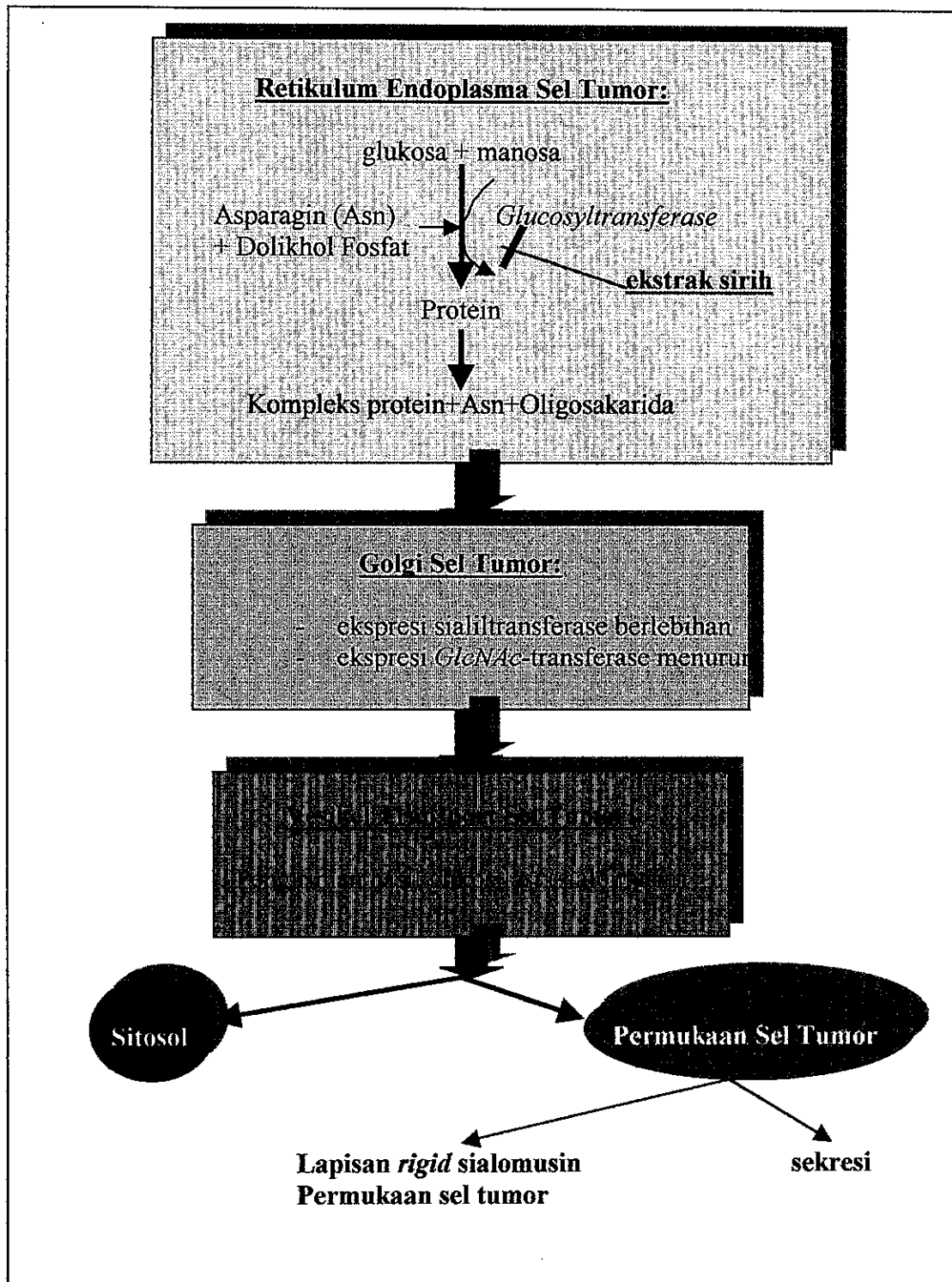
bertujuan sebagai penyegar mulut dan penguat gigi. Selain itu, sirih juga digunakan untuk berbagai keperluan seperti hidung berdarah, batuk/serak, sariawan, keputihan, anti-bau badan, pengurang produksi air susu, tetes mata, eksim, sampai dengan fungsi estetika dan sosial-budaya sebagai tanaman hias dan upacara tradisional.^{6,57}

2.6.2. Kandungan dan Khasiat Sirih

Penggunaan sebagai bahan obat mempunyai dasar kuat karena adanya kandungan minyak atsiri (*metel/betel oil*) dengan komponen fenol alam yang mempunyai daya antiseptik yang kuat. Menurut Guenther, 1949 dan Hegnauer, 1969, daun sirih mengandung 0,7 – 2,6% minyak atsiri yang sebagian besar (60 – 80%) terdiri dari fenilpropana (alilbrenkatekin), yaitu: o-hidroksikavikol, kadinen 6,7 – 9,1%, karyofilen 6,2 – 11,9%, alilkatekol 2,7 – 4,6%, kavikol 5,1 – 8,2%, kavibetol 0 – 1,2%, estragol 7 – 14,6%, eugenol 26,8 – 42,5%, metil eugenol 8,2 – 15,8%, karvakrol 2,2 – 4,8%, sineol 3,6 – 6,2%, pirokatekin, p-simol, terpinen dan seskuiterpen. Disamping itu juga ada 0,8 – 1,8% enzim diastase, tanin, gula dan amilum.^{6, 53} Di dalam 100 g daun segar terkandung komposisi sebagai berikut: air 85,4 mg, protein 3,1 mg, lemak 0,8 mg, karbohidrat 6,1 mg, serat 2,3 mg, bahan mineral 2,3 mg, kalsium 230 mg, fosfor 40 mg, besi 7 mg, besi ion 3,5 mg, karoten (vitamin A) 9600 IU, tiamin 70 µg, riboflavin 30 µg, asam nikotinat 0,7 mg dan vitamin C 5 mg. Terdapat juga 3,4 mg yodium dan kalium nitrat dengan kadar bervariasi. Daun sirih juga mengandung asam amino esensial kecuali lisin, histidin dan arginin. Asparagin terdapat dalam jumlah besar,

sedangkan glisin dalam bentuk gabungan, kemudian prolin dan ornitin. Daun yang muda mengandung jauh lebih banyak minyak atsiri, diastase dan gula dibandingkan daun tua. Alkaloid arakene yang berkhasiat sama dengan kokain juga terdapat dalam daun sirih.⁵⁷

Aktivitas antiseptik atau antibakteri daun sirih telah banyak dibuktikan melalui penelitian-penelitian daya hambatnya terhadap pertumbuhan bakteri seperti seperti *Streptococcus mutans*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus alfa*, *Staphylococcus aureus*, *Pneumococcus sp.* dan *Gaseous gangrena*.^{6, 7, 8} Daya hambat pertumbuhan bakteri tersebut mungkin disebabkan efek polifenol dalam daun sirih terhadap enzim sintesis glukukan yang larut air, yaitu *glucosyltransferase I (GTase-I)*. Nakahara dkk membuktikan efek inhibisi enzim *GTase-I* pada *Streptococcus sobrinus* 6715 oleh polifenol dalam ekstrak *Oolong tea*, sedangkan Ooshima dkk membuktikan fenol dalam ekstrak kakao dapat mengambat enzim *GTase Streptococcus mutans* MT8148R. Enzim *GTase-I* juga berperan dalam proses glikosilasi protein yang terjadi pada sel-sel sekretorik seperti *adenocarcinoma mammae*, sehingga diharapkan efek inhibisi enzim *GTase-I* oleh polifenol yang terdapat dalam ekstrak daun sirih dapat mengurangi ekspresi musin hasil glikosilasi protein sel tumor yang berlebihan.^{9, 17}



Gambar 4. Penghambatan glikosilasi sel tumor oleh ekstrak sirih

2.7. Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn.)

2.7.1. Ciri-ciri, Penyebaran, dan Pemanfaatan

Tumbuhan meniran (*Phyllanthus niruri* Linn.) termasuk dalam famili *Euphorbiaceae*, di daerah dikenal sebagai *meniran* (Jawa) dan *memeniran* (Sunda). Di Indonesia dikenal dua jenis meniran yaitu yang berbatang dan berdaun berwarna merah (*Phyllanthus urinaria*) dan yang berbatang dan berdaun berwarna hijau (*Phyllanthus niruri*) yang mempunyai kegunaan yang sama. Tumbuhan meniran lebih sering tumbuh secara liar dibanding tumbuh sebagai tanaman budidaya. Tumbuh pada ketinggian sampai dengan 1000 meter dari permukaan laut dengan curah hujan 2500 – 3000 mm per-tahun. Meniran merupakan tanaman semusim dengan tinggi mencapai 1 meter, tidak berbulu, banyak cabang dengan tangkai dan cabang kayu yang siku. Daunnya majemuk, bersirip genap dan berbentuk bulat telur.^{58, 59, 60} Selain di Indonesia, tumbuhan ini juga banyak terdapat di India, Cina, Malaysia, Filipina, Australia, Amerika dan Afrika.⁵⁹ Di Amerika Tengah dan Amerika Selatan, tumbuhan yang disebut *Phyllanthus niruri* sebenarnya adalah *Phyllanthus amarus*. Di negara Asia dan Afrika, nama *Phyllanthus niruri* digunakan untuk jenis *Phyllanthus amarus*, *Phyllanthus debilis*, *Phyllanthus fraternus*, atau *Phyllanthus rotundifolius*. Hooker, dalam deskripsinya mengenai botani, menyatakan bahwa *Phyllanthus amarus* dan *Phyllanthus debilis* terdapat di India dan dikenal sebagai *Phyllanthus urinaria* yang sering digunakan bertukaran dengan jenis yang dikenal sebelumnya sebagai *Phyllanthus niruri*, *Phyllanthus amarus*, *Phyllanthus debilis* dan *Phyllanthus fraternus*. Di Malaysia, nama yang sama digunakan untuk

Phyllanthus niruri dan *Phyllanthus urinaria*.⁵⁹ *Phyllanthus niruri* telah jamak dimanfaatkan di masyarakat untuk berbagai keperluan, terutama dalam pengobatan tradisional untuk berbagai jenis penyakit, seperti kencing batu, demam, sakit perut, batuk, sakit gigi, sakit kuning, gonorrhoe, kencing manis, darah tinggi, dan sebagainya.^{59, 61, 62, 63}

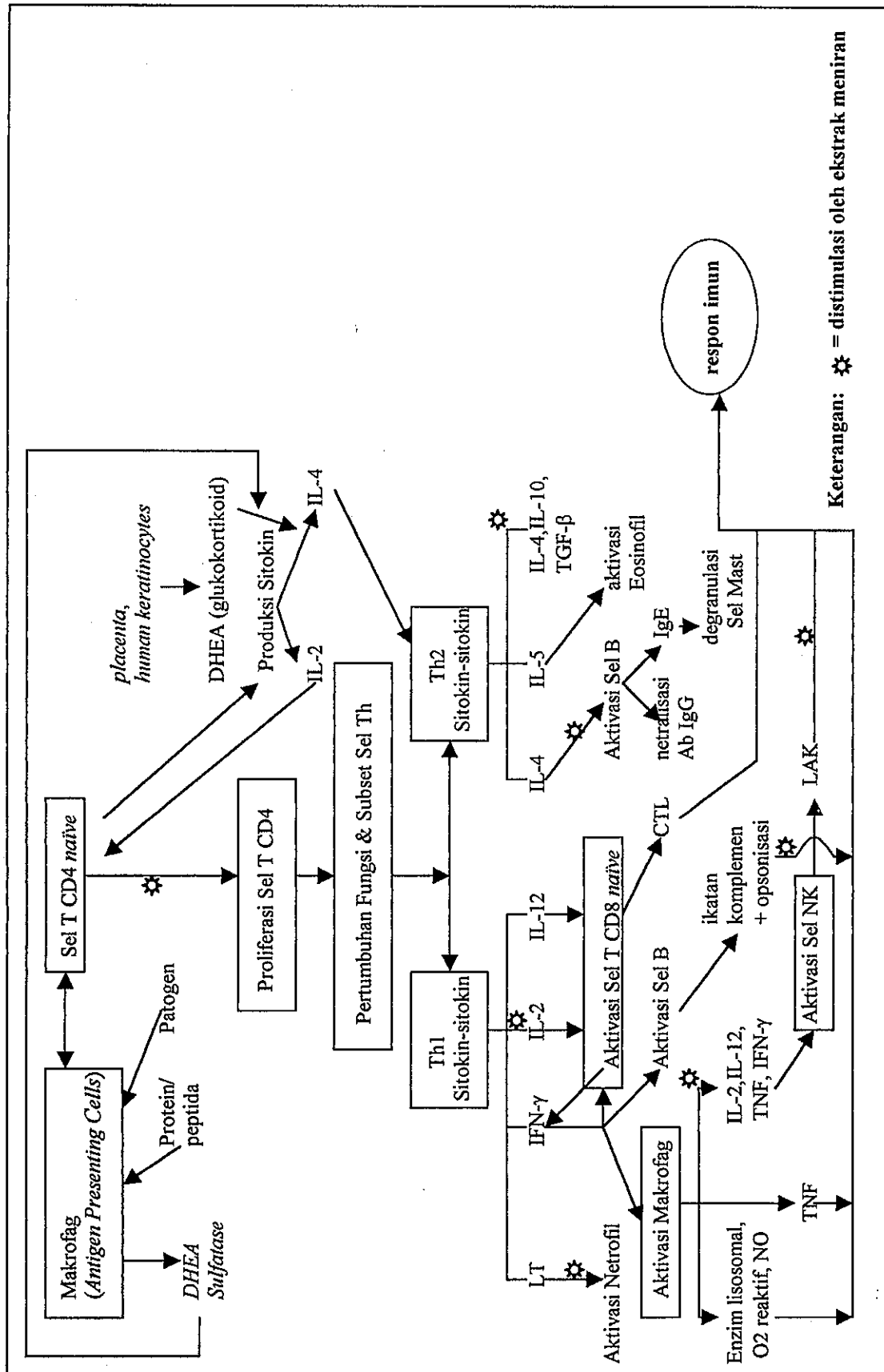
2.7.2. Kandungan dan Khasiat Meniran Terhadap Aktivitas Sistem Imun

Meniran mengandung beberapa senyawa kimia golongan lignan, flavonoid, alkaloid, triterpenoid dan senyawa kimia lainnya.^{59, 63, 64} Senyawa lignan terdiri dari filantin, hipofilantin, niranin, nirtetralin, filtetralin, lintetralin dan filnirurin. Senyawa flavonoid terdiri dari *quercetin*, *quercitrin*, *isoquercitrin*, *astragalin* dan *rutin*. Disamping itu, dilaporkan pula beberapa glikosida flavonoid lain, yaitu kaempferol-4'-ramnosida, eridiktio-7-ramnosida, fisetin-4'-O-glukosida dan 5,6,7,4'-tetrahidroksi-8-(3-metilbut-2-enil) flavonon-50-rutinosida (nirurin). Sedangkan senyawa alkaloidnya terdiri dari 4-metoksi-norsekurinin dan 4-metoksi-sekurinin. Senyawa triterpen-nya termasuk dalam kelompok *lupane* yang diidentifikasi sebaga *lup-20(29)-en 3B-ol*. Senyawa kimia lain yang juga terdapat dalam *Phyllanthus niruri* adalah ester asam flatat, asam lemak, vitamin C, dan tanin.^{10, 59, 63, 64}

Maat, 1996, melaporkan bahwa *Phyllanthus niruri* mempunyai sifat sebagai imunostimoulator. Beberapa parameter imunologis telah diteliti untuk membuktikan bahwa *Phyllanthus niruri* dapat mempengaruhi beberapa komponen sistem imun spesifik maupun non-spesifik, baik seluler maupun

humoral. Pemberian per-oral ekstrak *Phyllanthus niruri* kepada mencit terbukti dapat mempengaruhi fungsi dan aktivitas sel-sel imunokompromis, yaitu meningkatkan aktivitas hemolitik komplemen, meningkatkan aktivitas kemotaksis sel monosit / makrofag dan sel netrofil, meningkatkan sitotoksitas sel NK terhadap sel target *S49 (Mouse Lymphosarcoma)*, meningkatkan proliferasi sel limfosit T yang dirangsang oleh *Concavalin-A (Con-A)* dan *Phytohemagglutinin (PHA)*, meningkatkan sekresi *Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α)*, meningkatkan aktivitas proliferasi yang dirangsang Lipopolisakarida (LPS), meningkatkan produksi antibodi primer spesifik IgM serta antibodi sekunder spesifik IgG. Sedangkan terhadap fungsi sitotoksitas sel limfosit T terhadap sel target *Thioglycollate-induced Peritoneal Exudate Cells (TG-PEC)*, sekresi *Interferon gamma (IFN- γ)* dan *Interleukin-10 (IL-10)*, pemberian ekstrak tidak berpengaruh.¹⁰

Pemberian ekstrak meniran juga terbukti berpengaruh terhadap aktivitas respon imun natural / non-spesifik melalui peningkatan fagositosis non-spesifik sel monosit / sel makrofag, peningkatan reaksi inflamasi melalui peningkatan aktivitas kemotaksis sel netrofil dan sel makrofag dan peningkatan sitotoksitas sel NK. Sedangkan terhadap aktivitas respon imun *acquired* / spesifik, pemberian ekstrak meniran terbukti berpengaruh melalui peningkatan proliferasi limfosit T, peningkatan sekresi IL-4 oleh subset limfosit *T helper-2 (Th2)*, peningkatan proliferasi limfosit B, penurunan sekresi IL-2 oleh subset Th1 dan penurunan sekresi IL-10 oleh subset Th2.¹⁰



Gambar 5. Stimulasi sistem imun oleh ekstrak meniran¹⁰

2.8. Interaksi *Agent*

Interaksi *agent* mengacu pada interaksi obat, yaitu adanya interaksi yang mempengaruhi efek obat / *agent* lain yang digunakan bersama-sama. Interaksi dapat terukur secara kuantitatif, seperti meningkat atau menurunnya respons. Dalam penerapan klinik, interaksi obat merupakan akibat dari perubahan farmakokinetik, farmakodinamik, atau kombinasi keduanya.

Antagonisme merupakan tipe interaksi yang berdasarkan pada timbulnya mekanisme kerja atau efek yang berlawanan. Sedangkan additiv adalah interaksi yang berdasarkan pada timbulnya efek additiv, yaitu interaksi menghasilkan efek yang merupakan penjumlahan aljabar efek dua atau lebih *agent* yang bekerja pada reseptor yang sama. Apabila interaksi menghasilkan efek yang lebih besar dari interaksi additiv namun *agent-agent* yang terkait mempunyai mekanisme kerja yang berlainan, maka interaksi tersebut dinamakan sinergisme atau super-additiv. Potensiasi merupakan tipe interaksi *agent* yang menghasilkan efek yang lebih besar oleh karena adanya kombinasi dengan potensiator. Sedangkan potensiator sendiri secara tunggal tidak mempunyai efek terapi.^{65,66}

2.9. Landasan Teori

Respon imun utama untuk mengenali antigen tumor adalah respon imun Tipe 1 (Th1). Sel limfosit T, terutama sel CTL yang teraktivasi, dan sel NK yang teraktivasi, akan mengenali antigen tumor, kemudian mengikat sel tumor dan membunuhnya. Selanjutnya, sel limfosit T akan terus membelah untuk meningkatkan respon imun seluler terhadap sel tumor yang dianggap mempunyai

antigen asing. Pertumbuhan subset dan diferensiasi sel limfosit T ke arah respon imun Th1 atau Th2 sangat dipengaruhi oleh tipe stimulan, terutama adalah sitokin-sitokin yang dihasilkan pada saat pengenalan antigen.

Subset Th2 yang dipacu oleh IL-4 yang diproduksi oleh sel T CD4+ pada saat aktivasi inisial, lebih berperan dalam respon imun humoral, terutama dalam produksi IL-4 dan IL-5, yang berperan dalam proses alergi dan infeksi parasit (cacing) atau artropoda. Beberapa sitokin yang bersifat antagonis terhadap IFN- γ , seperti IL-4, IL-10, dan TGF- β yang dihasilkan oleh Th2, berfungsi sebagai regulator fisiologis untuk mengendalikan respon imun yang membahayakan dari Th1, yaitu dengan menekan aktivasi makrofag.

Sel T CD4 yang teraktivasi oleh paparan peptida yang disajikan oleh MHC kelas II APC, akan menghasilkan IL-2 yang selanjutnya akan memacu sel T CD4 sendiri untuk berproliferasi. Saat berproliferasi, sel T CD4 akan mengalami diferensiasi ke arah respon imun Th1 atau Th2, tergantung pada keadaan lingkungan di sekitarnya. Ekstrak meniran akan meningkatkan fungsi dan pertumbuhan subset sel limfosit T CD4 ke arah respon imun Th1 dan Th2, sehingga sitokin-sitokin yang dihasilkan adalah sitokin-sitokin respon imun Th1 dan Th2. Sel-sel limfosit Th1 akan menghasilkan IL-2, IFN- γ , IL-12, dan LT. IFN- γ dan IL-2 akan mengaktivasi sel T CD8 dan sel T CD8 yang teraktivasi (CTL) akan mengenali antigen permukaan sel tumor yang disajikan oleh MHC I. Kemudian, CTL akan berikatan dengan sel tumor. IFN- γ juga mengaktifasi makrofag yang selanjutnya akan memproduksi IL-2, IL-12, TNF- α , dan IFN- γ . Keempat sitokin ini akan mengaktivasi sel NK menjadi LAK yang selanjutnya

akan mengenali antigen permukaan tumor dan berikatan dengan sel tumor. CTL dan LAK yang berikatan dengan sel tumor akan mengeluarkan *perforin* yang akan masuk menembus membran plasma sel tumor dan akan menimbulkan sinyal kepada sel tumor untuk lisis dan apoptosis.. Sedangkan fungsi dan pertumbuhan subset Th2 kurang berperan dalam mekanisme pembunuhan sel tumor.

Ekstrak meniran telah terbukti dapat berperan sebagai imunomodulator. Beberapa komponen sistem imun yang berperan dalam mekanisme melawan sel tumor, seperti fungsi subset sel *T helper*, terutama Th1, beserta produksi sitokin-sitokin yang terkait dan sitotoksisitas sel NK, dapat distimulasi fungsi dan aktivitasnya (imunomodulasi positif) oleh *Phyllanthus niruri* walaupun mekanisme kerjanya secara pasti belum dapat dijelaskan. Proses imunostimulasi ini pada akhirnya akan berpengaruh terhadap tahap pelaksanaan efektor imun dimana reaksi imunitas tubuh terhadap sel tumor dilaksanakan.

Selain melalui mekanisme seluler, proses pembunuhan sel tumor oleh Th1 juga diperankan oleh makrofag. Makrofag yang teraktivasi oleh IFN- γ yang dihasilkan oleh Th1 akan memproduksi enzim lisosomal, metabolit oksigen reaktif, dan *nitrit oxide* (NO) yang mempunyai sifat sitotoksik terhadap sel tumor melalui mekanisme enzimatik dan pelepasan metabolit oksigen reaktif (*respiratory burst*). Makrofag juga memproduksi TNF- α yang akan menginduksi mikrotrombi pembuluh darah tumor, sehingga mengakibatkan nekrosis sel tumor.

Ekstrak sirih yang mengandung banyak polifenol alam akan berfungsi sebagai inhibitor glikosilasi N sel tumor *adenocarcinoma mammae*. Penghambatan glikosilasi N berakibat pada turunnya ekspresi musin pada

permukaan sel tumor sehingga barrier *rigid* yang dibentuk oleh *SMC* relatif berkurang rigiditasnya. Penurunan ekspresi *SMC* ini mempermudah proses pengenalan antigen permukaan tumor oleh sistem imun sehingga sel tumor menjadi lebih rentan terhadap serangan sel-sel imun. Di lain pihak, aktivitas sel-sel efektor sistem imun seperti sel NK dan sel CTL telah mengalami proses stimulasi oleh ekstrak meniran sehingga diharapkan dapat meningkatkan daya bunuhnya terhadap sel tumor yang sudah mengalami penurunan ekspresi *SMC* pada permukaannya. Hasil akhir yang diharapkan adalah akan lebih banyak jumlah sel tumor yang mengalami kematian.

2.10. Pemilihan Kerangka Konseptual

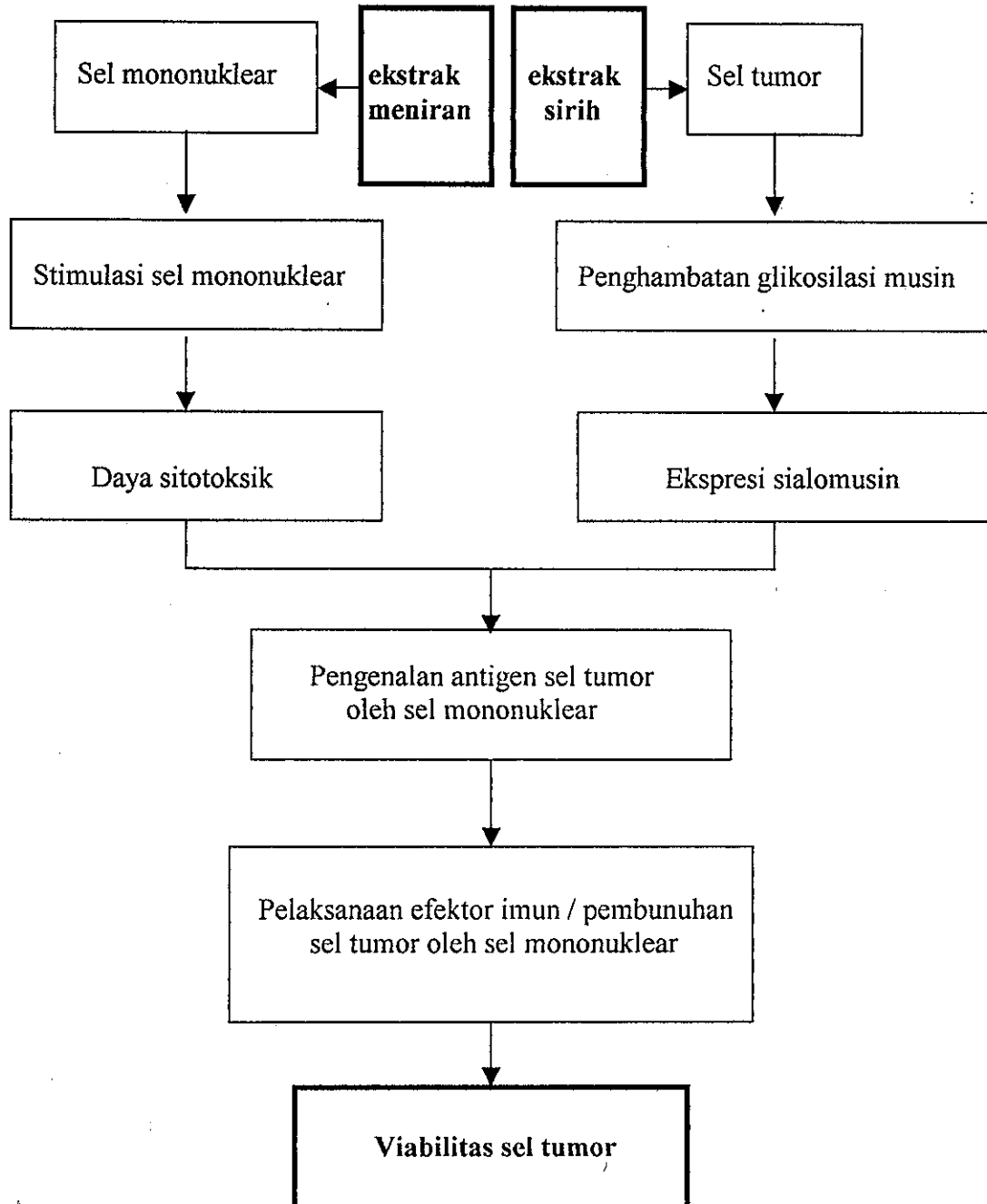
Beberapa pertimbangan yang menjadi dasar pemilihan kerangka konseptual dalam penelitian ini, adalah sebagai berikut:

1. Mekanisme aktivasi sampai dengan pelaksanaan efektor pada respon imun Th1 lebih berperan dalam proses pembunuhan sel tumor dibandingkan respon imun Th2.
2. Pengamatan dan pengukuran variabel-variabel, yaitu viabilitas sel tumor lebih memungkinkan untuk dilakukan dilakukan dengan metoda yang lebih sederhana, sehingga memungkinkan pengamatan dan pengukuran dilakukan dalam keadaan fasilitas bahan dan perlengkapan yang lebih sederhana.
3. Adanya keterbatasan peneliti dalam hal keahlian, pengalaman, dan finansial untuk mengamati seluruh variabel yang ada.

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1. KERANGKA TEORI

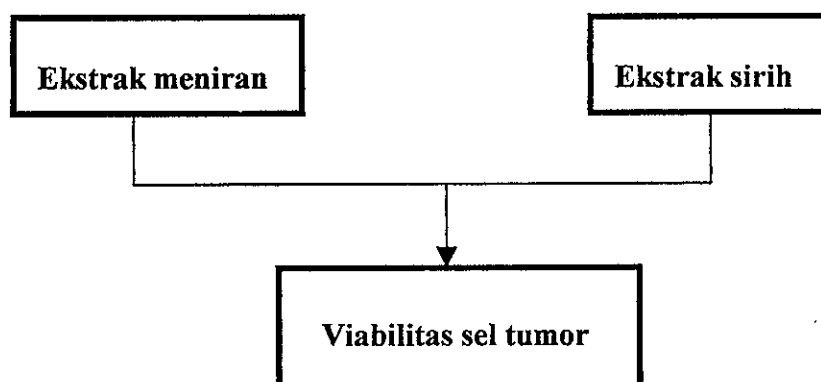


Sesuai dengan tujuan penelitian, variabel bebas pada penelitian ini adalah viabilitas sel tumor yang diukur dengan metode eksklusi *trypan blue*. Pemaparan ekstrak meniran terhadap sel mononuklear bertujuan menimbulkan efek imunostimulansia. Populasi berbagai jenis sel mononuklear didapatkan dari lien mencit yang dimaserasi dengan filter *nylon wool* di dalam genangan medium RPMI lengkap. Dengan demikian, populasi sel mononuklear tersebut diharapkan dapat mewakili keadaan *in vivo* yang sebenarnya untuk dapat menimbulkan efek imunostimulansia.

Dalam keadaan *in vitro*, pemaparan ekstrak sirih terhadap sel tumor yang bertujuan menurunkan ekspresi kompleks sialomusin sel tumor, diasumsikan dapat mencapai sel tumor sesuai dosis yang diharapkan. Sedangkan proses pengenalan sel tumor sampai dengan tahap pelaksanaan efektor imunologis dilakukan dengan menginkubasi bersama sel tumor dan sel mononuklear dalam satu sumuran. Stimulasi sel mononuklear, ekspresi sialomusin, dan indikator-indikator proses imunologis tidak diukur.

3.2. KERANGKA KONSEP

Berdasarkan uraian di atas, maka disusun kerangka konsep penelitian sebagai berikut:



3.3. HIPOTESIS PENELITIAN

3.3.1. Hipotesis Mayor:

Ada perbedaan viabilitas sel tumor pada sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* yang dipapari kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih dibandingkan dengan yang dipapari ekstrak meniran atau ekstrak sirih secara tunggal maupun dengan yang tidak dipapari ekstrak meniran atau ekstrak sirih.

3.3.2. Hipotesis Minor:

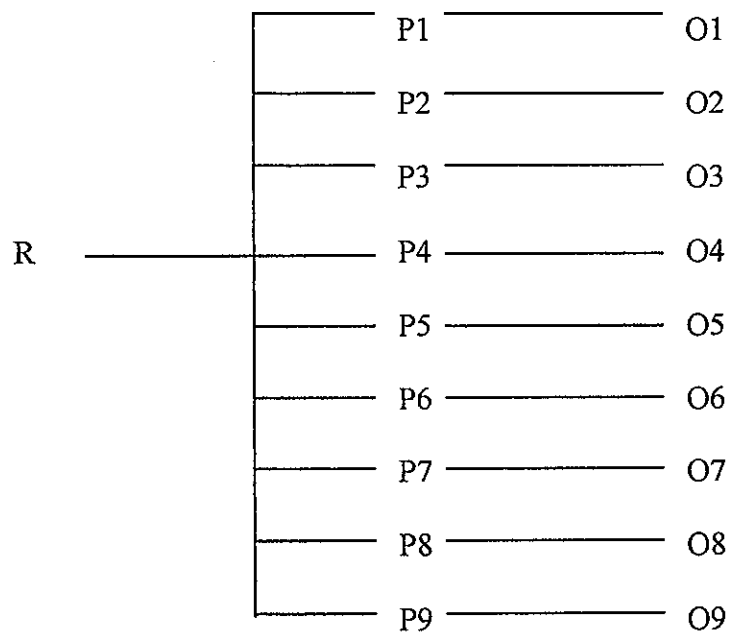
1. Ada perbedaan viabilitas sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* yang dipapari ekstrak sirih dibandingkan dengan sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* yang tidak dipapari ekstrak sirih
2. Ada perbedaan viabilitas sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* yang dipapari ekstrak meniran dibandingkan dengan sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* yang tidak dipapari ekstrak meniran.
3. Ada perbedaan viabilitas sel tumor pada sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* yang dipapari kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih dibandingkan dengan sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* yang dipapari ekstrak meniran atau ekstrak sirih saja.
4. Ada perbedaan viabilitas sel tumor pada sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* yang dipapari kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih dibandingkan dengan sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* yang tidak dipapari ekstrak meniran atau ekstrak sirih.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan pendekatan *Post test – Only Control Group Design* yang menggunakan kultur sel dalam sumuran sebagai unit penelitian. Perlakuan adalah pemberian ekstrak meniran pada kultur sel mononuklear yang berasal dari lien mencit *C3H* dan pemberian ekstrak sirih pada kultur sel *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* dengan keluaran perubahan jumlah viabilitas sel tumor.



Keterangan:

- R : Randomisasi
- P1 : Sel tumor yang dipapari ekstrak sirih dosis 0,1 mg/ml (dosis minimal) yang diinkubasi bersama dengan sel mononuklear yang dipapari ekstrak meniran dosis 0,1 mg/ml (dosis minimal), selanjutnya disebut Kelompok Perlakuan Tsi(m)+MoMe(m).
- P2 : Sel tumor yang dipapari ekstrak sirih dosis 0,1 mg/ml (dosis minimal) yang diinkubasi bersama dengan sel mononuklear yang dipapari ekstrak meniran dosis 1 mg/ml (dosis supra-minimal), selanjutnya disebut Kelompok Perlakuan Tsi(m)+MoMe(sm).
- P3 : Sel tumor yang dipapari ekstrak sirih dosis 1 mg/ml (dosis supra-minimal) yang diinkubasi bersama dengan sel mononuklear yang dipapari ekstrak meniran dosis 0,1 mg/ml (dosis minimal), selanjutnya disebut Kelompok Perlakuan Tsi(sm)+MoMe(m).
- P4 : Sel tumor yang dipapari ekstrak sirih dosis 1 mg/ml (dosis supra-minimal) yang diinkubasi bersama dengan sel mononuklear yang dipapari ekstrak meniran dosis 1 mg/ml (dosis supra-minimal), selanjutnya disebut Kelompok Perlakuan Tsi(sm)+MoMe(sm).
- P5 : Sel tumor tanpa paparan ekstrak sirih yang diinkubasi bersama dengan sel mononuklear tanpa paparan ekstrak meniran, selanjutnya disebut Kelompok Perlakuan TK+MoK.

- P6 : Sel tumor tanpa paparan ekstrak sirih yang diinkubasi bersama dengan sel mononuklear yang dipapari ekstrak meniran dosis 0,1 mg/ml (dosis minimal), selanjutnya disebut Kelompok Perlakuan TK+MoMe(m).
- P7 : Sel tumor tanpa paparan ekstrak sirih yang diinkubasi bersama dengan sel mononuklear yang dipapari ekstrak meniran dosis 1 mg/ml (dosis supra-minimal), selanjutnya disebut Kelompok Perlakuan TK+MoMe(sm).
- P8 : Sel tumor yang dipapari ekstrak sirih dosis 0,1 mg/ml (dosis minimal) yang diinkubasi bersama dengan sel mononuklear tanpa paparan ekstrak meniran, selanjutnya disebut Kelompok Perlakuan Tsi(m)+MoK.
- P9 : Sel tumor yang dipapari ekstrak sirih dosis 1 mg/ml (dosis supra-minimal) yang diinkubasi bersama dengan sel mononuklear tanpa paparan ekstrak meniran, selanjutnya disebut Kelompok Perlakuan Tsi(sm)+MoK.
- O1 : Pengamatan pada sel tumor kelompok perlakuan P1
- O2 : Pengamatan pada sel tumor kelompok perlakuan P2
- O3 : Pengamatan pada sel tumor kelompok perlakuan P3
- O4 : Pengamatan pada sel tumor kelompok perlakuan P4
- O5 : Pengamatan pada sel tumor kelompok perlakuan P5
- O6 : Pengamatan pada sel tumor kelompok perlakuan P6
- O7 : Pengamatan pada sel tumor kelompok perlakuan P7
- O8 : Pengamatan pada sel tumor kelompok perlakuan P8
- O9 : Pengamatan pada sel tumor kelompok perlakuan P9

4.2. Populasi dan Sampel

4.2.1. Populasi

Populasi penelitian ini adalah kultur sel tumor *adenocarcinoma mammae* yang berasal dari tumor yang ditumbuhkan di tubuh mencit *C3H*. Bagian tumor mencit yang tidak mengalami nekrosis dieksisi dan dihaluskan dengan gunting bengkok. Setelah diberi tripsin, medium RPMI lengkap, disentrifus, dan dicuci 3 kali dengan medium RPMI lengkap, ditambahkan medium RPMI lengkap dan dimasukkan ke dalam *flask* untuk diinkubasi dalam inkubator CO₂. Langkah-langkah preparasi sel tumor dilakukan secara steril dalam *laminar air flow*.

Sel *adenocarcinoma mammae* dipilih sebagai populasi dengan beberapa pertimbangan sebagai berikut:

1. Sel *adenocarcinoma mammae* mempunyai karakteristik musin yang menyelubungi sel tumor. Selubung musin berperan sebagai halangan terhadap respon imun dalam mekanisme pengenalan antigen oleh sistem imun sehingga sel tumor dapat lolos dari sistem imunosurveilans.
2. Pengalaman dan kemampuan peneliti dalam membiakkan sel tumor masih terbatas pada sel *adenocarcinoma mammae*.
3. Kemudahan mendapatkan mencit yang bertumor *adenocarcinoma mammae* dari Laboratorium Patologi Eksperimental Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

4.2.2. Sampel

Sampel penelitian ini adalah kultur sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* yang dibiakkan dalam medium RPMI 1640 yang mengandung FBS 10%, Fungizone 0,1%, Gentamycin 0,2%, (medium RPMI lengkap), yang dipanen dari kultur sel tumor dalam *flask* dan dilakukan penghitungan jumlah sel tumor. Kemudian ditempatkan secara acak sederhana ke dalam 3 sumuran dalam jumlah yang sama per-sumurannya. Sumuran pertama dipapari medium RPMI lengkap, sumuran kedua dipapari ekstrak sirih 0,1 mg/ml, sumuran ketiga dipapari ekstrak sirih 1 mg/ml. Dalam waktu yang sama, sel mononuklear diisolasi dari lien mencit *C3H* dan dilakukan penghitungan jumlah sel mononuklear. Jumlah sel mononuklear diatur sedemikian rupa dengan pengenceran medium sehingga berjumlah 50 kali jumlah sel tumor.⁶⁷ Secara acak sederhana sel mononuklear ditempatkan ke dalam 3 sumuran dalam jumlah yang sama per-sumurannya. Sumuran pertama dipapari medium RPMI lengkap, sumuran kedua dipapari ekstrak meniran 0,1 mg/ml, sumuran ketiga dipapari ekstrak meniran 1 mg/ml. Setelah inkubasi 24 jam, masing-masing sumuran dicuci dari mediumnya yang mengandung ekstrak sirih atau ekstrak meniran, kemudian ditempatkan dalam volume yang sama ke dalam 9 *multi-well plate 96* sesuai dengan pembagian kelompok perlakuan sebagai berikut:

T1 : Sel tumor yang telah dipapari ekstrak sirih dosis 0,1 mg/ml diinkubasi bersama dalam satu sumuran dengan sel mononuklear yang telah dipapari ekstrak meniran dosis 0,1 mg/ml.

UPT-PUSTAK-UNDIP

- T2 : Sel tumor yang telah dipapari ekstrak sirih dosis 0,1 mg/ml diinkubasi bersama dalam satu sumuran dengan sel mononuklear yang telah dipapari ekstrak meniran dosis 1 mg/ml.
- T3 : Sel tumor yang telah dipapari ekstrak sirih dosis 1 mg/ml diinkubasi bersama dalam satu sumuran dengan sel mononuklear yang telah dipapari ekstrak meniran dosis 0,1 mg/ml.
- T4 : Sel tumor yang telah dipapari ekstrak sirih dosis 0,1 mg/ml diinkubasi bersama dalam satu sumuran dengan sel mononuklear yang telah dipapari ekstrak meniran dosis 1 mg/ml.
- T5 : Sel tumor yang tidak dipapari ekstrak sirih (hanya dipapari medium lengkap) bersama dalam satu sumuran dengan sel mononuklear yang tidak dipapari ekstrak meniran (hanya dipapari medium saja).
- T6 : Sel tumor yang tidak dipapari ekstrak sirih (hanya dipapari medium lengkap) diinkubasi bersama dalam satu sumuran dengan sel mononuklear yang telah dipapari ekstrak meniran dosis 0,1 mg/ml.
- T7 : Sel tumor yang tidak dipapari ekstrak sirih (hanya dipapari medium lengkap) diinkubasi bersama dalam satu sumuran dengan sel mononuklear yang telah dipapari ekstrak meniran dosis 1 mg/ml.
- T8 : Sel tumor yang telah dipapari ekstrak sirih dosis 0,1 mg/ml diinkubasi bersama dalam satu sumuran dengan sel mononuklear yang tidak dipapari ekstrak meniran (hanya dipapari medium saja).

T9 : Sel tumor yang telah dipapari ekstrak sirih dosis 1 mg/ml diinkubasi bersama dalam satu sumuran dengan sel mononuklear yang tidak dipapari ekstrak meniran (hanya dipapari medium saja).

4.3. Varibel Penelitian

4.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah:

- Perlakuan dengan kombinasi berbagai dosis, yang dapat dikategorikan menjadi 9 kelompok perlakuan sesuai dengan kelompok sampel.

4.3.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah:

- Viabilitas sel tumor, dihitung dari proporsi (dalam %) jumlah sel tumor yang hidup per total jumlah sel tumor baik yang hidup maupun yang mati, dalam kotak sedang bilik hitung *Neubauer Improved*.

4.4. Bahan dan Materi

- Mencit *strain C3H* usia 5 – 8 minggu bertumor *adenocarcinoma mammae* yang diperoleh dari Laboratorium Patologi Eksperimental Bagian Patologi Anatomik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Kultur sel mononuklear yang berasal dari lien mencit *strain C3H*
- Kultur sel tumor *adenocarcinoma mammae* yang berasal dari tumor yang tumbuh pada mencit *strain C3H*

- *Chloroform*, Alkohol 70%
- Medium RPMI lengkap yang mengandung Gentamycin 0,2%, Fungizone 0,1% dan *Foetal Bovine Serum* (FBS) 10%
- Medium RPMI kosong (tanpa Gentamycin, Fungizone, dan FBS)
- Serbuk ekstrak air sirih (*Piper betle Linn.*) yang diekstraksi di Laboratorium Teknologi Fermentasi PPAU Bioteknologi-Institut Teknologi Bandung
- Serbuk ekstrak air meniran (*Phyllanthus niruri Linn.*) yang diekstraksi di Laboratorium Teknologi Fermentasi PPAU Bioteknologi-Institut Teknologi Bandung
- Larutan *trypan blue*
- *Phosphate Buffer Saline* (PBS)
- Tripsin-EDTA 0,025%
- NH_4Cl

4.5. Alat / Instrumen Penelitian

- Papan fiksasi + jarum pentul
- Bilik hitung *Neubauer Improved*
- Gunting lurus & bengkok
- *Syringe filter 0,2 μm membrane non-pyrogenic*
- Pinset, Skalpel
- Cawan petri steril
- Mikroskop inversi
- Kertas *Nylon wool*
- *Disposable spuit 5 ml*
- Pipet *Pasteur* steril
- *Multi-well plate with cover 24*
- Pipet 1 ml, 2 ml, 10 ml
- *Multi-well plate with cover 96*
- Sentrifus
- Pipet *Eppendorf* 50 μl
- Tabung reaksi steril
- *Laminar air flow*

- Timbangan μg digital
- *Counter* sel
- *Flask* kultur sel / jaringan
- Inkubator CO_2

4.6. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Patologi Eksperimental Bagian Patologi Anatomik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, pada bulan September 2002 sampai dengan bulan Maret 2003.

4.7. Prosedur Pengumpulan Data

4.7.1. Tahap Penelitian

Secara garis besar, penelitian ini dibagi menjadi dua tahap, yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Penelitian pendahuluan terdiri dari penelitian eksplorasi pengaruh langsung pemaparan tunggal ekstrak meniran atau ekstrak sirih saja terhadap viabilitas sel tumor dan sel mononuklear dan penelitian eksplorasi pengaruh pemaparan tunggal ekstrak meniran atau ekstrak sirih saja terhadap viabilitas sel tumor melalui aktivitas sel efektor imun (sel mononuklear). Sedangkan penelitian utama adalah penelitian pengaruh pemaparan kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih terhadap viabilitas sel tumor melalui aktivitas sel efektor imun (sel mononuklear).

4.7.1.1. Penelitian Pendahuluan

Tujuan penelitian pendahuluan eksplorasi pengaruh langsung pemaparan tunggal ekstrak terhadap viabilitas sel tumor dan sel mononuklear adalah

membuktikan ada atau tidak adanya penurunan viabilitas sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* yang dipapari ekstrak sirih dan penurunan viabilitas sel mononuklear yang dipapari ekstrak meniran. Sedangkan penelitian eksplorasi pengaruh pemaparan tunggal ekstrak meniran atau ekstrak sirih saja terhadap viabilitas sel tumor melalui aktivitas sel mononuklear bertujuan untuk membuktikan ada atau tidak adanya penurunan viabilitas sel tumor yang dipapari ekstrak meniran atau ekstrak sirih saja melalui aktivitas sel mononuklear. Teknik pemeriksaan masing-masing tahap akan diuraikan di dalam lampiran.

4.7.1.1.1. Penelitian eksplorasi pengaruh langsung pemaparan tunggal ekstrak terhadap viabilitas sel tumor dan sel mononuklear. Tahap ini adalah tahap perlakuan *pra-matching*, dimana sel tumor tidak diinkubasikan bersama (*di-matching*) dengan sel mononuklear dalam satu tempat. Pada tahap ini, sel mononuklear dipapari ekstrak meniran dan sel tumor dipapari ekstrak sirih. Masing-masing ekstrak terdiri dari beberapa tingkatan dosis yaitu 0 mg/ml (sebagai kontrol), 0,1 mg/ml, 1 mg/ml, 10 mg/ml, dan 100 mg/ml. Waktu pemaparan adalah 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Kemudian masing-masing dihitung viabilitas selnya dengan metode eksklusi *trypan blue*. Hasil penelitian ini menunjukkan pengaruh langsung pemaparan ekstrak meniran terhadap viabilitas sel mononuklear dan pengaruh langsung pemaparan ekstrak sirih terhadap viabilitas sel tumor.

4.7.1.1.2. Penelitian eksplorasi pengaruh paparan tunggal ekstrak sirih atau ekstrak meniran saja terhadap viabilitas sel tumor melalui aktivitas sel efektor imun (sel mononuklear). Pada tahap ini, sel mononuklear dipapari ekstrak meniran dengan dosis 0 mg/ml (sebagai kontrol), 0,1 mg/ml, 1 mg/ml, 10 mg/ml, dan 100 mg/ml dengan waktu paparan 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Sel mononuklear yang telah dipapari ekstrak meniran pada kelompok waktu paparan 24 jam dicuci dari ekstrak meniran, kemudian ditempatkan (*di-matching*) ke dalam sumuran bersama dengan sejumlah sel tumor dengan perbandingan 1 sel tumor : 50 sel mononuklear. Setelah diinkubasi selama 18 jam, viabilitas sel tumor dihitung dengan metode ekslusi *trypan blue*.^{67, 68} Demikian pula selanjutnya untuk kelompok-kelompok waktu paparan 48 jam dan 72 jam. Hasil penelitian ini menunjukkan pengaruh paparan ekstrak meniran terhadap daya sitotoksik sel mononuklear dalam membunuh sel tumor.

Pada penelitian tersendiri, sel tumor dipapari ekstrak sirih dengan dosis 0 mg/ml (sebagai kontrol), 0,1 mg/ml, 1 mg/ml, 10 mg/ml, dan 100 mg/ml dengan waktu paparan 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Sel tumor yang telah dipapari ekstrak sirih pada kelompok waktu 24 jam dicuci dari ekstrak sirih, kemudian ditempatkan ke dalam sumuran bersama dengan sel mononuklear (*di-matching*) dengan perbandingan 1 sel tumor : 50 sel mononuklear. Setelah diinkubasi selama 18 jam, viabilitas sel tumor dihitung dengan metode ekslusi *trypan blue*.^{67, 68} Demikian pula selanjutnya untuk kelompok-kelompok waktu paparan 48 jam dan 72 jam. Hasil penelitian ini menunjukkan pengaruh paparan ekstrak sirih terhadap viabilitas sel tumor melalui aktivitas sel mononuklear.

4.7.1.2. Penelitian Utama: Penelitian pengaruh pemaparan kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih terhadap viabilitas sel tumor melalui aktivitas sel efektor imun (sel mononuklear).

Tujuan penelitian utama ini adalah untuk membuktikan ada atau tidak adanya penurunan viabilitas sel tumor yang lebih bermakna pada sel tumor yang dipapari kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih melalui aktivitas sel mononuklear dibandingkan dengan pemaparan ekstrak meniran atau ekstrak sirih secara tunggal. Teknik pemeriksaan diuraikan dalam lampiran.

Pada tahap ini, sel mononuklear dipapari ekstrak meniran dengan dosis 0 mg/ml (hanya dipapari medium RPMI), 0,1 mg/ml, dan 1 mg/ml kemudian diinkubasi dalam waktu 24 jam. Sedangkan, sel tumor dipapari ekstrak sirih dengan dosis 0 mg/ml (hanya dipapari medium RPMI), 0,1 mg/ml, dan 1 mg/ml kemudian diinkubasi dalam waktu 24 jam. Setelah inkubasi 24 jam, sel mononuklear dicuci dari ekstrak meniran dan sel tumor dicuci dari ekstrak sirih. Masing-masing ekstrak diganti dengan medium RPMI lengkap sebagai pelarut. Dengan perbandingan jumlah sel tertentu, sel tumor diinkubasikan bersama (*matching*) dengan sel mononuklear dalam sumuran-sumuran sesuai dengan pengelompokan sampel selama 18 jam. Setelah inkubasi 18 jam, viabilitas sel tumor dihitungkan dengan metode ekslusi *trypan blue*.

4.7.2. Definisi Operasional

- Ekstrak sirih (*Piper betle Linn.*):

Adalah ekstrak akuades dari daun sirih (*Piper betle Linn.*) yang berupa serbuk hijau kecoklatan yang diekstraksi dan disertifikasi di Laboratorium Teknologi Fermentasi PPAU Bioteknologi-Institut Teknologi Bandung (sertifikat terlampir).

- Ekstrak meniran (*Phyllanthus niruri Linn.*):

Adalah ekstrak akuades dari tumbuhan meniran (*Phyllanthus niruri Linn.*) yang berupa serbuk hijau lumut yang diekstraksi dan disertifikasi di Laboratorium Teknologi Fermentasi PPAU Bioteknologi-Institut Teknologi Bandung (sertifikat terlampir).

- Sel tumor:

Adalah sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *strain C3H* yang tumbuh spontan atau diinokulasikan ke tubuh mencit. Mencit *strain C3H* bertumor diperoleh dari Laboratorium Patologi Eksperimental Bagian Patologi Anatomik Universitas Indonesia, Jakarta.

- Sel mononuklear:

Adalah sel mononuklear yang diisolasi dari lien mencit *strain C3H* yang sehat, usia 6 – 10 bulan, dengan metode filtrasi *Nylon wool*.

- *Matching*:

Adalah suatu tahap ditemukannya sel tumor dan sel mononuklear, setelah dipapari atau tanpa dipapari ekstrak, dalam satu tempat (sumuran) dan waktu yang bersamaan untuk kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂.

- *Pra-matching:*

Adalah suatu tahap perlakuan (pemaparan ekstrak) terhadap sel tumor dan sel mononuklear dalam tempat dan waktu yang berlainan, yang kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂, sebelum dilakukan tahap *matching* sel tumor dan sel mononuklear.

- Dosis minimal:

Adalah dosis terkecil ekstrak, yaitu 0,1 mg/ml.

- Dosis supra-minimal:

Adalah dosis ekstrak yang besarnya satu tingkat di atas dosis minimal, yaitu 1 mg/ml.

- Viabilitas sel tumor:

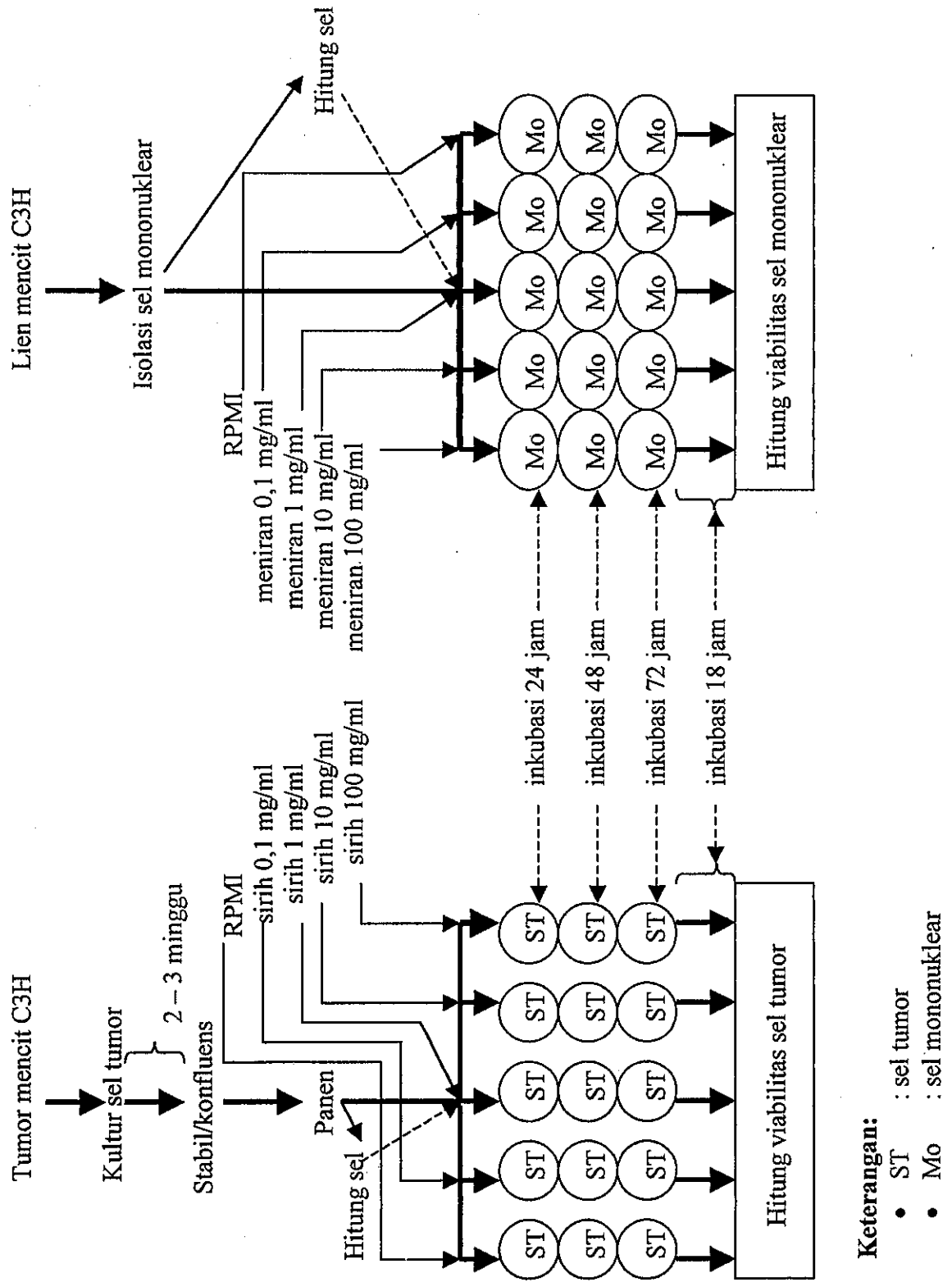
Adalah persentase sel tumor yang hidup dibandingkan dengan jumlah total sel tumor yang hidup dan yang mati, yang dihitung dengan metode eksklusi *trypan blue* menggunakan bilik hitung *Neubauer Improved*.

- Kelompok perlakuan:

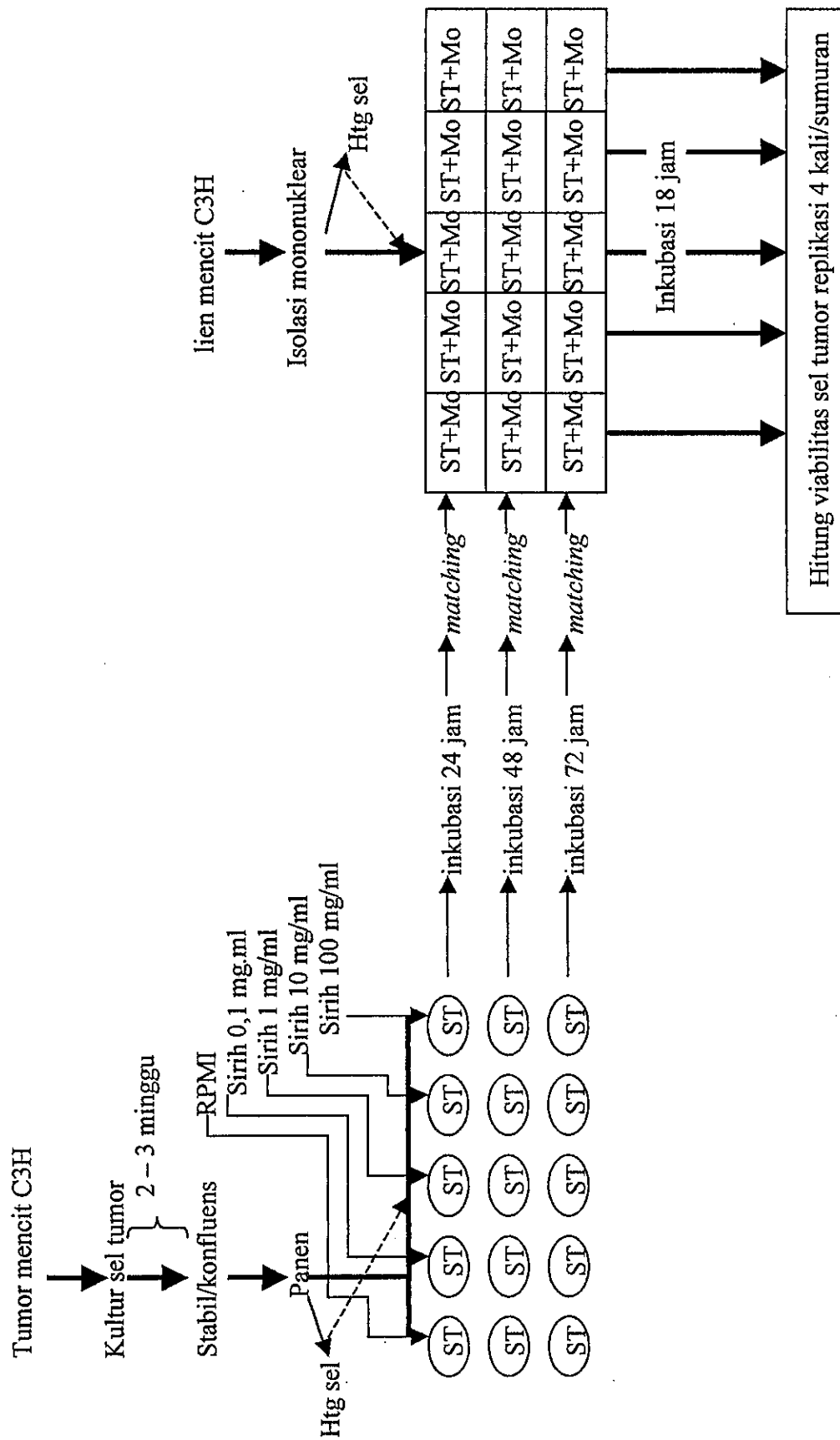
Adalah kelompok perlakuan kombinasi dosis minimal dan supra-minimal yang dikelompokkan menjadi 9 kelompok perlakuan sesuai dengan kelompok sampel.

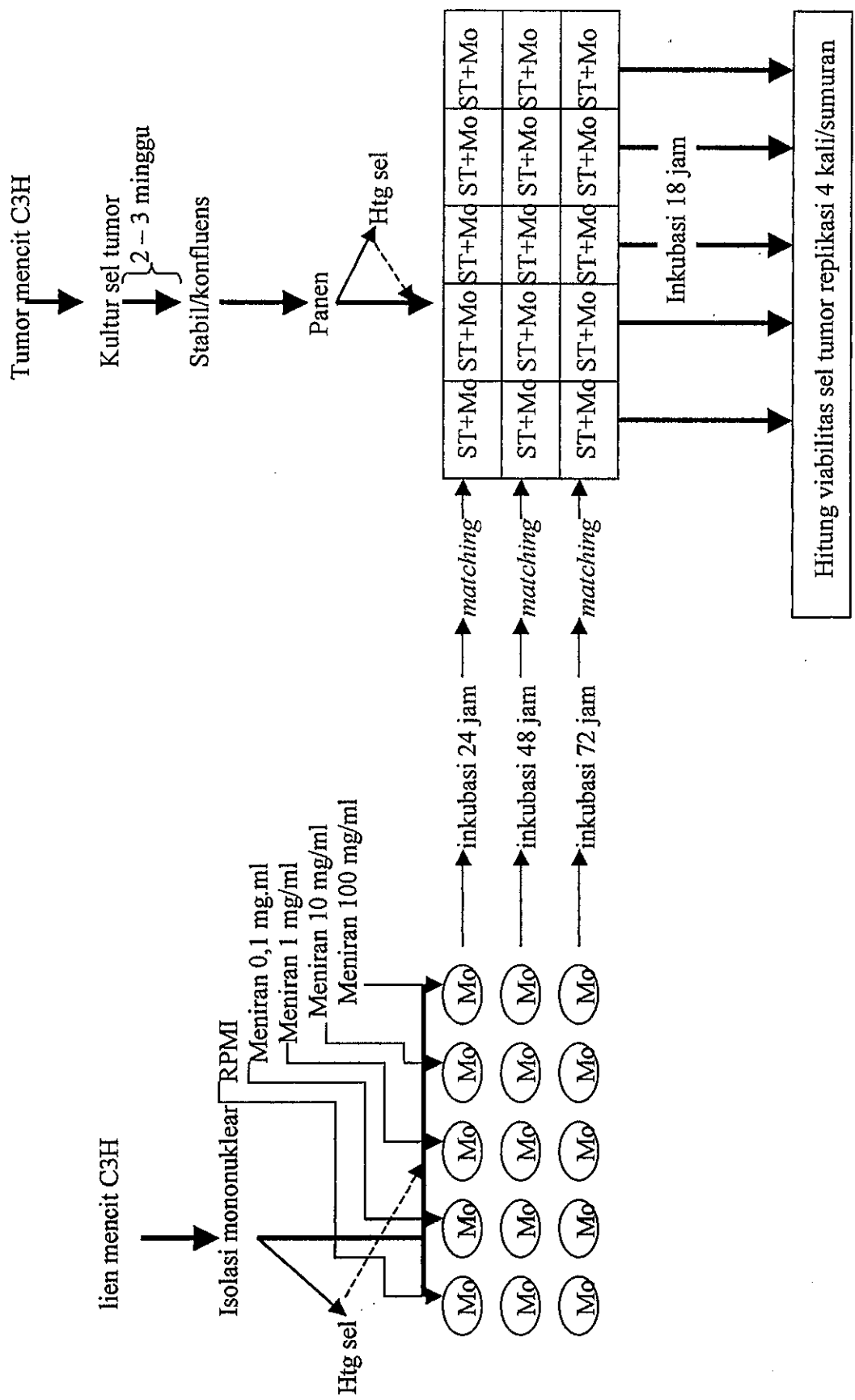
4.8. Alur Kerja

4.8.1. Penelitian Pendahuluan Pemaparan Langsung Ekstrak

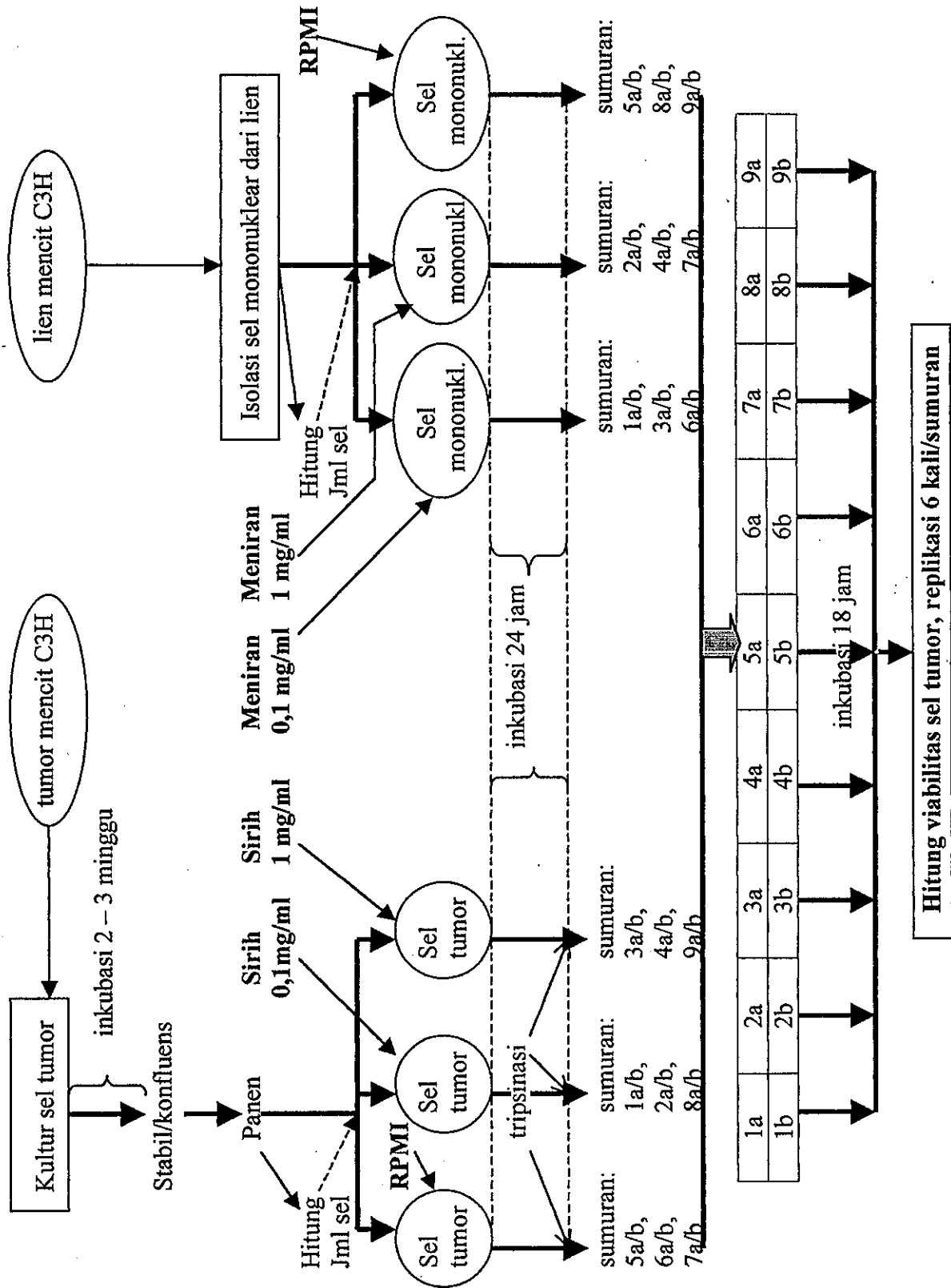


4.8.2. Penelitian Pendahuluan Pemaparan Tunggal Ekstrak





4.8.3. Penelitian Utama Pemaparan Kombinasi Ekstrak



1a	2a	3a	4a	5a	6a	7a	8a	9a
1b	2b	3b	4b	5b	6b	7b	8b	9b

4.9. Pemeriksaan

Pemeriksaan Viabilitas Sel Tumor Menggunakan Metode Eksklusi *Trypan Blue*^{67,69}

- Setelah inkubasi 18 jam, dilakukan pemeriksaan dan penilaian viabilitas sel tumor menggunakan metode eksklusi *trypan blue*.
- Setiap sumuran akan diperiksa 6 kali replikasi, dengan cara meneteskan satu tetes larutan tripsin-EDTA, kemudian dibuat turbulensi dengan pipet *Pasteur* steril.
- Periksa di bawah mikroskop inversi untuk melihat kesempurnaan pelepasan sel tumor yang *adherent* di dasar sumuran. Bila belum tampak soliter, teruskan turbulensi secukupnya.
- Setelah gambaran sel tumor menjadi soliter, yang ditandai dengan perubahan bentuk sel tumor menjadi bulat dan soliter serta akan ikut bergoyang apabila *multi-well plate* digoyang, diambil satu tetes suspensi sel dari tiap sumuran dan diletakkan ke dalam botol *bijou* kecil.
- Tambahkan satu tetes *trypan blue* yang dilarutkan dalam PBS, dan tetesan hanya berasal dari mulut pipet saja. Perbandingan suspensi tumor dengan larutan *trypan blue* adalah 1 : 1. Dengan demikian telah dilakukan pengenceran sebanyak 2 kali.
- Yakinkan suspensi sel dan larutan *trypan blue* sudah tercampur rata dengan membuat turbulensi halus dengan pipet *Pasteur*.
- Campurkan dan tunggu selama satu menit.

- Campurkan lagi dan pindahkan secara hati-hati suspensi sel yang sudah tercampur *trypan blue* ke bilik hitung. Teteskan satu tetes saja pada tepi *coverslip*, dan biarkan suspensi masuk ke bawah *coverslip* secara kapilarisasi.
- Sel yang mati akan tercatat oleh *trypan blue*, berbeda dengan sel yang hidup, tidak tercatat oleh *trypan blue*. Proporsi sel yang tidak tercatat biru (sel hidup) dan seluruh sel baik sel yang tidak tercatat biru (sel hidup) dan sel yang tercatat biru (sel mati) menunjukkan viabilitas populasi sel yang diperiksa.
- Cara penghitungan:

misalnya total volume suspensi sel = 7 ml

hitung sel pada 4 bujursangkar di setiap pojok bilik hitung *Neubauer Improved*, tidak tercatat biru = 320, tercatat biru = 80. Berarti ada 320/4 sel yang hidup dan 80/4 sel yang mati. Persentase viabilitas :

$$\frac{80 \times 100\%}{(80 + 20)} = 80 \%$$

Konsentrasi sel total dalam suspensi sel yang dihitung = $100 \times 10^4/\text{ml}$.

Konsentrasi sel hidup dalam suspensi sel yang dihitung = $80 \times 10^4/\text{ml}$ atau $8 \times 10^5/\text{ml}$.

Konsentrasi sel hidup dalam suspensi sel yang sesungguhnya = $2 \times 8 \times 10^5/\text{ml} = 1,6 \times 10^6/\text{ml}$.

Jumlah total sel hidup dalam suspensi sel yang sesungguhnya = $7 \times 1,6 \times 10^6/\text{ml} = 11,2 \times 10^6/\text{ml}$.

4.10. Analisis Data

Data hasil penelitian diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Data dari kelompok-kelompok perlakuan pada penelitian ini dianalisis normalitasnya dengan uji *Kolmogorov-Smirnov* dan *Shapiro-Wilk*. Untuk data yang mempunyai distribusi tidak normal, dilakukan analisis nonparametrik dengan uji *Kruskal-Wallis* untuk melihat adanya perbedaan pada kelima kelompok perlakuan. Besarnya perbedaan masing-masing kelompok perlakuan dianalisis lebih lanjut dengan uji *Mann-Whitney U*. Untuk data yang mempunyai distribusi normal, dilakukan analisis parametrik uji *ANOVA* untuk melihat perbedaan pada kelompok-kelompok perlakuan. Besarnya perbedaan masing-masing kelompok perlakuan dianalisis lebih lanjut dengan uji *Post Hoc Tukey* oleh karena varian datanya homogen. Semua analisis statistik dilakukan dengan menggunakan program komputer *SPSS 10.01 for Windows*. Nilai signifikansi penelitian ini adalah apabila variabel yang dianalisis memiliki nilai $p < 0,05$.

BAB 5

HASIL PENELITIAN

Untuk mempermudah pembahasan, maka hasil penelitian disampaikan dalam beberapa bagian sesuai dengan tahap penelitian yang dilakukan, yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama.

5.1. Penelitian Pendahuluan

5.1.1. Penelitian eksplorasi pengaruh langsung paparan tunggal ekstrak terhadap viabilitas sel tumor dan sel mononuklear

Viabilitas sel tumor tertinggi terdapat pada setiap kelompok kontrol baik pada kelompok waktu paparan 24 jam, 48 jam, atau 72 jam. Peningkatan dosis ekstrak sirih diikuti dengan penurunan viabilitas sel tumor dan viabilitas sel tumor terendah terdapat pada setiap kelompok perlakuan ekstrak sirih dosis 100 mg/ml, baik pada kelompok waktu paparan 24 jam, 48 jam, atau 72 jam. Uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan adanya perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna di pada ketiga kelompok waktu paparan ($p = 0,028$). Sedangkan uji *Mann-Whitney* menunjukkan adanya perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna antara kelompok waktu paparan 24 jam dengan kelompok waktu paparan 72 jam ($p = 0,022$) dan kelompok waktu paparan 48 jam dengan kelompok waktu paparan 72 jam ($p = 0,020$).

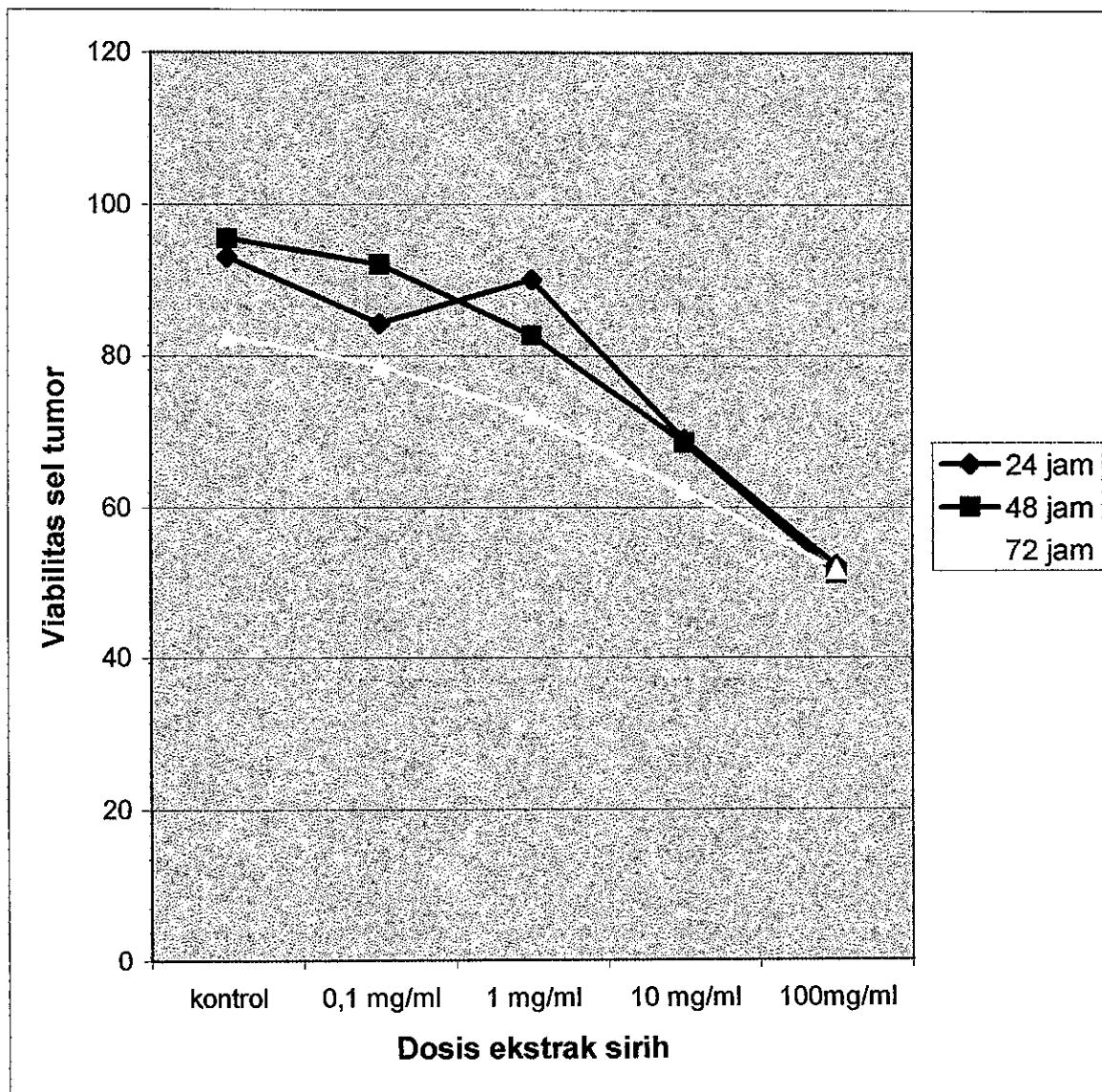
Tabel 2. Viabilitas sel tumor (%) yang dipapari ekstrak sirih

Kelompok Perlakuan		N	Rata-rata	SD
Waktu	dosis			
24 jam	Kontrol	6	93,10	7,87
	0,1 mg/ml	6	84,27	10,03
	1 mg/ml	6	90,10	2,70
	10 mg/ml	6	68,88	4,69
	100 mg/ml	6	52,33	5,23
48 jam	Kontrol	6	95,50	3,95
	0,1 mg/ml	6	92,10	4,02
	1 mg/ml	6	82,73	6,21
	10 mg/ml	6	68,50	3,42
	100 mg/ml	6	51,22	2,69
72 jam	Kontrol	6	82,48	2,61
	0,1 mg/ml	6	78,66	2,67
	1 mg/ml	6	72,09	7,49
	10 mg/ml	6	62,37	5,77
	100 mg/ml	6	51,77	4,19

Kruskal-Wallis: p = 0,028

Secara umum, tampak bahwa peningkatan dosis ekstrak sirih diikuti dengan penurunan viabilitas sel tumor pada seluruh kelompok waktu pemaparan. Namun pada kelompok waktu pemaparan ekstrak sirih 24 jam, tampak penurunan viabilitas sel tumor pada pemaparan dosis 0,1 mg/ml, namun viabilitas sel tumor mengalami peningkatan pada pemaparan ekstrak sirih dosis 1 mg/ml. Viabilitas sel tumor kembali mengalami penurunan pada pemaparan dosis ekstrak sirih 10 mg/ml dan semakin menurun pada pemaparan dosis 100 mg/ml. Uji *ANOVA* terhadap viabilitas sel tumor pada kelompok waktu pemaparan 24 jam menunjukkan adanya perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna pada kelima kelompok dosis ($p = 0,0001$). Sedangkan uji *Tukey HSD* menunjukkan bahwa peningkatan viabilitas sel tumor pada pemaparan ekstrak sirih dosis 1 mg/ml tidak

menunjukkan perbedaan yang bermakna dibandingkan dengan kelompok pemaparan kontrol ($p = 0,954$) maupun dosis 0,1 mg/ml ($p = 0,563$).



Gambar 6. Viabilitas sel tumor yang dipapari ekstrak sirih

UPT-POSTAK UNDIP

Viabilitas sel mononuklear tertinggi, yaitu 92,26%, terdapat pada kelompok pemaparan ekstrak meniran dosis 100 mg/ml dengan waktu pemaparan 48 jam. Pada umumnya, viabilitas sel mononuklear mengalami sedikit penurunan sebelum kemudian meningkat pada pemaparan ekstrak meniran dosis 100 mg/ml. Viabilitas sel mononuklear pada umumnya lebih tinggi pada pemaparan ekstrak meniran dosis 100 mg/ml apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol, kecuali pada kelompok waktu pemaparan 24 jam.

Tabel 3. Viabilitas sel mononuklear (%) yang dipapari ekstrak meniran

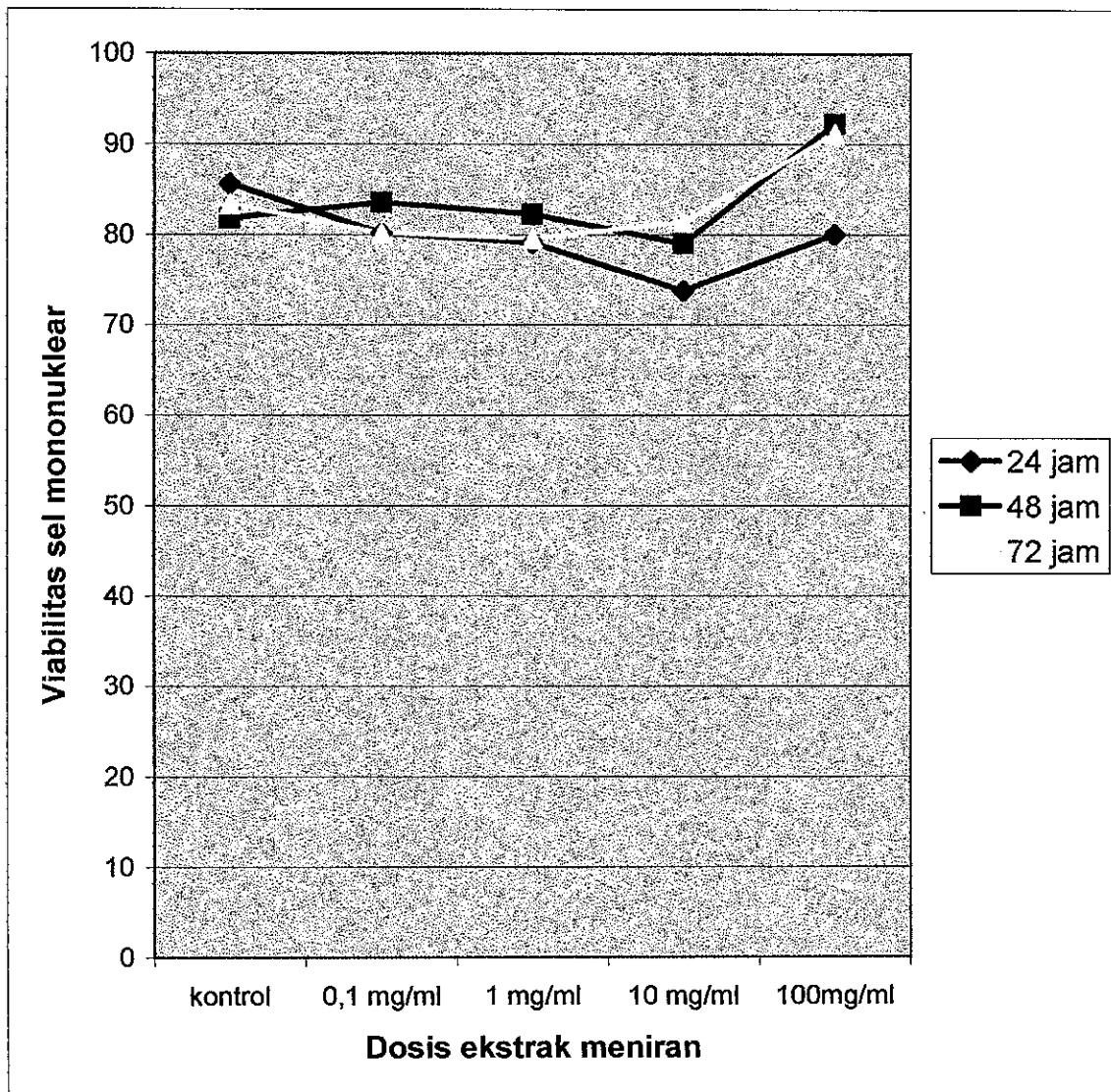
Kelompok Perlakuan		N	Rata-rata	SD
Waktu	dosis			
24 jam	Kontrol	6	85,65	4,80
	0,1 mg/ml	6	80,17	2,11
	1 mg/ml	6	79,02	3,78
	10 mg/ml	6	73,80	6,09
	100 mg/ml	6	80,08	8,69
48 jam	Kontrol	6	81,80	2,70
	0,1 mg/ml	6	83,57	7,25
	1 mg/ml	6	82,27	6,06
	10 mg/ml	6	79,06	3,13
	100 mg/ml	6	92,26	2,12
72 jam	Kontrol	6	83,34	3,39
	0,1 mg/ml	6	80,17	4,19
	1 mg/ml	6	79,59	7,39
	10 mg/ml	6	81,42	2,92
	100 mg/ml	6	91,13	2,69

ANOVA: p = 0,004

Uji *ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan viabilitas sel mononuklear yang bermakna pada ketiga kelompok waktu pemaparan ($p = 0,004$). Sedangkan uji *Tukey HSD* menunjukkan perbedaan viabilitas sel mononuklear yang bermakna antara kelompok waktu pemaparan 24 jam dengan kelompok waktu

pemaparan 48 jam (0,006) dan kelompok waktu pemaparan 72 jam ($p = 0,026$). Perbedaan viabilitas sel mononuklear antara kelompok waktu pemaparan 48 jam kelompok waktu pemaparan dengan 72 jam tidak bermakna ($p = 0,862$).

Secara umum, viabilitas sel mononuklear menunjukkan sedikit penurunan pada pemaparan ekstrak meniran dosis yang lebih besar namun menunjukkan sedikit peningkatan pada pemaparan ekstrak meniran dosis 100 mg/ml. Penurunan viabilitas sel mononuklear paling rendah terdapat pada kelompok pemaparan ekstrak meniran dosis 10 mg/ml dengan waktu pemaparan 24 jam. Uji *ANOVA* pada kelompok waktu pemaparan 24 jam menunjukkan adanya perbedaan viabilitas sel mononuklear yang bermakna pada kelima kelompok dosis ($p = 0,022$). Sedangkan uji *Tukey HSD* menunjukkan perbedaan viabilitas sel mononuklear yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok pemaparan ekstrak meniran dosis 10 mg/ml ($p = 0,009$). Tidak didapatkan perbedaan viabilitas sel mononuklear yang bermakna pada kelompok pemaparan ekstrak meniran dosis 100 mg/ml apabila dibandingkan dengan seluruh kelompok dosis.



Gambar 7. Viabilitas sel mononuklear yang dipapari ekstrak meniran

5.1.1. Penelitian eksplorasi pengaruh pemaparan tunggal ekstrak sirih atau ekstrak meniran saja terhadap viabilitas sel tumor melalui aktivitas sel mononuklear

Pada penelitian pendahuluan eksplorasi pengaruh pemaparan tunggal ekstrak sirih saja terhadap viabilitas sel tumor melalui aktivitas sel mononuklear didapatkan viabilitas sel tumor tertinggi pada kelompok kontrol yang tidak dipapari ekstrak sirih dan terendah pada kelompok yang dipapari ekstrak sirih 100 mg/ml baik pada kelompok 24 jam, 48 jam, maupun 72 jam. Setelah dilakukan analisis dengan uji *Kruskal-Wallis*, didapatkan perbedaan bermakna pada ketiga kelompok waktu pemaparan ($p = 0,004$). Perbedaan viabilitas sel tumor di antara masing-masing kelompok waktu pemaparan dianalisis dengan uji *Mann Whitney*. Tidak terdapat perbedaan bermakna antara viabilitas sel tumor pada kelompok waktu 24 jam dengan 48 jam ($p = 0,261$), namun kelompok waktu 24 jam berbeda bermakna dengan kelompok waktu 72 jam ($p = 0,003$). Di lain pihak, kelompok waktu 48 jam mempunyai perbedaan bermakna dengan kelompok waktu 72 jam ($p = 0,013$). Tampak semakin lama waktu paparan ekstrak sirih terhadap sel tumor melalui aktivitas sel mononuklear, viabilitas sel tumor akan semakin menurun.

Tabel 4. Viabilitas sel tumor (%) yang dipapari ekstrak sirih melalui aktivitas sel mononuklear

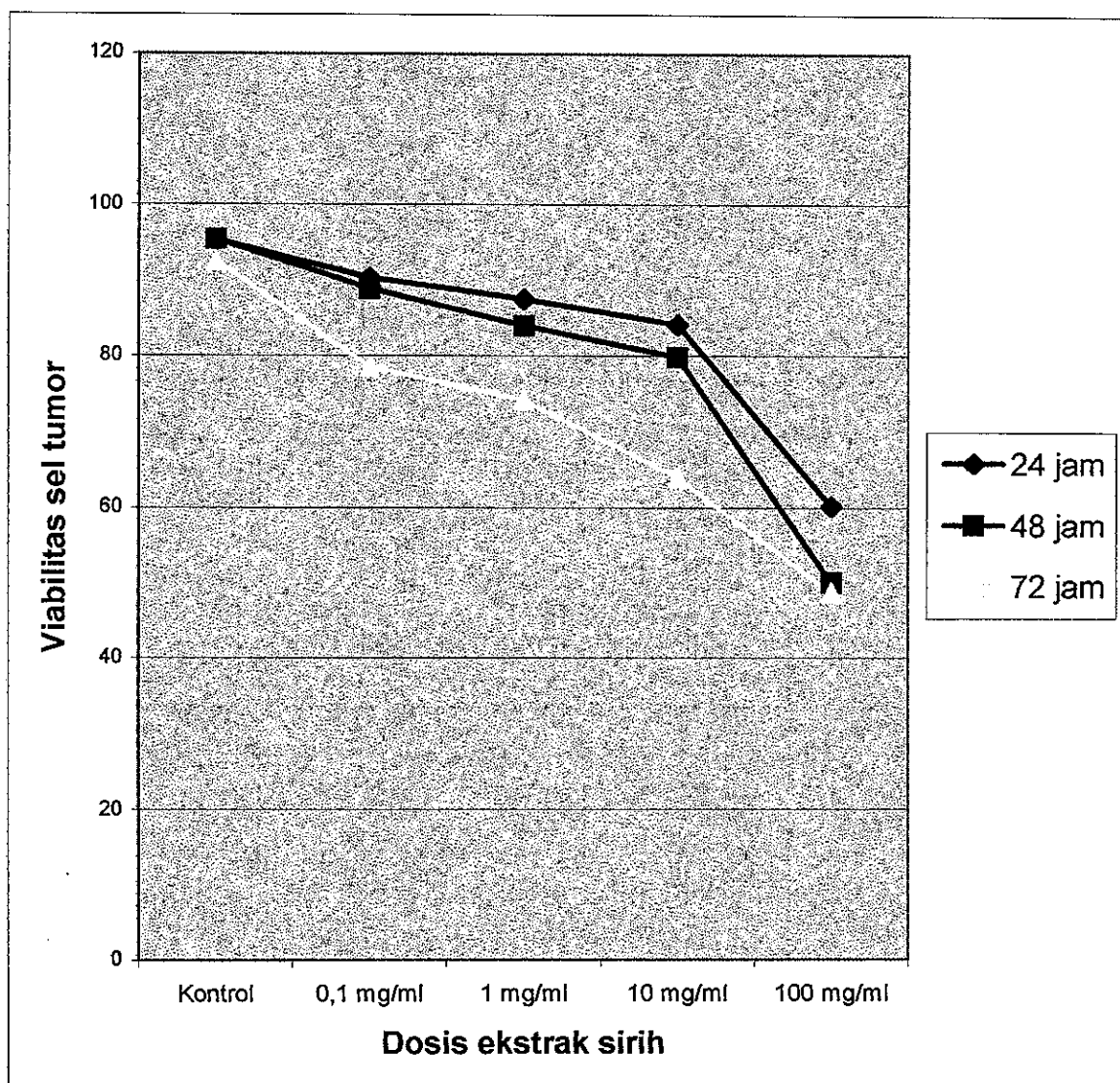
Kelompok Perlakuan		N	Rata-rata	SD
waktu	dosis			
24 jam	Kontrol	6	95,38	3,85
	0,1 mg/ml	6	90,28	3,28
	1 mg/ml	6	87,47	2,58
	10 mg/ml	6	84,17	6,40
	100 mg/ml	6	60,20	9,90
48 jam	Kontrol	6	95,47	3,76
	0,1 mg/ml	6	88,85	2,53
	1 mg/ml	6	83,97	3,56
	10 mg/ml	6	79,82	1,99
	100 mg/ml	6	50,07	9,37
72 jam	Kontrol	6	92,60	3,54
	0,1 mg/ml	6	78,50	2,58
	1 mg/ml	6	74,10	5,31
	10 mg/ml	6	64,00	4,55
	100 mg/ml	6	48,73	6,65

Kruskal Wallis: p = 0,004

Peningkatan dosis ekstrak sirih diikuti dengan penurunan viabilitas sel tumor pada masing-masing kelompok waktu pemaparan. Viabilitas sel tumor terendah di antara kelompok waktu pemaparan terdapat pada kelompok waktu pemaparan 72 jam. Untuk menentukan perbedaan viabilitas sel tumor pada kelima kelompok dosis ekstrak sirih yang dipaparkan dalam waktu 24 jam, dilakukan uji *Kruskal-Wallis*. Uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan adanya perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna pada kelima kelompok perlakuan dosis pada kelompok waktu 24 jam ($p = 0,0001$). Sedang uji *Mann Whitney* pada kelompok waktu pemaparan 24 jam menunjukkan perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna antara kelompok dosis kontrol dengan seluruh kelompok dosis lainnya. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa kelompok dosis terkecil yang sudah

menunjukkan perbedaan viabilitas sel tumor secara bermakna dengan kelompok kontrol adalah kelompok dosis 0,1 mg/ml ($p = 0,045$). Selanjutnya dapat disimpulkan terdapat perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna antara sel tumor yang dipapari ekstrak sirih apabila dibandingkan dengan sel tumor yang tidak dipapari ekstrak sirih; atau dengan kata lain, hipotesis minor ke-1 diterima.

UPT-PUSTAK-UNDIP



Gambar 8. Viabilitas sel tumor (%) yang dipapari ekstrak sirih melalui aktivitas sel mononuklear

Pada penelitian pendahuluan eksplorasi pengaruh pemaparan tunggal ekstrak meniran saja terhadap viabilitas sel tumor melalui aktivitas sel mononuklear, didapatkan viabilitas sel tumor tertinggi pada kelompok kontrol dan terendah pada kelompok yang dipapari ekstrak meniran dosis 100 mg/ml baik pada kelompok 24 jam, 48 jam, maupun 72 jam. Uji *Kruskal-Wallis* tidak menunjukkan adanya perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna pada ketiga kelompok waktu pemaparan ($p = 0,617$).

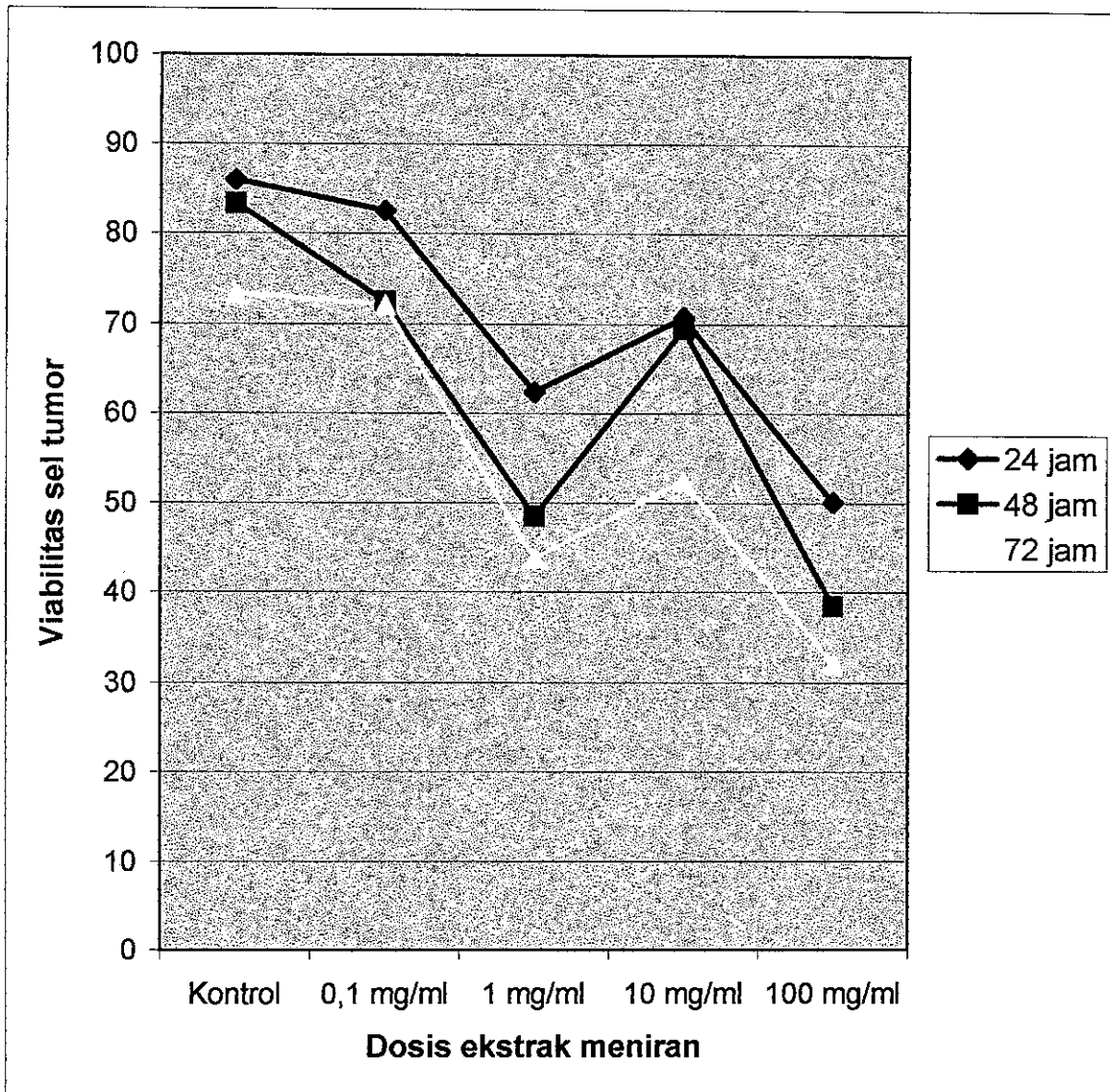
Tabel 5. Viabilitas sel tumor (%) yang dipapari ekstrak meniran melalui aktivitas sel mononuklear

Kelompok Perlakuan		N	Rata-rata	SD
waktu	dosis			
24 jam	Kontrol	6	85,97	4,47
	0,1 mg/ml	6	82,55	6,33
	1 mg/ml	6	62,49	5,89
	10 mg/ml	6	70,72	7,97
	100 mg/ml	6	50,11	15,85
48 jam	Kontrol	6	83,30	4,94
	0,1 mg/ml	6	72,46	15,59
	1 mg/ml	6	48,52	11,87
	10 mg/ml	6	69,50	10,81
	100 mg/ml	6	38,49	7,86
72 jam	Kontrol	6	73,34	7,96
	0,1 mg/ml	6	72,04	6,19
	1 mg/ml	6	43,77	11,53
	10 mg/ml	6	52,43	10,09
	100 mg/ml	6	32,07	10,63

Kruskal-Wallis: p = 0,617

Uji *Kruskal-Wallis* pada kelompok waktu pemaparan 24 jam menunjukkan adanya perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna pada kelima kelompok dosis ($p = 0,0001$). Sedangkan uji *Mann-Whitney* pada kelompok waktu

pemaparan 24 jam tidak menunjukkan adanya perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna antara kelompok pemaparan kontrol dengan kelompok pemaparan ekstrak meniran dosis 0,1 mg/ml ($p = 0,575$). Kelompok pemaparan kontrol menunjukkan perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna dengan kelompok pemaparan ekstrak meniran dosis 1 mg/ml ($p = 0,002$), dosis 10 mg/ml ($p = 0,002$), dan dosis 100 mg/ml ($p = 0,002$). Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa kelompok dosis terkecil yang sudah menunjukkan perbedaan viabilitas sel tumor secara bermakna dengan kelompok kontrol adalah kelompok dosis 1 mg/ml. Selanjutnya dapat disimpulkan terdapat perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna antara sel tumor yang dipapari ekstrak meniran apabila dibandingkan dengan sel tumor yang tidak dipapari ekstrak meniran, atau dengan kata lain, hipotesis minor ke-2 diterima.



Gambar 9. Viabilitas sel tumor (%) yang dipapari ekstrak meniran melalui aktivitas sel mononuklear

5.1. Penelitian Utama: Penelitian pengaruh pemaparan kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih terhadap viabilitas sel tumor melalui aktivitas sel mononuklear

Penelitian utama ini bertujuan untuk membuktikan ada atau tidak adanya penurunan viabilitas sel tumor yang lebih bermakna pada sel tumor yang dipapari kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih melalui aktivitas sel mononuklear dibandingkan dengan yang dipapari ekstrak meniran atau ekstrak sirih secara tunggal dan yang tidak dipapari ekstrak meniran maupun ekstrak sirih, dengan cara membandingkan perbedaan viabilitas sel tumor pada sembilan kelompok perlakuan. Kelompok-kelompok perlakuan ini terdiri dari kelompok perlakuan kombinasi pemaparan ekstrak meniran dan ekstrak sirih, perlakuan kontrol, dan perlakuan tunggal pemaparan ekstrak meniran atau ekstrak sirih saja. Dosis yang dipilih dari masing-masing ekstrak adalah dosis terkecil (0,1 mg/ml), selanjutnya disebut dosis minimal, dan dosis terkecil kedua (1 mg/ml), selanjutnya disebut dosis supra-minimal. Pemilihan dosis ini berdasarkan pada hasil penelitian pendahuluan, di mana dosis terkecil yang mempunyai viabilitas yang berbeda secara bermakna dengan kelompok kontrol untuk ekstrak sirih adalah 0,1 mg/ml, sedangkan untuk ekstrak meniran adalah 1 mg/ml. Khusus untuk ekstrak meniran, selain dosis 1 mg/ml, dosis 0,1 mg/ml tetap diteliti meskipun tidak mempunyai perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol untuk melihat efek kombinasinya dengan ekstrak sirih, sehingga setiap kemungkinan efek interaksi yang timbul dari pemaparan kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih tidak terlewatkan. Waktu paparan ekstrak yang digunakan adalah waktu tersingkat yaitu 24 jam.

Viabilitas sel tumor tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan kontrol, di mana baik sel tumor maupun sel mononuklear tidak dipapari oleh ekstrak ($mean = 80,40\%$), dan terendah pada kelompok perlakuan kombinasi pemaparan kombinasi ekstrak sirih dosis supra-minimal dan ekstrak meniran dosis supra-minimal ($mean = 55,44\%$). Setelah dianalisis dengan uji *ANOVA*, didapatkan perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna pada kesembilan kelompok perlakuan ($p = 0,0001$). Tabel berikut menunjukkan viabilitas sel tumor pada beberapa kelompok perlakuan pemaparan ekstrak meniran dan ekstrak sirih

Tabel 6. Viabilitas sel tumor (%) pada beberapa kelompok perlakuan pemaparan ekstrak meniran dan ekstrak sirih

Kelompok Perlakuan	N	Minimum	Maksimum	Rata-rata	SD
Tsi(m)+MoMe(m)	12	58.50	69.40	64.67	3.4503
Tsi(m)+MoMe(sm)	12	55.00	69.80	64.67	4.7839
Tsi(sm)+MoMe(m)	12	57.30	70.00	62.61	3.9403
Tsi(sm)+MoMe(sm)	12	46.30	61.00	55.44	4.4533
TK+MoK	12	73.30	88.00	80.40	4.5455
TK+MoMe(m)	12	58.90	74.30	67.20	5.3476
TK+MoMe(sm)	12	58.30	73.20	65.94	4.0818
Tsi(m)+MoK	12	61.50	72.00	66.21	3.4278
Tsi(sm)+MoK	12	57.60	73.08	64.63	4.886

ANOVA: p = 0,0001

Pada uji *Post Hoc Tukey* didapatkan perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna antara kelompok pemaparan ekstrak sirih dosis supra-minimal yang dikombinasikan dengan sel mononuklear yang dipapari ekstrak meniran dosis supra-minimal, dengan seluruh kelompok perlakuan. Maka dapat disimpulkan

bahwa viabilitas sel tumor pada kelompok pemaparan kombinasi ekstrak sirih dosis supra-minimal dan ekstrak meniran dosis supra-minimal lebih rendah dibandingkan dengan seluruh kelompok perlakuan baik kelompok perlakuan kontrol maupun kelompok perlakuan pemaparan tunggal ekstrak sirih maupun ekstrak meniran.

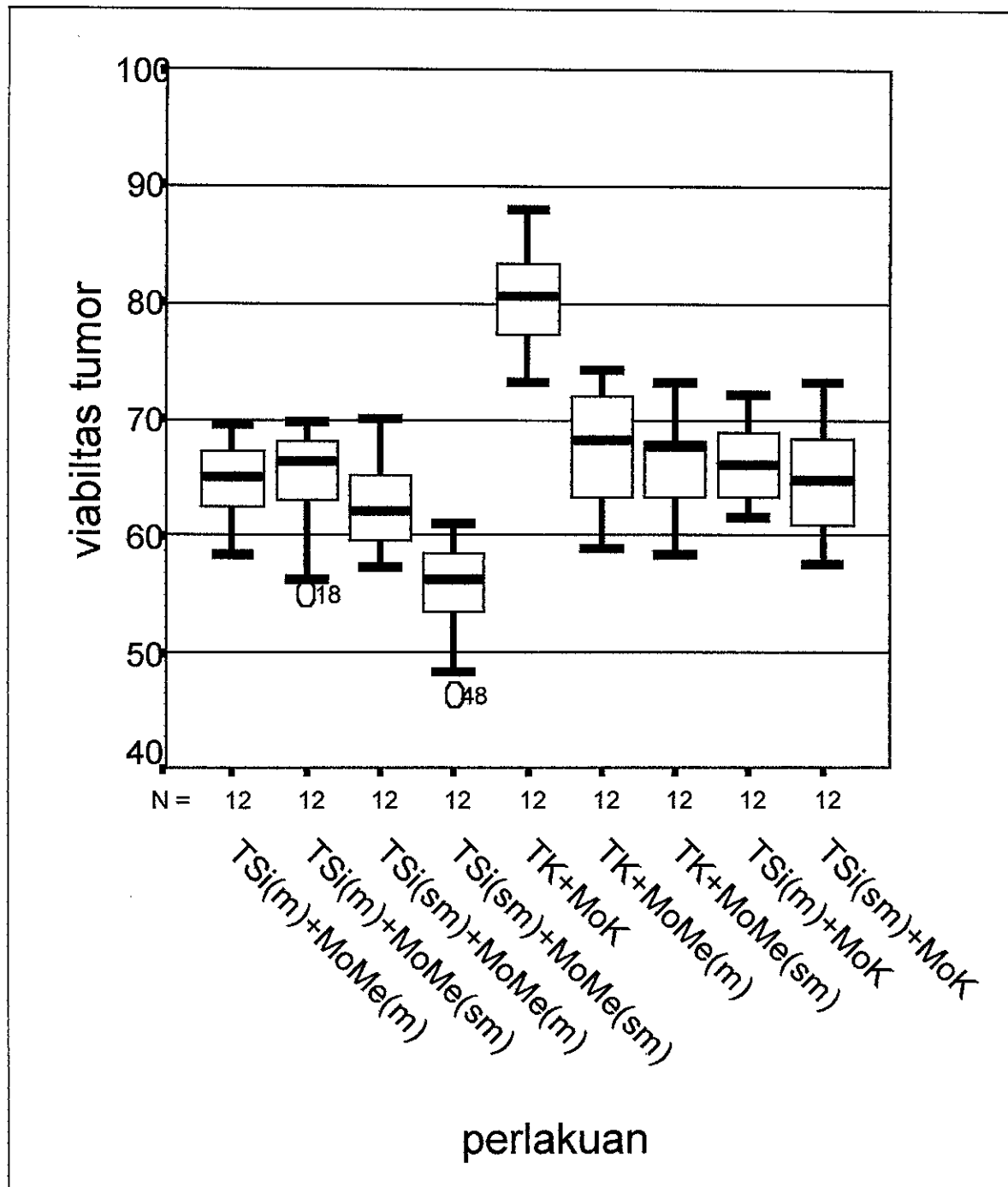
Kelompok perlakuan kontrol mempunyai perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna dengan seluruh kelompok perlakuan. Dengan demikian maka dapat disimpulkan bahwa viabilitas sel tumor pada kelompok tanpa paparan ekstrak sirih dan ekstrak meniran lebih tinggi dibandingkan dengan seluruh kelompok perlakuan. Hal lain yang dapat disimpulkan adalah bahwa viabilitas sel tumor pada kelompok perlakuan kontrol lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan pemaparan tunggal ekstrak sirih atau ekstrak meniran saja

Tidak didapatkan perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna antara kelompok perlakuan pemaparan tunggal ekstrak sirih atau ekstrak meniran saja dengan kelompok perlakuan pemaparan kombinasi ekstrak sirih dosis minimal dengan ekstrak meniran dosis minimal. Selain itu, viabilitas sel tumor pada kelompok perlakuan pemaparan tunggal ekstrak sirih atau ekstrak meniran saja tidak berbeda secara bermakna apabila dibandingkan dengan kelompok perlakuan pemaparan kombinasi ekstrak sirih dosis minimal dengan ekstrak meniran dosis supra-minimal. Demikian pula pada kelompok perlakuan pemaparan tunggal ekstrak sirih atau ekstrak meniran saja yang dibandingkan dengan kelompok perlakuan pemaparan kombinasi ekstrak sirih dosis supra-minimal dengan ekstrak

meniran dosis minimal, tidak didapatkan perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna.

Viabilitas sel tumor pada kelompok perlakuan pemaparan kombinasi ekstrak sirih dosis minimal dan ekstrak meniran dosis minimal ternyata tidak berbeda secara bermakna dibandingkan dengan kelompok perlakuan pemaparan kombinasi ekstrak sirih dosis minimal dengan ekstrak meniran dosis supra-minimal. Demikian pula bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan pemaparan kombinasi ekstrak sirih dosis supra-minimal dengan ekstrak meniran dosis minimal, kelompok ini tidak mempunyai perbedaan yang bermakna.

Dari hasil-hasil analisis di atas, dapat disimpulkan terdapat perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna pada sel tumor yang dipapari kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih apabila dibandingkan dengan sel tumor yang dipapari ekstrak meniran atau ekstrak sirih saja maupun apabila dibandingkan dengan sel tumor yang tidak dipapari ekstrak meniran atau ekstrak sirih. Dengan kata lain, hipotesis minor ke-3 dan hipotesis minor ke-4 diterima.



Gambar 10. Viabilitas sel tumor (%) pada beberapa kelompok perlakuan pemaparan ekstrak meniran dan ekstrak sirih

BAB 6

PEMBAHASAN

Alur pembahasan disesuaikan dengan alur hasil penelitian dan hipotesis yang telah dibuktikan sehingga pengaruh pemaparan ekstrak meniran dan ekstrak sirih terhadap viabilitas sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* dapat dibahas sebagai berikut:

6.1. Penelitian Pendahuluan

6.1.1. Penelitian eksplorasi pengaruh langsung pemaparan tunggal ekstrak terhadap viabilitas sel tumor dan sel mononuklear

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemaparan ekstrak sirih pada sel tumor, secara langsung (tanpa aktivitas sel mononuklear), dapat menurunkan viabilitas sel tumor secara bermakna. Dosis ekstrak sirih yang lebih besar menurunkan viabilitas sel tumor lebih besar pula. Lamanya waktu pemaparan ekstrak sirih terhadap sel tumor juga mempengaruhi viabilitas sel tumor. Semakin lama sel tumor dipapari ekstrak sirih, semakin kecil viabilitas sel tumornya. Hasil ini menunjukkan bahwa selain aktivitas bakterisid, ekstrak sirih juga mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel tumor. Mekanisme kerja sitotoksik ekstrak sirih terhadap sel tumor belum banyak diketahui, namun mekanisme bakterisidnya sudah cukup banyak diteliti. Kemungkinan adanya persamaan mekanisme kerja sitotoksik dan bakterisid ekstrak sirih dapat ditelaah lebih lanjut.

Aktivitas bakterisid ekstrak sirih terhadap beberapa jenis bakteri *Streptococcus* telah diteliti oleh beberapa peneliti. Suwondo, dkk (1992) membuktikan adanya aktivitas bakterisid ekstrak air-alkohol sirih terhadap *Streptococcus mutans* pada cakram kertas dengan konsentrasi inhibisi minimal 0,4 mg/cakram. Aktivitas ekstrak air-alkohol sirih tersebut adalah yang paling menonjol setelah ekstrak heksannya.⁶ Sedangkan Sundari, dkk (1992) menyimpulkan bahwa minyak daun sirih kadar 0,25% dapat menyebabkan kematian 99,92% bakteri *Streptococcus alfa* yang dikultur dalam medium agar darah.⁷

Daun sirih mengandung 0,7 – 2,6% minyak atsiri yang 60 – 80%-nya terdiri dari fenilpropana (alilbrenkatekin).^{6, 55} Fenilpropana merupakan polifenol yang juga diketahui mempunyai aktivitas inhibitor glikosilasi. Nakahara dkk dalam penelitiannya membuktikan bahwa polimer polifenol OTF10 menghambat aktivitas enzim yang mensintesis glukon, yaitu *glucosyltransferase 1 (GTase-1)* pada *Streptococcus sobrinus 6715*.⁹

Temuan-temuan tersebut menunjukkan bahwa daun sirih mempunyai daya hambat glikosilasi melalui penghambatan *GTase-1* dan mempunyai aktivitas daya bunuh terhadap bakteri. Sel tumor adalah transformasi ke arah keganasan dari sel normal, dimana sel tumor seharusnya dikenali sebagai benda asing oleh sistem imun tubuh. Akan tetapi pada beberapa hal, sel tumor mempunyai kemampuan menyembunyikan keasingannya dengan cara melindungi antigen asingnya dari pengawasan sistem imun. Glikoprotein adalah senyawa normal yang ada pada permukaan sel sebagai suatu kerangka yang membentuk sel sekaligus menjaga

elastisitas sel. Pada beberapa transformasi keganasan, seperti pada *Adenocarcinoma mammae*, glikosilasi mengalami overekspresi sehingga glikoprotein yang dikirimkan ke permukaan sel jumlahnya berlebihan. Kuantitas glikoprotein yang berlebihan ini membentuk suatu struktur *rigid* yang cukup efektif menghalangi pengenalan antigen permukaan sel tumor oleh sistem imun.^{1, 3, 16} Kemampuan polifenol yang terkandung dalam ekstrak sirih menghambat glikosilasi diduga mengakibatkan berkurangnya kuantitas glikoprotein permukaan sel tumor, sehingga aktivitasnya sebagai halangan terhadap sistem imun juga berkurang. Akibatnya, pengenalan sistem imun terhadap antigen permukaan sel tumor dapat meningkat dan selanjutnya sistem imun dapat melanjutkan aktivitasnya membunuh sel tumor.

Pemaparan ekstrak meniran secara umum meningkatkan viabilitas sel mononuklear. Peningkatan viabilitas sel mononuklear yang bermakna baru dicapai pada pemaparan ekstrak meniran dosis 100 mg/ml dan waktu pemaparan minimal 48 jam. Hal ini menunjukkan bahwa untuk meningkatkan viabilitas sel mononuklear, dibutuhkan tingkatan dosis dan waktu pemaparan tertentu. Aktivitas imunostimulan ekstrak meniran sudah cukup banyak diteliti. Beberapa parameter imunologis telah diteliti untuk membuktikan bahwa ekstrak meniran mempengaruhi beberapa komponen sistem imun spesifik maupun non-spesifik. Pada penelitian eksplorasi, diketahui bahwa paparan ekstrak meniran dalam berbagai dosis dan waktu terhadap sel mononuklear dapat meningkatkan viabilitas sel mononuklear pada dosis yang lebih tinggi (100 mg/ml). Meskipun pada dosis yang lebih kecil viabilitas sel mononuklear sempat menurun, namun kenaikan

yang cukup bermakna pada dosis 100 mg/ml sudah cukup menunjukkan aktivitas imunostimulan ekstrak meniran. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Maat S (1996) yang menyatakan bahwa pemberian peroral ekstrak meniran kepada mencit diantaranya dapat meningkatkan proliferasi sel limfosit T.¹⁰ Sehubungan dengan viabilitas sel mononuklear, diduga peningkatan proliferasi sel limfosit ini turut berperan meningkatnya viabilitas sel mononuklear karena dengan adanya peningkatan jumlah sel mononuklear yang baru, jumlah sel mononuklear yang hidup juga meningkat.

6.1.2. Penelitian eksplorasi pengaruh pemaparan tunggal ekstrak sirih atau ekstrak meniran saja terhadap viabilitas sel tumor melalui aktivitas sel mononuklear

Sejalan dengan hasil penelitian eksplorasi sebelumnya yang menunjukkan bahwa pemaparan ekstrak sirih dapat menurunkan viabilitas sel tumor tanpa melalui aktivitas sel mononuklear, ekstrak sirih juga menunjukkan efek sitotoksik yang sama terhadap sel tumor melalui aktivitas sel mononuklear. Pada penelitian eksploratif pengaruh langsung pemaparan ekstrak sirih terhadap sel *Adenocarcinoma mammae* secara *in vitro*, ekstrak sirih juga menunjukkan aktivitas sitotoksik pada dosis minimal sebesar 10 mg/ml. Hal ini dapat memperkuat daya sitotoksik ekstrak sirih apabila sel tumor ditemukan dengan sel mononuklear secara *in vitro*. Bila dibandingkan dengan pemaparan langsung (tanpa aktivitas sel mononuklear), aktivitas sel mononuklear diduga dapat memperkuat daya sitotoksik ekstrak sirih terhadap sel tumor. Hal ini ditunjukkan oleh dosis minimal yang dapat menurunkan viabilitas sel tumor secara bermakna

dibandingkan kelompok kontrol yang lebih kecil, yaitu sebesar 0,1 mg/ml. Dalam hal ini, sistem imun berperan langsung dalam membunuh sel tumor yang sudah dikenali antigen permukaannya, sementara di lain pihak, sel tumor sendiri sudah mengalami penurunan viabilitas akibat paparan ekstrak sirih sebelumnya. Jalur-jalur pencetus sinyal apoptosis lainnya dapat juga diduga berperan dalam hal ini. Pada jenis tumbuhan lain, Tan M.L, dkk membuktikan ekstrak *Pareskia corrugata* dapat membunuh sel kanker payudara secara efektif melalui jalur apoptosis dengan mengaktifkan *caspase-3* dan jalur *c-myc*.⁶⁹

Pemaparan ekstrak meniran secara umum dapat menurunkan viabilitas sel tumor melalui aktivitas sel mononuklear. Hal ini sejalan dengan penelitian eksplorasi sebelumnya yang menunjukkan bahwa ekstrak meniran dapat meningkatkan viabilitas sel mononuklear. Peningkatan viabilitas sel mononuklear menunjukkan adanya efek imunostimulan ekstrak meniran terhadap sel mononuklear. Daya sitotoksik sel mononuklear diduga ikut mengalami peningkatan sehingga dapat menurunkan viabilitas sel tumor secara bermakna. Pemaparan ekstrak meniran dosis 1 mg/ml selama 24 jam pada sel mononuklear sudah menunjukkan perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol, sehingga dosis 1 mg/ml adalah dosis terkecil ekstrak meniran yang sudah menunjukkan perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Maat S (1996), bahwa ekstrak meniran dapat meningkatkan daya sitotoksik sel NK terhadap sel *S49 (Mouse Lymphosarcoma)*. Ekstrak meniran juga terbukti meningkatkan sekresi *Tumor*

Necrosis Factor alpha (TNF- α), sehingga menurunnya viabilitas sel tumor diduga juga melalui aktivasi jalur ini.¹⁰ Pada Gambar 4. tampak menurunnya viabilitas sel tumor pada dosis 0,1 mg/ml dan 1 mg/ml diikuti dengan peningkatan viabilitas sel tumor pada dosis 10 mg/ml, selanjutnya menurun lagi pada dosis 100 mg/ml. Hal ini bisa dipahami sesuai dengan hasil penelitian eksploratif yang menunjukkan bahwa sampai paparan ekstrak meniran dosis 10 mg/ml, sel mononuklear belum teraktivasi. Diduga aktivasi imunostimulan baru terjadi pada dosis 100 mg/ml, sehingga daya sitotoksik yang paling tinggi terdapat pada dosis ini.

Peningkatan respon imun sel mononuklear terhadap sel tumor dapat terjadi karena ekstrak meniran terbukti dapat meningkatkan respon imun tipe 1 (Th1) atau respon imun seluler yang merupakan respon imun utama terhadap antigen tumor. Aktivasi respon Th1 dapat terjadi dengan disekresinya sitokin-sitokin respon imun Th1 seperti IL-2, IL-12, IFN- γ , dan LT. Sitokin-sitokin ini berperan mengaktivasi sel T CD8 menjadi CTL. CTL akan mengenali antigen permukaan sel tumor. IFN- γ juga mengaktivasi makrofag yang selanjutnya akan memproduksi IL-2, IL-12, TNF- α , dan IFN- γ . Sitokin-sitokin yang dihasilkan oleh makrofag akan mengaktivasi sel NK menjadi LAK. CTL dan LAK yang telah mengenali sel tumor akan mengeluarkan *perforin* yang menembus membran membran plasma sel tumor untuk selanjutnya mencetuskan sinyal lisis dan apoptosis sel tumor.^{1, 2, 5} Meskipun ekstrak meniran juga meningkatkan respon imun tipe2 (Th2), namun fungsi respon imun jenis ini kurang dominan dibandingkan respon imun Th1. Jalur aktivasi makrofag juga diduga berperan

dalam aktivitas sitotoksik sel tumor ekstrak meniran. Ekstrak meniran meningkatkan aktivasi makrofag melalui aktivasi respon imun Th1 dengan meningkatkan sekresi IL-2 dan IFN- γ yang akan meningkatkan aktivitas makrofag terhadap sel tumor, yaitu melalui aktivasi langsung sitokin makrofag, peningkatan aktivasi sel NK oleh sitokin-sitokin makrofag, atau peningkatan sekresi enzim lisosomal, NO, dan pelepasan radikal O₂ bebas, yang pada akhirnya akan menimbulkan efek sitotoksik sel tumor melalui jalur lisis dan apoptosis.^{1, 10} Selain itu diduga ekstrak meniran mempunyai aktivitas anti-prostaglandin dan anti-TGF- β karena sel tumor mensekresi prostaglandin dan TGF- β untuk menekan aktivitas limfosit.

6.2. Penelitian Utama: Penelitian pengaruh pemaparan kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih terhadap viabilitas sel tumor melalui aktivitas sel mononuklear

Hasil penelitian menunjukkan bahwa keempat hipotesis minor ini diterima. Pembahasannya diuraikan sebagai berikut:

1. Kelompok perlakuan kontrol menunjukkan viabilitas sel tumor yang lebih tinggi dibandingkan dengan seluruh kelompok perlakuan, baik perlakuan pemaparan tunggal maupun kelompok pemaparan kombinasi. Hal ini dapat diartikan bahwa perlakuan dengan paparan ekstrak sirih maupun ekstrak meniran, baik secara tunggal maupun kombinasi, dapat menurunkan viabilitas sel tumor.

Secara alami, sel efektor imun, dalam hal ini diwakili oleh mononuklear, akan mengalami tahap pengenalan, aktivasi, dan tahap pelaksanaan efek

sitotoksik apabila mengenali antigen asing, termasuk antigen tumor. Hasil di atas menunjukkan bahwa pemaparan ekstrak sirih maupun ekstrak meniran dapat meningkatkan jumlah kematian sel tumor. Ekstrak meniran sudah terbukti mempunyai aktivitas imunostimulan, sehingga diduga peningkatan respon imun seluler sel mononuklear terhadap sel tumor disebabkan oleh pemaparan ekstrak meniran kepada sel mononuklear.¹⁰ Hal ini didukung oleh hasil penelitian pendahuluan yang menunjukkan bahwa pemaparan ekstrak meniran terhadap sel mononuklear dapat meningkatkan viabilitas sel mononuklear. Sedangkan ekstrak sirih, yang mengandung komponen polifenol,⁵⁵ diduga berperan dalam menghambat proses glikosilasi glikoprotein permukaan membran plasma sel tumor, sehingga mengakibatkan berkurangnya efektivitas kompleks glikoprotein (kompleks sialomusin) permukaan sel tumor sebagai penghalang pengenalan sistem imun terhadap antigen permukaan sel tumor.^{9, 17, 18} Hasil penelitian pendahuluan juga menunjukkan bahwa pemaparan ekstrak sirih terhadap sel tumor dapat menurunkan viabilitas sel tumor secara bermakna. Pada penelitian eksploratif lain, paparan ekstrak meniran dosis tertinggi (100 mg/ml) terhadap sel tumor tidak menunjukkan perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna terhadap kontrol, sehingga dapat dikatakan ekstrak meniran relatif tidak toksik terhadap sel tumor. Hal ini memperkuat dugaan bahwa penurunan viabilitas sel tumor disebabkan oleh adanya peningkatan aktivitas respon imun sel mononuklear oleh ekstrak meniran dan penghambatan glikosilasi kompleks sialomusin sel tumor, atau mekanisme lain, seperti aktivasi sinyal apoptosis, oleh ekstrak sirih. Pemikiran adanya interaksi yang sinergik pada kombinasi pemaparan ekstrak

meniran dan ekstrak sirih dapat dimunculkan di sini oleh karena peningkatan aktivitas sitotoksik pada pemaparan kombinasi ekstrak meniran dengan ekstrak sirih dihasilkan melalui mekanisme kerja yang berlainan.⁶⁵ Ekstrak meniran meningkatkan aktivitas imun sel mononuklear, di lain pihak, ekstrak sirih menurunkan ekspresi sialomusin pada permukaan sel tumor, sehingga proses pengenalan antigen permukaan sel tumor oleh sel imun yang sudah mengalami stimulasi menjadi lebih efektif.

2. Kelompok perlakuan dosis minimal, baik perlakuan tunggal maupun kombinasi dengan dosis minimal, maupun supra-minimal, menunjukkan viabilitas sel tumor yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan kombinasi dosis supra-minimal dengan dosis supra-minimal. Hal ini berarti adanya perbedaan daya sitotoksik sel mononuklear terhadap sel tumor pada tingkatan dosis tertentu.

Secara singkat dapat disimpulkan terdapat tingkatan dosis yang diberikan secara tunggal maupun kombinasi yang dapat memberikan perubahan efek sitotoksik yang cukup bermakna. Dengan kata lain, peningkatan dosis diikuti dengan peningkatan efek sitotoksik. Tingkatan dosis yang bermakna untuk meningkatkan daya sitotoksik sel mononuklear terhadap sel tumor dalam penelitian ini adalah pada pemberian kombinasi dosis supra-minimal ekstrak sirih dan dosis supra-minimal ekstrak meniran. Selain faktor dosis, jenis ekstrak juga perlu dipikirkan berperan dalam peningkatan efek sitotoksik. Artinya, perlu diketahui sejauh mana peran masing-masing jenis ekstrak terhadap peningkatan

efek sitotoksik. Penelitian ini belum dapat menjelaskan hal itu sehingga masih diperlukan penelitian yang lebih lanjut.

3. Tidak adanya perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna antara kelompok perlakuan kombinasi selain dosis supra-minimal ekstrak sirih dengan dosis supra-minimal ekstrak meniran, dengan kelompok perlakuan tunggal atau kombinasi lainnya, mungkin disebabkan oleh belum tercapainya dosis dari salah satu atau kedua ekstrak untuk menimbulkan efek sitotoksik yang lebih tinggi secara bermakna.
4. Kelompok dengan perlakuan pemaparan kombinasi dosis supra-minimal dengan dosis supra-minimal menunjukkan viabilitas sel tumor yang lebih rendah dibandingkan dengan seluruh kelompok perlakuan maupun kelompok tanpa perlakuan lainnya. Hal ini berarti bahwa kombinasi dosis yang lebih besar dapat meningkatkan daya sitotoksik terhadap sel tumor. Simpulan ini memperkuat analisis sebelumnya, dan menunjukkan suatu batas dimana kombinasi dosis tertentu dapat memberikan efek sitotoksik yang lebih besar.

Selain itu, apabila dibandingkan dengan kelompok perlakuan pemaparan tunggal, kelompok perlakuan pemaparan kombinasi dosis supra-minimal dengan dosis supra-minimal menunjukkan perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna. Kelompok perlakuan pemaparan kombinasi dosis supra-minimal dengan dosis supra-minimal mempunyai viabilitas sel tumor yang lebih rendah dibandingkan kelompok perlakuan pemaparan tunggal. Hal ini menunjukkan bahwa pemaparan kombinasi ekstrak meniran dengan ekstrak sirih dapat menekan viabilitas sel tumor lebih banyak dibandingkan dengan pemaparan ekstrak secara tunggal.

Dengan kata lain, didapatkan penurunan viabilitas sel tumor pada sel tumor *Adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* yang dipapari kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih secara *in vitro*, sehingga hipotesis mayor diterima.

Berdasarkan analisis di atas, dapat dinyatakan bahwa efek sitotoksik dapat berbeda-beda besarnya tergantung pada besarnya dosis dan kombinasi pemaparan ekstrak. Belum dapat dijelaskan, ekstrak mana yang lebih berperan dalam meningkatkan efek sitotoksik terhadap sel tumor. Jalur-jalur sitotoksik yang berperan seperti aktivasi jalur *c-myc* dan *caspase-3*, dan lain-lain, masih harus diteliti lebih dalam lagi. Yang lebih penting adalah, penelitian ini dapat membuktikan bahwa pemaparan kombinasi ekstrak sirih dan ekstrak meniran secara sinergik meningkatkan efek sitotoksik sel mononuklear terhadap sel tumor dibandingkan pemaparan tunggal ekstrak meniran atau ekstrak sirih saja.

Hasil penelitian ini disadari masih jauh dari sempurna mengingat adanya berbagai keterbatasan baik pada rancangan penelitian, teknik pemeriksaan, maupun pada peneliti sendiri. Peneliti sekedar berusaha mengemukakan sekelumit dasar-dasar ilmiah efek ekstrak meniran dan ekstrak sirih sebagai *agent* anti-tumor. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah informasi ilmiah mengenai efek anti-tumor kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih sebagai bahan alami yang banyak dan mudah didapatkan di sekitar masyarakat Indonesia dengan harga yang terjangkau namun mempunyai potensi khasiat yang tidak kalah baiknya dengan obat modern.

BAB 7

SIMPULAN DAN SARAN

7.1. Simpulan

Penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan viabilitas sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* yang bermakna antara sel tumor yang dipapari ekstrak sirih dengan sel tumor yang tidak dipapari ekstrak sirih, antara sel tumor yang dipapari ekstrak meniran dengan sel tumor yang tidak dipapari ekstrak meniran, antara sel tumor yang dipapari kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih dengan sel tumor yang dipapari ekstrak meniran atau ekstrak sirih saja, dan antara sel tumor yang dipapari kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih dengan sel tumor yang tidak dipapari ekstrak meniran atau ekstrak sirih. Sehingga dapat disimpulkan bahwa viabilitas sel tumor pada sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* yang dipapari kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih berbeda secara bermakna dibandingkan dengan yang dipapari ekstrak meniran atau ekstrak sirih secara tunggal maupun dengan yang tidak dipapari ekstrak meniran atau ekstrak sirih.

7.2. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian yang lebih lanjut untuk memperkuat simpulan dan melengkapi hasil penelitian ini, terutama untuk mengetahui parameter-parameter imunolo-patologik lainnya seperti pemeriksaan sitokin pada subset

Th1 maupun subset Th2 untuk mengetahui sejauh mana respon imun tersebut berperan dalam melawan sel tumor.

2. Desain penelitian serupa dapat diterapkan untuk penelitian dengan dosis-dosis dan kombinasi perlakuan yang lebih bervariasi.
3. Desain penelitian serupa dapat diterapkan untuk penelitian dengan jenis ekstrak lainnya, seperti ekstrak alkohol atau heksan yang dapat mewakili kandungan sirih dan meniran secara lebih lengkap.
4. Desain penelitian serupa dapat diterapkan pada kultur sel tumor manusia.
5. Perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut kandungan ekstrak sirih dan ekstrak meniran, sehingga komponen-komponen yang berperan dapat diketahui.
6. Perlu dilakukan penelitian di tingkat yang lebih lanjut seperti penelitian *in vivo/ex vivo*, uji pre-klinis sampai uji klinis.
7. Penghitungan viabilitas sel tumor sebaiknya dilakukan dengan metode dan alat yang lebih teliti oleh karena penghitungan viabilitas sel dengan metode eksklusi *trypan blue*, kemungkinan terjadinya *human error* lebih tinggi.
8. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kemungkinan jenis interaksi lain pada kombinasi ekstrak meniran dan sirih, terutama pada berbagai dosis yang lebih bervariasi.

BAB 8

RINGKASAN

Meniran dan sirih adalah sebagian jenis tumbuhan yang banyak dikenal di masyarakat sebagai tumbuhan yang mempunyai khasiat pengobatan. Meniran dikenal sebagai tumbuhan yang berkhasiat imunostimulansia sedangkan sirih dikenal berkhasiat antiseptik melalui proses penghambatan glikosilasi. Mekanisme pertahanan tubuh melawan sel tumor diperankan oleh sistem imun terutama imun seluler. Berdasarkan khasiatnya tersebut, pemaparan kombinasi kedua ekstrak pada sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* diharapkan dapat memberikan pengaruh terhadap viabilitas sel tumor. Penelitian ini berusaha membuktikan adanya perbedaan viabilitas sel tumor pada sel tumor *adenocarcinoma mammae* mencit *C3H* yang dipapari kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih dan yang dipapari ekstrak meniran atau ekstrak sirih secara tunggal maupun yang tidak dipapari ekstrak, melalui aktivitas sel mononuklear yang berperan sebagai efektor sel imun. Ekstraksi meniran dan sirih dilakukan di Laboratorium Teknologi Fermentasi PPAU Bioteknologi-Institut Teknologi Bandung. Viabilitas sel tumor diukur dengan metode eksklusi *trypan blue*.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan *The Post Test-Only Control Group Design* yang menggunakan sel tumor yang dikultur bersama dengan sel mononuklear dalam sumuran sebagai objek penelitian. Sebelum ditemukan bersama dalam 1 sumuran, sel mononuklear dibagi menjadi 3 kelompok. Kelompok 1 dipapari ekstrak meniran dengan dosis minimal (0,1 mg/ml), kelompok 2 dipapari ekstrak meniran dosis supra-minimal (1 mg/ml), dan kelompok 3 dipapari

dengan medium RPMI. Demikian pula dengan sel tumor, kelompok 1 dipapari ekstrak sirih dosis minimal (0,1 mg/ml), kelompok 2 dipapari ekstrak sirih dosis supra-minimal (1 mg/ml), dan kelompok 3 dipapari dengan medium RPMI. Kemudian masing-masing diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37^oC, dengan kadar CO₂ 5%, selama 24 jam. Setelah inkubasi 24 jam, sel mononuklear dicuci dari ekstrak meniran dan sel tumor dicuci dari ekstrak sirih, kemudian keduanya dipertemukan dalam sumuran sesuai kelompok sampel. Sampel dikelompokkan menjadi 9 kelompok perlakuan yang terdiri dari 3 kelompok jenis perlakuan yaitu kelompok perlakuan kontrol (TK+MoK), kelompok perlakuan paparan tunggal (TK+MoMe(m), TK+MoMe(sm), Tsi(m)+MoK, Tsi(sm)+MoK), dan kelompok perlakuan paparan kombinasi (Tsi(m)+MoMe(m), Tsi(m)+MoMe(sm), Tsi(sm)+MoMe(m), Tsi(sm)+MoMe(sm)). Pada kelompok perlakuan Tsi(m)+MoMe(m) sel tumor dipapari ekstrak sirih dosis 0,1 mg/ml dan diinkubasi bersama sel mononuklear yang dipapari ekstrak meniran dosis 0,1 mg/ml. Pada kelompok perlakuan Tsi(m)+MoMe(sm) sel tumor dipapari ekstrak sirih dosis 0,1 mg/ml dan diinkubasi bersama sel mononuklear yang dipapari ekstrak meniran dosis 1 mg/ml. Pada kelompok perlakuan Tsi(sm)+MoMe(m) sel tumor dipapari ekstrak sirih dosis 1 mg/ml dan diinkubasi bersama sel mononuklear yang dipapari ekstrak meniran dosis 0,1 mg/ml. Pada kelompok perlakuan Tsi(sm)+MoMe(sm) sel tumor dipapari ekstrak sirih dosis 1 mg/ml dan diinkubasi bersama sel mononuklear yang dipapari ekstrak meniran dosis 1 mg/ml. Pada kelompok perlakuan Tsi(sm)+MoMe(sm) sel tumor dipapari ekstrak sirih dosis 1 mg/ml dan diinkubasi bersama sel mononuklear yang dipapari ekstrak meniran dosis 1 mg/ml. Pada kelompok perlakuan TK+MoK (kontrol) sel tumor dipapari medium RPMI dan diinkubasi bersama sel mononuklear yang dipapari

RPMI. Pada kelompok perlakuan TK+MoMe(m) sel tumor dipapari medium RPMI dan diinkubasi bersama sel mononuklear yang dipapari ekstrak meniran dosis 0,1 mg/ml. Pada kelompok perlakuan TK+MoMe(sm) sel tumor dipapari medium RPMI dan diinkubasi bersama sel mononuklear yang dipapari ekstrak meniran dosis 1 mg/ml. Pada kelompok perlakuan Tsi(m)+MoK sel tumor dipapari ekstrak sirih 0,1 mg/ml dan diinkubasi bersama sel mononuklear yang dipapari medium RPMI. Dan pada kelompok perlakuan Tsi(sm)+MoK sel tumor dipapari ekstrak sirih 1 mg/ml dan diinkubasi bersama sel mononuklear yang dipapari medium RPMI. Setelah diinkubasi pada suhu 37°C, dengan kadar CO₂ 5%, selama 18 jam, viabilitas sel tumor masing-masing kelompok perlakuan dihitung menggunakan metode eksklusi *trypan blue*.

Data-data yang diperoleh diuji bedanya dengan uji *ANOVA* untuk mengetahui perbedaan pada ke-9 kelompok perlakuan. Perbedaan antar kelompok perlakuan diuji dengan uji *Tukey*. Semua analisis dilakukan dengan komputer menggunakan program SPSS 10.01 for Windows.

Hasil penelitian menunjukkan rerata viabilitas sel tumor tertinggi terdapat pada kelompok kontrol, sedangkan kelompok pemaparan tunggal menunjukkan viabilitas sel tumor yang lebih rendah daripada kelompok kontrol. Viabilitas sel tumor terendah terdapat pada kelompok perlakuan pemaparan kombinasi, yaitu pada kombinasi ekstrak meniran dosis 1 mg/ml dan ekstrak sirih dosis 1 mg/ml. Uji *ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna pada ke-9 kelompok perlakuan ($p = 0,0001$). Sedangkan uji *Tukey* menunjukkan adanya perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna antara kelompok perlakuan pemaparan tunggal ekstrak sirih dibandingkan dengan kelompok kontrol, ada perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna antara

kelompok perlakuan pemaparan tunggal ekstrak meniran dibandingkan dengan kelompok kontrol, ada perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna antara kelompok perlakuan pemaparan kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih dengan kelompok pemaparan tunggal ekstrak meniran atau ekstrak sirih saja, dan ada perbedaan viabilitas sel tumor yang bermakna antara kelompok perlakuan pemaparan kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih dengan kelompok kontrol. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pemaparan kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih dapat menurunkan viabilitas sel tumor yang lebih bermakna dibandingkan dengan pemaparan tunggal ekstrak meniran atau ekstrak sirih saja maupun dengan kelompok tanpa pemaparan ekstrak.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memperkaya informasi ilmiah mengenai khasiat ekstrak meniran dan ekstrak sirih terutama pengaruh pemberian kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih untuk menurunkan viabilitas sel tumor, khususnya *adenocarcinoma mammae*. Interaksi pemberian kombinasi ekstrak meniran dan ekstrak sirih dalam menurunkan viabilitas sel tumor ini bersifat sinergisme. Ekstrak meniran meningkatkan daya sitotoksik sel mononuklear dalam membunuh sel tumor *adenocarcinoma mammae* yang mengalami penguraian sialomusin oleh karena penghambatan proses glikosilasi oleh ekstrak sirih. Selain itu, diharapkan ada peningkatan status pemakaian tumbuhan meniran dan tumbuhan sirih sebagai suatu formula kombinasi yang dapat dikembangkan dalam penelitian-penelitian lebih lanjut sebagai obat anti-tumor.

DAFTAR PUSTAKA

1. Abbas AK, Litchman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1997: 279 – 405.
2. Baratawidjaja KG. Imunologi Dasar. Edisi ke-4. Jakarta: Balai Penerbit FKUI, 2000: 170 – 1.
3. Hilgers J. Human adenocarcinomas immunosurveillance and immunotherapy. Symposium Molecular Aspect of Malignancy. Semarang: Lab. Bioteknologi FK UNDIP – BP UNDIP, 2001: 1 – 12.
4. Sarjadi, Hartini PT. Mapping kanker di Semarang dan sekitarnya. Media Medika Indonesiana 2001; 36(2): 87 – 92.
5. Mitchell RN, Cotran RS. Neoplasia. In: Basic Pathology. 6th ed. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, editors. Philadelphia: WB Saunders Co, 1996: 141 – 2.
6. Suwondo S, Sidik, Sumadilaga RS, Soelarko RM. Aktivitas antibakteri daun sirih (*Piper betle* L.) terhadap bakteri ginggivitis dan bakteri pembentuk plak/karies gigi (*Streptococcus mutans*). Warta Tumbuhan Obat Indonesia 1992 Jan; 1(1): 1 – 4.
7. Sundari S, Koensoemardijah, Nusratini. Minyak atsiri daun sirih dalam pasta gigi: stabilitas fisis dan daya antibakteri. Warta Tumbuhan Obat Indonesia 1992 Jan; 1(1): 5 – 6.
8. Hernani, Yuliani S. Peranan sirih sebagai obat tradisional. Warta Tumbuhan Obat Indonesia 1992 Jan; 1(1): 13 – 14.
9. Nakahara K, Kawabata S, Ono H, Ogura K, Tanaka T, Ooshima T, Hamada S. Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glucosyltransferases of mutans streptococci. American Society for Microbiology. Appl. Environ. Microbiol., 1993 Apr; 59(4): 968 – 73.
10. Ma'at S. *Phyllanthus niruri* L. sebagai imunostimulator pada mencit. Karya tulis ilmiah. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya 1996.
11. Roitt IM. Essential Immunology. 8th ed. London: Blackwell Science Ltd, 1994: 363-5.
12. Amanda LM, Richard AL, Bruce WS, Scott B. T-cell receptor transgenic analysis of tumor specific CD8 and CD4 responses in the eradication of solid tumors. Cancer Research 1999; 59: 1071-79.

13. Domenech N, Henderson RA, Finn OJ. Identification of a HLA-A11-restricted epitope from the tandem repeat domain of the epithelial tumor antigen mucin. *The J of Immunology* 1995; 155: 4766 – 74.
14. Komatsu M, Lee Y, Carraway KL. Overexpression of sialomucin complex, a rat homologue of MUC4, inhibits tumor killing by lymphokine-activated killer cells. *Cancer Research* 1999; 59: 2229 – 36.
15. Nelson DL, Cox MM. *Principles of Biochemistry Lehninger*. 3rd ed. Worth Publishers. New York, 2000: 1034 – 69.
16. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of The Cell*. 3rd ed. New York: Garland Publishing Inc, 1995: 502, 599 – 609.
17. Ooshima T, Osaka Y, Sasaki H, Osawa K, Yasuda H, Matsumura M, Sobue S, Matsumoto M. Caries inhibitory activity of cacao bean husk extract in in-vitro and animal experiments. *Arch Oral Biol* 2000 Aug; 45(8): 639 - 45.
18. Ooshima T, Osaka Y, Sasaki H, Osawa K, Yasuda H, Matsumoto M. Cariostatic activity of cacao mass extract. *Arch Oral Biol* 2000 Sep; 45(9): 805 – 8.
19. DeSouza MM, DeSouza MM, Surveyor GA, Price RE, Julian J, Kardon R, Zhou X, Gendler S, Hilkens J, Carson DD. MUC1/episialin: a critical barrier in the female reproductive tract. *J. Reprod Immunol* 1999 Dec;45(2):127-58.
20. Mensdorff-Pouilly, Verstraeten AA, Kenemans P, Snijdwint FG.M, Kok A, Van Kamp GJ, Paul MA, Van Diest PJ, Meijer S, Hilgers J. Survival in early breast cancer patients is favorably influenced by a natural humoral immune response to polymorphic epithelial mucin. *J Clin Onc* 2000; 18: 574 – 83.
21. Irimura T, Denda K, Iida S, Takeuchi H, Kato K. Diverse glycosylation of MUC1 and MUC2: potential significance in tumor immunity. *J Biochem (Tokyo)* 1999 Dec; 126(6): 975 - 85.
22. Ho SS, et al. Mucin gene expression in normal, preneoplastic, and neoplastic human gastric epithelium. *Cancer Research* 1995; 55: 2681 – 90.
23. Xing PX, Lees C, Lodding J, Prenzoska J, Poulos G, Sandrin M, Gendler S, McKenzie IF. Mouse mucin 1 (MUC1) defined by monoclonal antibodies. *Int J Cancer* 1998 Jun; 76(6): 875 – 83.
24. Zheng P, Sarma S, Guo Y, Liu Y. Two mechanisms for tumor evasion of preexisting cytotoxic T-cell responses. *Cancer Research* 1999; 59: 3461-67.

25. McFarland TA, Ardman B, Manjunath N, Fabry JA, Lieberman J. CD43 diminished susceptibility to T lymphocytes-mediated cytotoxicity. *The J. of Immunology* 1995; 154: 1097 – 104.
26. Apostolopoulos V, Karanikas V, Haurum JS, McKenzie IF. Induction of HLA-A2-restricted CTLs to the mucin 1 human breast cancer antigen. *The J. of Immunology* 1997; 159: 5211 – 5218.
27. Kotera Y, Fontenot JD, Pecher G, Metzgar RS, Finn OJ. Humoral immunity against a tandem repeat of epitope of human mucin MUC-1 in sera from breast, pancreatic, and colon cancer patients. *Cancer Research* 1994; 54: 2856 – 60.
28. Peterson JA, Blank EW, Ceriani RL. Effect of multiple repeated doses of radioimmunotherapy on target antigen expression (breast MUC-1 mucin) in breast carcinomas. *Cancer Research* 1997; 57: 1103 – 8.
29. Baruch A, et al. The breast cancer-associated MUC1 gene generates both a receptor and its cognate binding protein. *Cancer Research* 1999; 59: 1552 – 61.
30. Carr-Brendel V, et al. Immunity to murine breast cancer cells modified to express MUC-1 a human breast cancer antigen in transgenic mice tolerant to human MUC-1. *Cancer Research* 2000; 60: 2435 – 43.
31. Tomlinson S, deCarvalho LCP, Vandekerckhove F, Nussenzweig. Role of sialic acid in the resistance of trypanosoma cruzi trypomastigotes to complement. *The J of Immunology* 1994; 153: 3141 – 47.
32. Dricu A, Carlberg M, Wang M, Larsson O. Inhibition of N-linked glycosylation using tunicamycin causing cell death in malignant cells: role of down regulation of the insulin-like growth factor 1 receptor in induction of apoptosis. *Cancer Research* 1997; 57: 543 – 48.
33. Larsson O, Carlberg M, Zetterberg A. Role of dolichol phosphate, N-linked glycosylation and cell membrane expression of insulin-like growth factor-1 receptor in maintenance of malignant cell growth. *J of Cell Science* 1993; 106: 299 – 307.
34. Murphy ED. Characteristic Tumor's. Dalam: Eunice U (eds). *Biology of the Laboratory Mouse*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, Inc. 1966: 521.
35. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996 Mar; 17(3) : 138 – 46.
36. Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu. Rev. Immunol* 1994; 12: 635 – 73.

37. Delespesse G, Demeure CE, Yang LP, Ohshima Y, Byun DG, Shu U. In vitro maturation of naive human CD4⁺ T lymphocytes into Th1, Th2 effectors. *Int Arch Allergy Immunol* 1997 May - Jul; 113(1-3) : 157 - 9.
38. Zhai Y, Ghobrial RM, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. Th1 and Th2 cytokines in organ transplantation: paradigm lost? *Crit Rev Immunol* 1999; 19(2):155 - 72.
39. Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 1996 Apr 5; 272(5258): 54 - 60.
40. Dutton RW, Bradley LM, Swain SL. T cell memory. *Annu. Rev. Immunol.* 1998; 16: 201 - 23.
41. Bachmann MF, Barner M, Viola A, Kopf M. Distinct kinetics of cytokine production and cytotoxicity in effector and memory T cells after viral infection. *Eur J Immunol* 1999 Jan; 29(1): 291 - 9.
42. Garcia S, DiSanto J, Stockinger B. Following the development of a CD4 T cell response in vivo: from activation to memory formation. *Immunity* 1999 Aug; 11(2): 163 - 71.
43. Aebischer I, Stadler BM. TH1-TH2 cells in allergic responses: at the limits of a concept. *Adv Immunol* 1996; 61: 341 - 403.
44. Mosmann TR, H Cherwinski, MW Bond, MA Giedlin and RL Coffman. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol* 1986; 136: 2348 - 57.
45. Del Prete GF, De Carli M, Mastromauro C, Biagiotti R, Macchia D, Falagiani P, Ricci M, Romagnani S. Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J Clin Invest* 1991 Jul; 88(1): 346 - 50.
46. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 1997 Jun; 18(6): 263 - 6.
47. Katsikis PD, Cohen SB, Londei M, Feldmann M. Are CD4⁺ Th1 cells pro-inflammatory or anti-inflammatory? The ratio of IL-10 to IFN-gamma or IL-2 determines their function. *Int Immunol* 1995 Aug; 7(8): 1287 - 94.
48. Ohshima Y, Yang LP, Avicce MN, Kurimoto M, Nakajima T, Sergerie M, Demeure CE, Sarfati M, Delespesse G. Naive human CD4⁺ T cells are major source of lymphotoxin. *J. Immunol.* 1999; 162: 3790.
49. Foy TM, Aruffo A, Bajorath J, Buhlmann JE, Noelle RJ. Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu. Rev. Immunol.* 1996; 14: 591 - 617.

50. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell cotimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 1996; 14: 233 – 58.
51. Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, Thompson CB. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 1995 Jul; 3(1): 87 - 98.
52. Murray JS. How the MHC selects Th1/Th2 immunity. *Immunol Today* 1998 Apr; 19(4): 157 - 63.
53. Paul R. Rogers PR, Croft M. Peptide Dose, Affinity, and Time of Differentiation Can Contribute to the Th1/Th2 Cytokine Balance. *J. Immunol.* 1999; 163: 1205 – 1213.
54. Rogers PR, Huston G, Swain SL. High antigen density and IL-2 are required for generation of CD4 effectors secreting Th1 rather than Th0 cytokines. *J. Immunol.* 1998; 161: 3844 – 52.
55. Prayogo B, Sutaryadi. Pemanfaatan sirih untuk pelayanan kesehatan primer. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia* 1992 Jan; 1(1): 9.
56. Rostiana O, Rosita SM, Sitepu D. Keanekaragaman genotipa sirih (*Piper betle* L.) asal dan penyebarannya. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia* 1992 Jan; 1(1): 16 – 18.
57. Darwis SN. Potensi sirih (*Piper betle* L.) sebagai tanaman obat. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia* 1992 Jan; 1(1): 9 – 11.
58. Emmyzar, Ngadimin, Rochimat I. Pengaruh berbagai media tumbuh terhadap pertumbuhan dan produksi meniran. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia* 1993 Agustus; 2(4): 7 – 10.
59. Subarnas A, Sidik. *Phyllanthus niruri* Linn., Kimia, farmakologi dan penggunaannya sebagai obat tradisional. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia* 1993 Agustus; 2(4): 13 – 18.
60. Djauharria E, Rachmat EM, Firman SC. Pengaruh pupuk daun dan zat pengatur tumbuh terhadap pertumbuhan dan produksi herba meniran. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia* 1993 Agustus; 2(4): 19 – 20.
61. Hamzah, Soebagyo RL, Widayat, Machin A, Dyatmiko W. Efek peluruh kemih tiga ekstrak meniran pada tikus. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia* 1993 Agustus; 2(4): 22.
62. Yanti L, Anggraeni, Yuningsih. Daya larut infus meniran (*Phyllanthus niruri* L.) terhadap batu kalsium. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia* 1993 Agustus; 2(4): 23.

63. Winarno MW, Sundari D, Paramita DI. Beberapa informasi penelitian khasiat keamanan dan fitokimia tanaman meniran (*Phyllanthus niruri* L.). *Warta Tumbuhan Obat Indonesia* 1993 Agustus; 2(4): 24.
64. Prajogo BEW, Santa I. Identitas morfologi, anatomi dan profil kromatogram *Phyllanthus urinaria* L. dan *Phyllanthus niruri* L. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia* 1993 Agustus; 2(4): 32 – 33.
65. Hansten PD, Katzung BG. Important drug interactions & their mechanisms. In: Katzung B.G. (eds). *Basic & Clinical Pharmacology*. 8th ed. San Francisco: The McGraw-Hill Co, 2001: 1122 – 1134.
66. Dennehy C.E., Tsourounis C. Botanicals (“herbal medications”) & nutritional supplements. In: Katzung B.G. (eds). *Basic & Clinical Pharmacology*. 8th ed. San Francisco: The McGraw-Hill Co, 2001: 1088 – 1099.
67. Kusmardi, Cornain S, Gunardjono, Jauzi S. Analisis daya sitotoksik sel killer mencit C3H dan GR yang diaktivasi interleukin-2 terhadap sel tumor kelenjar susu mencit singenik dan alogenik. *Majalah Patologi* 1999 Januari; 8(4): 1- 7
68. Wilson AP. *Animal Cell Cultured: a Practical Approach*. 2nd ed edn (R.I Freshney, ed). Oxford: IRL Press, 1992: 39 – 63.
69. Tan Mei Lan, Sulaiman, SF, Najimuddin, N., Samian, MR and Tengku Muhammad, TS. Growth inhibition and apoptosis of breast carcinoma cell line <http://www.mastic.gov.my/kstas/NSFWorkshop/NSF/nsf%5CPHAR18.DOC>