

**PENGARUH GANODERMA LUCIDUM DALAM MENINGKATKAN
EKSPRESI PERFORIN SEL MONONUCLEAR TERHADAP
DERAJAT HISTOLOGIK ADENOKARSINOMA MAMMA
MENCIT C3H**

**The effect of Ganoderma lucidum stimulated perforin expression of
mononuclear cells on the histological grading of
C3H mice mammary adenocarcinoma**



TESIS

**untuk memenuhi sebagian persyaratan
Mencapai derajat Sarjana S-2**

Magister Ilmu Biomedik

**Ratna Damma Purnawati
G4A 098 007**

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
OKTOBER
2003**

**PENGARUH GANODERMA LUCIDUM DALAM MENINGKATKAN
EKSPRESI PERFORIN SEL MONONUCLEAR TERHADAP
DERAJAT HISTOLOGIK ADENOKARSINOMA MAMMA
MENCIT C3H**

**The effect of Ganoderma lucidum stimulated perforin expression of
mononuclear cells on the histological grading of
C3H mice mammary adenocarcinoma**



TESIS

**untuk memenuhi sebagian persyaratan
Mencapai derajat Sarjana S-2**

Magister Ilmu Biomedik

**Ratna Damma Purnawati
G4A 098 007**

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
OKTOBER
2003**

UPT-PUSTAK-UNDIP	
No. Daft:	4505/T/PK/G/...
Tgl.	: 24 - 8 - 06

**PENGARUH GANODERMA LUCIDUM DALAM MENINGKATKAN
EKSPRESI PERFORIN SEL MONONUCLEAR TERHADAP
DERAJAT HISTOLOGIK ADENOKARSINOMA MAMMA MENCIT C3H**

**The effect of Ganoderma lucidum stimulated perforin expression of
mononuclear cells on the histological grading of
C3H mice mammary adenocarcinoma**

Disusun oleh:

**RATNA DAMMA PURNAWATI
G4A 098 007**

Telah dipertahankan didepan dewan penguji pada tanggal 13 Oktober
2003

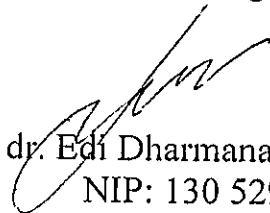
Dan dinyatakan telah lulus memenuhi syarat

Pembimbing utama



Prof. Dr.dr.H Tjahjono, Sp.PA.FIAC.
NIP: 130 368 076

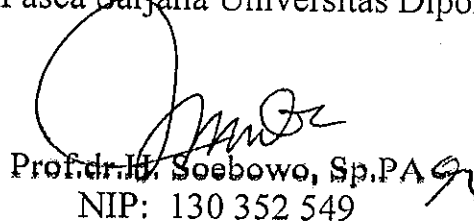
Pembimbing anggota



dr. Edi Dharmana, MSc, PhD
NIP: 130 529 451

Mengetahui

Ketua Program Magister Ilmu Biomedik
Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro



Prof. dr. H. Soebowo, Sp.PA
NIP: 130 352 549

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam tesis ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka

Semarang, Oktober 2003

Ratna Damma Purnawati

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Nama lengkap dan gelar : dr. Ratna Damma Purnawati
Tempat/ tanggal lahir : Semarang, 14 Nopember 1963
Jenis kelamin : Perempuan
Status : Menikah
Pekerjaan : Staf Pengajar Bagian Histologi FK UNDIP
Gol/ Pangkat/ NIP : IIIB/ Penata Muda/ 131 916 037
Jabatan Fungsional : Asisten Ahli

RIWAYAT PENDIDIKAN

1. SD Cor Yesu Semarang 1970 – 1976
2. SMP Maria Mediatrix Semarang 1976 – 1979
3. SMA Negeri I Semarang 1979 – 1982
4. FK UNDIP, dokter 1982 – 1989
5. Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana UNDIP 1998 – 2003

RIWAYAT PEKERJAAN

1. Staf Pengajar Bagian Histologi FK UNDIP 1989 - sekarang

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah saya panjatkan ke hadirat Allah swt. karena rahmat dan karuniaNya tesis ini dapat diselesaikan dengan baik.

Tesis ini berisi penelitian pada mencit C3H yang diberi Ganoderma lucidum dan di inokulasi sel adenokarsinoma mamma, dengan tujuan untuk melihat pengaruh Ganoderma lucidum terhadap pertumbuhan adenokarsinoma mamma pada mencit C3H . Alasan penelitian ini dilakukan karena Ganoderma lucidum telah banyak dipakai dimasyarakat, disamping itu juga dari hasil beberapa penelitian terbukti dapat menstimulasi sistem kekebalan tubuh dan menghambat pertumbuhan beberapa jenis tumor.

Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada:

- Prof. DR.dr.H.Tjahjono, SpPA(K), FIAC sebagai pembimbing utama yang telah banyak meluangkan waktu dan dengan sabar selalu mendorong, memberi pengarahan dan memberi semangat saya untuk terus maju menyelesaikan tesis ini.
- dr. Edi Dharmana, MSc, PhD selaku pembimbing yang juga telah banyak meluangkan waktu dan dengan sabar selalu mendorong, memberi pengarahan, meskipun dengan rasa sungkan menegur saya supaya saya segera menyelesaikan tesis ini.

- Prof. dr. Soebowo, SpPA sebagai Ketua Program Studi Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana UNDIP beserta seluruh staf yang telah membimbing saya selama menimba ilmu di Program Studi Ilmu Biomedik
- Prof. dr. Nurdjaman (Alm), dr. Indra Wijaya, SpPA, dr Parno Widjojo, Sp.FK, drg. Henry Setyawan, MSc, dr. Andrew Johan MSi dan dr Neni Susilaningsih, MSi sebagai narasumber yang telah memberikan masukan-masukan yang sangat berharga.
- Dr. dr. Harijadi, SpPA, dr. Irianiwati, SpPA dan para teknisi dari bagian Patologi Anatomi FK UGM / RSUP dr. Sarjito yang telah mengizinkan dan membantu saya belajar dan melakukan pewarnaan imunohistokimia di Yogyakarta
- dr. M. Anggoro DB Sachro, DTM&H, SpA(K), Prof.dr.Kabulrachman, SpKK(K) yang telah membantu, memberi pengarahan dan kesempatan untuk melanjutkan Program Magister Ilmu Biomedik.
- dr. Anon Surendro,PAK, dr. Sri Hendratno,DAPE atas perhatian dan dorongan disetiap kesempatan.
- Dr. Soejoto, SpKK(K), atas bantuannya dalam memperlancar proses pendidikan saya di Biomedik.
- dr. Hardian yang telah banyak memberi masukan dalam bidang statistik.
- Dr. Ika Pawitra Miranti, Mkes yang penuh rasa ikhlas dan kesabaran selalu membantu dalam pelaksanaan penelitian hingga pembacaan preperat.

- Dr. Hermina Sukmaningtyas, Mkes dengan ikhlas dan sukarela membantu dan mendorong disaat saya dalam kebingungan.
- dr. Soetedjo, SpS(K); dr. Djoko Antoro; Prof. dr. Sultana MH Faradz, PhD; dr. RB. Bambang Witjahyo, Mkes; dr. Ismail; Mbak Sri; Pak Tukul; Pak Kasiman dan Pak Edi yang ikut memperlancar saya dalam mengikuti program pendidikan ini.
- Para Laboran baik di Patologi Anatomi, Lab Bioteknologi FK, maupun MIPA UNDIP dan Pak Dukut atas segala bantuannya selama berjalannya penelitian.
- Pimpinan PT Sidomuncul yang telah memberi ijin sehingga saya memperoleh bantuan Ganoderma lucidum.
- Ir. Bambang, PhD, Ibu Meni Bagian MIPA UNDIP yang telah membantu dalam pembuatan ekstrak Ganoderma lucidum.
- Dra. Puspita dan pak Slamet bagian Patologi Anatomi FK UI. Yang selalu membantu menyiapkan mencit C3H.
- Dedi, Yukie, Fatimah, Anna, Dina dan Rahmat yang ikut terlibat selama penelitian berlangsung.
- Dengan segala kerendahan hati dan rasa hormat, saya ucapkan terimakasih kepada Bapak(Alm), Ibu, Eyang Puk, Ibu Mertua(Alm) tercinta atas doa restunya dan terutama kepada Ibu yang telah membantu dalam mengasuh dan membimbing anak-anak tercinta selama saya mengikuti pendidikan. Kakak – kakak dan Adik atas dorongan, perhatian dan doanya. Kepada mas Yoni , Dita dan Adlin tercinta saya ucapkan terimakasih atas pengertian, dorongan

dan kerelaannya serta mohon maaf yang tak terhingga atas segala kekurangan perhatian saya selama saya menempuh pendidikan. Semoga Allah SWT selalu memberikan limpahan rahmat dan karunia yang tak terbatas. Amin.

- Sahabat-sahabat seperjuangan saya yang tidak dapat saya sebutkan satu-persatu, terima kasih atas segala bantuan dan pengertiannya.
- Semoga tesis ini bermanfaat dan dapat menambah pengetahuan bagi yang membutuhkannya.

Semarang, Oktober 2003

Ratna Damma Purnawati

DAFTAR ISI

	Hal
Halaman judul	i
Halaman pengesahan	ii
Halaman pernyataan	iii
Riwayat hidup	iv
Kata pengantar	v
Daftar isi	ix
Daftar tabel	xi
Daftar gambar	xii
Daftar lampiran	xiii
Abstrak	xiv
Bab 1 : PENDAHULUAN	
1.1. Latar belakang	1
1.2. Perumusan masalah	4
1.3. Tujuan penelitian	4
1.4. Manfaat penelitian	5
Bab II : TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Ganoderma Lucidum	6
2.2. Respon imunologik terhadap sel tumor	8
2.3 Mekanisme efektor dalam melawan tumor	12
2.4. Peran biologik IL-2	20
2.5. Anatomi dan Histologi kelenjar payudara	21
2.6. Kanker payudara	22
2.7. Pewarnaan imunohistokimia	29
2.8. 1. Kerangka teori	31
2.8.2. Kerangka konsep	32

2.8.3. Hipotesis	32
Bab III. METODA PENELITIAN	
3.1. Rancangan penelitian	34
3.2. Sampel penelitian.....	35
3.3. Waktu dan lokasi penelitian.....	36
3.4. Variabel penelitian	36
3.5. Bahan dan alat penelitian	39
3.6. Pelaksanaan penelitian	42
3.7. Alur kerja	43
3.8. Prosedur pemeriksaan	44
3.9. Cara pengumpulan data	48
3.10. Analisa data	49
Bab IV HASIL PENELITIAN	50
Bab V PEMBAHASAN	57
Bab VI SIMPULAN DAN SARAN	61
DAFTAR PUSTAKA	63
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

	Hal
1. Tabel 1. Rerata jumlah sebukan sel mononuclear	50
2. Tabel 2. Skor ekspresi perforin	52
3. Tabel 3. Rerata jumlah skor derajat histologik adenokarsinoma	54
4. Tabel 4. Uji korelasi antara sebukan sel mononuclear, ekspresi perforin dan derajat adenokarsinoma	55

DAFTAR GAMBAR

	Hal
1. Gambar 1. Jalur kematian sel target yang dipengaruhi CTL/Sel NK	20
2. Gambar 2. Diagram box/plot sebukan sel mononuklear	51
3. Gambar 3. Diagram box/plot skor ekspresi perforin	52
4. Gambar 4. Diagram box/plot skor derajat adenokarsinoma	52
5. Gambar 5. Sebukan sel mononuklear skor 1	75
6. Gambar 6. Sebukan sel mononuklear skor 3	75
7. Gambar 7. Kontrol positif pewarnaan Mo-Ab anti perforin, 100 x	76
8. Gambar 8. Kontrol positif pewarnaan Mo-Ab anti perforin, 400 x	76
9. Gambar 9. Kontrol positif CTL/sel NK	77
10. Gambar 10. Perforin dalam jaringan adenokarsinoma	77
11. Gambar 11. Ekspresi perforin, skor 4	78
12. Gambar 12. Ekspresi perforin, skor 1	78
13. Gambar 13. Derajat histologik adenokarsinoma, skor 4	79
14. Gambar 14. Derajat histologik adenokarsinoma, skor 7	79

DAFTAR LAMPIRAN

	Hal
1. Hasil histopatologi	69
2. Hasil analisa deskriptif	71

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG

Kanker mamma merupakan keganasan yang sering ditemukan diseluruh dunia, dengan insidensi relatif tinggi yaitu sebesar 20% dari seluruh keganasan. Kanker mamma banyak diderita oleh wanita dan sangat jarang ditemukan pada laki-laki. Sekitar 600.000 kasus kanker mamma baru didiagnosa setiap tahun dan 350.000 kasus diantaranya ditemukan dinegara maju, sedangkan 250.000 kasus lainnya ditemukan di negara berkembang.¹ Data Badan Registrasi Kanker Ikatan Ahli Patologi Indonesia (BRK-IAPI) 1989 memperlihatkan bahwa frekwensi kanker mamma pada wanita di Indonesia (12,60%) menduduki urutan kedua tertinggi setelah kanker rahim (18,86%).^{2,3} Di Semarang pada tahun 2001, ditemukan kasus kanker mamma sebanyak 769 kasus dan insiden ini berada pada urutan tertinggi kedua setelah kanker mulut rahim. Insiden puncak pada kelompok umur 45-54 tahun.⁴ Di Amerika pada tahun 1993 angka kejadian kanker adalah 28 per 100.00 populasi. Singapura pada tahun 1990, kanker mamma merupakan urutan teratas dari seluruh keganasan pada wanita dengan insidens 500 kasus baru dan diperkirakan menjadi 1.000 kasus baru pada tahun 2000.⁵ Di India pada tahun 1990, kanker mamma menduduki urutan kedua dengan frekuensi 15,81% dari seluruh keganasan pada wanita atau 14,15 per 100.000 populasi.⁶

Penyakit kanker umumnya dipandang oleh masyarakat sebagai penyakit yang tidak dapat disembuhkan yang berakhir dengan kematian disertai dengan

penderitaan hebat. Namun, sesungguhnya ada beberapa jenis diantaranya yang dapat disembuhkan dengan baik apabila pengobatan dilakukan ketika kanker baru mulai tumbuh. Dalam hal ini WHO (Organisasi Kesehatan Dunia) menyatakan secara umum bahwa hanya sepertiga kasus kanker yang dapat diobati, sepertiga lagi tidak dapat disembuhkan, dan sepertiga sisanya dapat dicegah timbulnya.⁷ Di Indonesia angka kematian akibat kanker terus meningkat dari tahun ketahun. Hasil survei kesehatan rumah tangga (SKRT) Departemen Kesehatan RI menunjukkan angka tersebut pada tahun 1972: 1,4%, tahun 1980:3,4% tahun 1986: 4,3%, dan tahun 1992:4,4%.²

Cara pengobatan kanker mamma yang berlaku selama ini (dengan pembedahan, radioterapi dan kemoterapi) sangat mahal dan seringkali tidak terjangkau oleh sebagian besar masyarakat kita. Hal ini menyebabkan terus dicari cara-cara lain dengan menggunakan berbagai ekstrak tumbuh-tumbuhan untuk terapi alternatif kanker. Saat ini tanaman obat terutama *immunostimulator* telah banyak diteliti dan bahkan telah dimanfaatkan dalam pengobatan oleh karena disamping harganya jauh lebih murah diharapkan juga mempunyai hasil yang memuaskan.⁸ yang mempunyai nama lain jamur *lingzhi* atau *reishi* merupakan obat tradisional cina yang sejak lama telah digunakan. Dari beberapa penelitian terakhir dilaporkan bahwa *Ganoderma lucidum* mempunyai efek hepatoprotektif^{9,10}, analgetik¹¹, anti inflamasi^{11,12} dan anti tumor karena *Ganoderma lucidum* dapat menstimulasi sistem kekebalan tubuh.^{13,14} *Ganoderma lucidum* juga terbukti dapat menghambat pertumbuhan tumor paru¹⁵ dan terbukti memiliki efek sitotoksik terhadap sel tumor pada Leukemia *Sel mononuklearik* Kronik (LLK).¹⁶

Polisakarida *Ganoderma lucidum* terbukti mempunyai aktifitas antigenotoksik dan promosi anti tumor secara *in vitro*, sehingga diperkirakan dapat berguna untuk kemoprevensi kanker.¹⁷

Respon imun merupakan hasil interaksi antara antigen dengan sel-sel imunokompeten, termasuk mediator-mediator yang dihasilkannya. Fungsi utama respon imun adalah untuk membedakan antara *self* (milik tubuh sendiri) dengan *non self*, seperti halnya mikroorganisme patogen, tumor, jaringan yang dicangkokkan, atau substansi lain yang masuk dalam tubuh.¹⁸ Pada dasarnya respon imun terdiri dari 3 fase: kognitif, aktivasi, efektor. Respon imun terutama tergantung pada tiga tipe sel yaitu makrofag, limfosit T dan limfosit B.¹⁹

Sebaran sel mononuklear disekitar sel kanker secara histologik mempunyai nilai prognostik yang baik karena kecepatan pertumbuhan sel kanker akan menurun. Secara *invitro*, beberapa sel imun disekitar sel kanker terbukti dapat membunuh sel kanker disekelilingnya.²⁰

Pendekatan imunologi terbaru dalam terapi kanker mengharapkan stimulasi terhadap diferensiasi CTL dengan kemampuan menemukan sel tumor secara selektif. Jelas bahwa CTL mempunyai potensi dan spesifisitas yang diperlukan untuk pengobatan kanker manusia dan pendekatan vaksinasi dirancang oleh banyak laboratorium guna mengeksploitasi potensi ini.²¹

Sel imun yang berperan dalam perondaan imun terhadap kanker adalah sel limfosit T sitotoksik (CTL), Sel NK (*Natural Killer*) dan makrofag. Setelah sel kanker dikenal sebagai sel asing, ketiga sel imun tersebut akan menghancurkan sel kanker.^{19,20,22} Sel CTL dan sel NK melakukan cara sitotoksitas yang sama yaitu

dengan mengeluarkan perforin, sedangkan makrofag menggunakan cara fagositosis.^{19,20} Perforin dapat digunakan sebagai marker dari sel yang bersifat sitotoksik yaitu CTL dan sel NK.²³

Dalam penelitian ini akan dilihat efek *Ganoderma lucidum* dalam memodulasi sistem imun dan pengaruhnya terhadap pertumbuhan tumor kelenjar susu pada mencit C3H. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat mendukung penggunaan *Ganoderma lucidum* sebagai salah satu komplemen terapi kanker baku.

1.2. PERUMUSAN MASALAH

Apakah *Ganoderma lucidum* dapat meningkatkan aktifitas sel mononuklear dalam menghambat pertumbuhan adenokarsinoma mamma mencit C3H.

1.3. TUJUAN PENELITIAN

1.3.1. Tujuan umum :

Membuktikan peningkatan daya sitotoksik setelah pemberian *Ganoderma lucidum* terhadap pertumbuhan *in vivo* adenokarsinoma mamma mencit C3H

1.3.2. Tujuan khusus :

1. Membuktikan terdapatnya perbedaan jumlah sebukan sel mononuklear disekitar jaringan adenokarsinoma mamma mencit C3H pada kelompok

yang diberi *Ganoderma lucidum* dan kelompok yang tidak diberi *Ganoderma lucidum*.

2. Membuktikan terdapatnya perbedaan jumlah skor ekspresi perforin sel mononuklear (disekitar jaringan adenokarsinoma mamma mencit C3H) pada kelompok yang diberi *Ganoderma lucidum* dan kelompok yang tidak diberi *Ganoderma lucidum*.
3. Membuktikan terdapatnya perbedaan derajat histologik adenokarsinoma mamma mencit C3H antara kelompok yang diberi *Ganoderma lucidum* dengan kelompok yang tidak diberi *Ganoderma lucidum*
4. Menganalisis hubungan antara jumlah sebukan sel mononuklear disekitar jaringan adenokarsinoma mamma dengan skor ekspresi perforin.
5. Menganalisis hubungan antara jumlah sebukan sel mononuklear disekitar jaringan adenokarsinoma mamma dengan skor derajat adenokarsinoma.
6. Menganalisis hubungan antara ekspresi perforin dengan skor derajat adenokarsinoma mamma.

1.4. MANFAAT PENELITIAN

Apabila *Ganoderma lucidum* pada penelitian ini terbukti dapat meningkatkan aktifitas sel mononuklear dalam menghambat pertumbuhan adenokarsinoma mamma mencit C3H, maka *Ganoderma lucidum* dapat dimanfaatkan sebagai komplemen terapi kanker baku.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Ganoderma lucidum*

Ganoderma lucidum yang mempunyai nama lain jamur *ling zhi* atau *reishi* telah dikenal sebagai obat yang di indikasikan untuk kelelahan, asma, *insomnia* dan batuk yang merupakan obat tradisional *cina* sejak lebih dari 4.000 tahun yang lalu.^{24,25,26}

Reishi mengandung bahan-bahan seperti *sterol*, *coumarin*, *mannitol*, *polisakarida*, *triterpenoid* dan *asam ganoderic*²⁷ Dari beberapa penelitian terakhir dilaporkan bahwa *Ganoderma lucidum* mempunyai efek *hepatoprotektif*^{9,10}, analgetik¹¹, anti inflamasi^{11,12} dan anti tumor.^{13,14} *Ganoderma Lucidum* juga terbukti menghambat tumor paru.¹⁵ *Ganoderma lucidum* dapat menstimulasi *sistem* kekebalan tubuh.^{13,14} *Ganoderma lucidum* juga terbukti dapat menghambat pertumbuhan tumor paru¹⁵ dan terbukti memiliki efek sitotoksik terhadap sel tumor pada *Leukemia Limfositik Kronik* (LLK).¹⁶ Polisakarida *Ganoderma lucidum* terbukti mempunyai aktifitas *antigenotoksik* dan promosi anti tumor secara *in vitro*, sehingga diperkirakan dapat berguna untuk kemoprevensi kanker.¹⁷

Penggunaan *Ganoderma lucidum* sebagai suplemen menyertai kemoterapi terbukti dapat mencegah kerontokan rambut, *fatigue*, supresi sumsum tulang,

mencegah kekambuhan, menurunkan resiko metastasis dan meningkatkan kualitas hidup penderita kanker.²⁸

Efek *imunomodulasi* dan antitumor dari *Ganoderma* telah dibuktikan dengan pemberian polisakarida dari buah segar *Ganoderma lucidum* (PSG) 100 µg/ml dalam kultur monosit-makrofag dan limfosit T manusia dengan hasil kadar IL-1β meningkat 5,1kali, TNFα meningkat 9,8 kali dan IL-6 meningkat 29 kali dibanding kelompok kontrol yang tidak diberi apa-apa. Pelepasan IFNγ oleh sel T juga meningkat pada pemberian PSG 25 – 100 µg/ml. Penelitian ini juga menunjukkan terjadinya penekanan proliferasi dan klonogenisitas HL 60 dan U937 *leukemic cell lines*. Sel lekemi dirangsang untuk berubah menjadi sel monosit matur yang mengexpresikan CD14 dan CD68.¹⁴ Beberapa poli sakarida tumbuhan (*Aloe barbadensis miller*, *Lentinuss edodes*, *Ganoderma lucidum* dan *coriolus versicolor*) mempunyai aktivitas *antigenotoxic* dan promosi anti tumor secara *in vitro* sehingga dapat diperkirakan sebagai bahan yang berguna untuk kemoprevensi cancer.¹⁴ *Ganoderma lucidum* juga terbukti menghambat tumor paru. Pada penelitian menggunakan binatang coba mencit C3H yang diberi *Ganoderma tsugae* dengan dosis 4-200mg/kg (dengan pelarut air) dengan cara pemberian *intraperitoneal* hasilnya aktivitas NK di lien meningkat dan IFNα, IFNβ, IFNγ serum meningkat.²⁹

2.2 . RESPON IMUNOLOGIK TERHADAP SEL TUMOR

Respon imun merupakan hasil Interaksi antara antigen dengan sel-sel *imunokompeten*, termasuk mediator-mediator yang dihasilkannya. Limfosit merupakan unit dasar terbentuknya respon imun karena mampu berdiferensiasi menjadi seri lainnya, juga karena berperan dalam mengenali sekaligus bereaksi dengan antigen.^{19,30} Limfosit T dapat bertindak sebagai *Efektor* dalam respon imun, tetapi dapat pula bertindak sebagai regulator respon imun karena kemampuannya dalam mempengaruhi aktivitas sel *imunokompeten* lainnya melalui limfokin yang dilepaskannya. Limfosit T-*helper* (Th) dan T-*supresor* (Ts) mempengaruhi produksi *imunoglobulin* oleh limfosit B. Setelah limfosit B berkontak dengan antigen kemudian berproliferasi, sebagian berdiferensiasi menjadi sel plasma yang berfungsi mensintesis serta mensekresi *imunoglobulin*, dan sebagian lagi menjadi limfosit B memori.^{19,30}

Induksi limfosit T dalam respon imun hampir selalu bersifat makrofag “dependent”. Makrofag berfungsi untuk memproses *imunogen* dan menyajikannya ke limfosit T spesifik (*immune T cells*). Pada penelitian *in vitro* dapat terjadi ikatan limfosit T dengan makrofag. Ikatan limfosit T dengan makrofag sangat dipengaruhi oleh *imunogen*. Jumlah limfosit T yang terikat pada makrofag sangat meningkat secara nyata pada makrofag yang terlebih dahulu dipaparkan dengan *imunogen* yang dipakai untuk imunisasi.

Respon Imun pada dasarnya terdiri dari tiga fase :

a. Fase *Kognitif*

Fase *Kognitif* dari respon imun terdiri dari pengikatan *imunogen* ke reseptor spesifik dari limfosit *mature* yang terjadi sebelum stimulasi imunogenik. Limfosit B memiliki molekul antibodi pada permukaannya yang dapat mengikat protein, polisakarida, atau lipid. Sedangkan limfosit T hanya mengenal peptida yang berikatan dengan MHC pada permukaan sel penyaji. Respon imun diawali dengan peristiwa masuknya *imunogen* dan penyajian *imunogen* tersebut ke reseptor dari limfosit.¹⁹

b. Fase Aktivasi

Fase aktivasi dari respon imun merupakan rangkaian kejadian dimana limfosit terinduksi sebagai konsekuensi dari pengenalan terhadap *imunogen* spesifik. Limfosit mengalami dua perubahan utama dalam respons terhadap *imunogen*. Pertama, limfosit spesifik berproliferasi sehingga jumlahnya bertambah. Kedua, limfosit tersebut berdiferensiasi menjadi sel yang berfungsi mengeliminasi imunogen asing.¹⁹ Interaksi makrofag yang menyajikan imunogen dengan limfosit T spesifik mengakibatkan makrofag mensekresikan IL-1 yang menstimulasi limfosit T *helper* sehingga menghasilkan IL-2. Limfosit T *helper* berproliferasi sebagai respons terhadap IL-2 tersebut.¹⁸ Limfosit T *helper* tersebut juga menghasilkan *interleukin* lain yang dapat menginduksi berbagai sel lain seperti limfosit B, makrofag, prekursor limfosit T sitotoksik, dan sel endotelial

c. Fase Efektor

Fase Efektor dari respons imun adalah tahap pada waktu limfosit telah teraktifkan oleh Imunogen dan dalam keadaan yang dapat berfungsi mengeliminasi imunogen tersebut.¹⁹ Pada fase Efektor, imunogen tidak lagi berperan kecuali sebagai suatu target untuk dihancurkan.^{19,34}

Fungsi sistem imun adalah fungsi protektif dengan mengenal dan menghancurkan sel-sel abnormal itu sebelum berkembang menjadi tumor atau membunuhnya kalau tumor itu sudah tumbuh. Peran sistem imun ini disebut *immune surveillance*, oleh karena itu maka sel-sel Efektor seperti limfosit B, T-sitotoksik dan sel NK harus mampu mengenal antigen tumor dan memperantarai/menyebabkan kematian sel-sel tumor.^{19,32}

Beberapa bukti yang mendukung bahwa ada peran sistem imun dalam melawan tumor ganas diperoleh dari beberapa penelitian, diantaranya yang mendukung teori itu adalah: 1) Banyak tumor mengandung infiltrasi sel-sel mononuklear yang terdiri atas sel T, Sel NK dan Makrofag; 2) tumor dapat mengalami regresi secara spontan; 3) tumor lebih sering berkembang pada individu dengan *imunodefisiensi* atau bila fungsi sistem imun tidak efektif; bahkan *imunosupresi* seringkali mendahului pertumbuhan tumor; 4) dilain pihak tumor seringkali menyebabkan *imunosupresi* pada penderita. Bukti lain yang juga mendukung bahwa tumor dapat merangsang *sistem* imun adalah ditemukannya limfosit berproliferasi dalam kelenjar getah bening yang merupakan *draining sites* dari pertumbuhan tumor

disertai peningkatan ekspresi MHC dan *Interseluler adhesion molecule* (ICAM) yang mengindikasikan sistem imun yang aktif.¹⁹

Sebaran limfosit disekitar sel kanker secara histologik mempunyai nilai *prognostik* yang baik karena kecepatan pertumbuhan sel kanker akan menurun. Secara *invitro*, beberapa sel imun disekitar sel kanker terbukti dapat membunuh sel kanker disekelilingnya.^{19,20} Hubungan antara banyaknya limfosit yang ditemukan diantara kelompok sel kanker secara histopatologi dengan prognosis penderita telah ditunjukkan pada kanker leher rahim.³³

Sel imun yang berada disekitar sel kanker yang berperan dalam perondaan terhadap kanker adalah limfosit T sitotoksik (CTL), Sel NK (*Natural Killer*) dan makrofag . Setelah mengenal sel kanker sebagai sel asing, ketiga sel imun tersebut akan menghancurkan sel kanker^{19,20,22}.

Sel CTL dan sel NK melakukan cara sitotoksitas yang sama yaitu dengan mengeluarkan perforin, sedangkan makrofag menggunakan cara fagositosis^{19,20}.

Dalam memproses antigen tumor *in vivo* akan melibatkan baik respon imun humoral maupun seluler. Sampai saat ini belum ada bukti antibodi secara sendiri dapat menghambat perkembangan / pertumbuhan sel tumor. Dengan demikian respon imun humoral dalam bentuk antibodi terhadap tumor selalu memerlukan bantuan efektor imun seluler.^{19,30}

Komponen efektor pada sistem imun yang memiliki kemampuan bereaksi dengan sel tumor ialah limfosit T, *antibody-dependent cellular cytotoxicity* (ADCC), sel NK dan makrofag.

2.3. Mekanisme efektor dalam melawan tumor

2.3.1. Peran makrofag dalam respon antitumor.

Makrofag juga berperan dalam pertahanan melawan sel tumor baik bertindak sebagai APC dalam mengolah dan mempresentasikan antigen tumor kepada sel *T helper*, maupun bertindak langsung sebagai efektor dengan melisis sel tumor.¹⁹

Makrofag yang berperan dalam mekanisme tersebut adalah makrofag aktif yaitu makrofag yang telah diaktifasi oleh MAF, suatu sitokin yang dihasilkan limfosit T yang distimulasi antigen. Makrofag yang tidak aktif telah dibuktikan tidak memiliki kemampuan melisis sel tumor.¹⁹

Seperti juga pada sel NK, mekanisme pengenalan sel tumor sasaran oleh makrofag juga belum jelas. Sedangkan kemampuan untuk berikatan dengan sel tumor terjadi karena sel makrofag juga memiliki reseptor Fc dari IgG, sehingga dapat bekerja sama dengan IgG dalam melisis sel tumor. Penyebab terjadinya lisis sel tumor disebabkan oleh pengaruh enzim lisosomal, metabolit yang reaktif terhadap oksigen dan NO. Makrofag aktif juga mensekresi sitokin antara lain IL-12 dan *Tumor Necrosis Factor* (TNF). IL-12 berperan memacu proliferasi dan

aktivasi sel T CD4+, sel T CD8+ serta sel NK. TNF, sesuai namanya mampu melisis sel tumor melalui cara : 1) TNF berikatan dengan reseptor permukaan dari sel tumor dan secara langsung melisis sel tumor. 2) TNF dapat menyebabkan nekrosis dari sel tumor dengan cara memobilisasi berbagai respon imun tubuh.¹⁹

2.3.2. Antibodi yang diproduksi limfosit B berperan dalam sitotoksitas sel tumor

Selain limfosit B berperan dalam membentuk antibodi spesifik terhadap antigen tumor, juga berperan dalam mengikat, memproses dan mempresentasikan antigen tumor untuk menginduksi sel Th agar menghasilkan respon pada sel tumor. Fungsi yang terakhir disebutkan adalah kapasitas limfosit B sebagai *Antigen Presenting Cells (APC)*.³² Meskipun pada tumor, imunitas selular lebih banyak berperan daripada imunitas humoral, tetapi tubuh membentuk juga antibodi terhadap antigen tumor. Antibodi tersebut ternyata dapat menghancurkan sel tumor secara langsung atau dengan bantuan komplemen, atau melalui sel Efektor ADCC yang memiliki reseptor Fc misalnya sel K dan makrofag (opsonisasi) atau dengan jalan mencegah adhesi sel tumor. Pada penderita kanker sering ditemukan kompleks imun, tetapi pada kebanyakan kanker sifatnya masih belum jelas.

Antibodi diduga lebih berperan terhadap sel yang bebas (leukemia, metastase tumor) dibanding terhadap tumor yang padat, mungkin dengan membentuk kompleks imun dan dengan demikian mencegah sitotoksitas sel T.¹⁹

2.3.3. Limfosit T sebagai Efektor anti tumor

Subpopulasi limfosit T, limfosit *T-helper* dan T- sitotoksik sama-sama berperan dalam mengeliminasi antigen tumor. Sel yang mengandung antigen tumor akan mengekspresikan antigennya bersama molekul MHC kelas I yang kemudian membentuk kompleks melalui TCR (*T-cell Receptor*) dari sel T- sitotoksik (CD8), mengaktivasi sel T- sitotoksik untuk menghancurkan sel tumor tersebut. Sebagian kecil dari sel tumor juga mengekspresikan antigen tumor bersama molekul MHC kelas II, sehingga dapat dikenali dan membentuk kompleks dengan limfosit *T-helper* (CD4) dan mengaktivasi sel *T-helper* terutama subset Th1 untuk mensekresi limfokin IFN- γ dan TNF- α di mana keduanya akan merangsang sel tumor untuk lebih banyak lagi mengekspresikan molekul MHC kelas I, sehingga akan lebih mengoptimalkan sitotoksisitas dari sel T- sitotoksik (CD8).^{19,34}

Pada banyak penelitian terbukti bahwa sebagian besar sel Efektor yang berperan dalam mekanisme anti tumor adalah sel T CD8, yang secara fenotip dan fungsional identik dengan CTL yang berperan dalam pembunuhan sel yang terinfeksi virus atau sel *alogenik*. CTL dapat melakukan fungsi *surveillance* dengan mengenal dan membunuh sel-sel potensial ganas yang mengekspresikan peptida yang berasal dari *protein* seluler mutant atau protein virus onkogenik yang dipresentasikan oleh molekul MHC kelas I. Limfosit T yang menginfiltrasi jaringan tumor (*Tumor Infiltrating Lymphocyte* = TIL) juga mengandung sel CTL

yang memiliki kemampuan melisis sel tumor. Walaupun respon CTL mungkin tidak efektif untuk menghancurkan tumor, peningkatan respon CTL merupakan cara pendekatan terapi antitumor yang menjanjikan dimasa mendatang. Sel T CD4⁺ pada umumnya tidak bersifat sitotoksik bagi tumor, tetapi sel-sel itu dapat berperan dalam respon antitumor dengan memproduksi berbagai *sitokin* yang diperlukan untuk perkembangan sel-sel CTL menjadi sel Efektor. Di samping itu sel T CD4⁺ yang diaktifasi oleh antigen tumor dapat mensekresi TNF dan IFN γ yang mampu meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I dan sensitivitas tumor terhadap lisis oleh sel CTL. Ada juga kemungkinan bahwa sel CD4⁺ yang spesifik tumor meningkatkan respon DTH terhadap tumor. Sebagian kecil tumor yang mengekspresikan MHC kelas II dapat mengaktifasi sel CD4⁺ spesifik tumor secara langsung, yang lebih sering terjadi adalah bahwa APC professional yang mengekspresikan molekul MHC kelas II meng-fagositosis, memproses dan menampilkan protein yang berasal dari se-sel tumor yang mati kepada sel T CD4⁺, sehingga terjadi aktivasi sel-sel tersebut.¹⁹

2.3.4. Sel Natural Killer sebagai efektor anti tumor

Sel NK merupakan komponen utama dari perondaan imun, yang dapat bekerja sebagai sel efektor dari imunitas natural maupun spesifik / adaptif. Mekanisme Efektor sel NK mirip dengan sel T- sitotoksik (CD8), yang membedakan adalah bahwa sel NK melakukan sitotoksitas terhadap sel tumor

tanpa melalui ekspresi antigen tumor bersama molekul MHC kelas I “ (MHC-unrestricted manner)”. Secara *in vitro*, sel NK dapat melisis sel terinfeksi virus dan *cell line* dari tumor terutama tumor hematopoetik. Sebagian dari populasi sel NK dapat melisis sel target yang diopsonisasi oleh antibodi, terutama dari kelas IgG karena sel NK memiliki reseptor FcγRIII atau CD16 untuk Fc dari IgG. Kapasitas tumorisidal dari sel NK akan ditingkatkan oleh berbagai *sitokin*, diantaranya IFN, TNF, IL-2 dan IL-12. Konsep ini diadaptasikan dalam imunoterapi tumor menggunakan LAK (*Lymphokine-activated Killer*), yaitu sel mononuklear perifer yang dikultur secara *in vitro* dengan penambahan IL-2 dosis tinggi.^{19,35}

Sitotoksitas alami yang diperankan oleh sel NK merupakan mekanisme efektor yang sangat penting dalam melawan tumor. Sel NK adalah sel efektor dengan sitotoksitas spontan terhadap berbagai jenis sel sasaran; sel-sel efektor ini tidak memiliki sifat-sifat klasik dari makrofag, granulosit maupun CTL, dan sitotoksitasnya tidak bergantung pada MHC.³⁶

Sel NK dapat berperan baik dalam respons imun nonspesifik maupun spesifik terhadap tumor, dapat diaktivasi langsung melalui pengenalan antigen tumor atau sebagai akibat aktivitas sitokin yang diproduksi oleh limfosit T spesifik tumor. Mekanisme lisis yang digunakan sama dengan mekanisme yang digunakan oleh sel T CD8⁺ untuk membunuh sel, tetapi sel NK tidak mengekspresikan TCR dan mempunyai rentang spesifisitas yang lebar. Sel Nk dapat membunuh sel terinfeksi

virus dan sel-sel tumor tertentu, khususnya tumor hemopoetik, *in vitro*. Sel NK tidak dapat melisiskan sel yang mengekspresikan MHC, tetapi sebaliknya sel tumor yang tidak mengekspresikan MHC, yang biasanya terhindar dari lisis oleh CTL, justru merupakan sasaran yang baik untuk dilisiskan oleh sel NK. Sel NK dapat diarahkan untuk melisiskan sel yang dilapisi *immunoglobulin* karena ia mempunyai reseptor Fc (FcRIII atau CD 16) untuk molekul IgG.¹⁹ Disamping itu penelitian-penelitian terakhir mengungkapkan bahwa pengikatan sel NK pada sel sasaran juga dapat terjadi melalui reseptor khusus yang berbeda dengan reseptor Fc, yaitu reseptor NKR-P1, yang mengikat molekul semacam lektin.³⁶

Aktivitas sel NK dihambat oleh antigen HLA-G, apabila diekspresikan oleh sel tumor, mengakibatkan sel tumor terhindar dari upaya lisis oleh sel NK. Walaupun antigen HLA-G jarang diekspresikan pada tumor, transkripsinya berupa mRNA cukup sering dijumpai pada berbagai jenis tumor, sehingga diduga ekspresi antigen HLA-G dikontrol ditingkat pasca transkripsi. Apabila tumor tidak mengekspresikan antigen HLA-G, sulit baginya untuk menghindarkan lisis oleh sel NK, sekalipun tumor telah berupaya menghindar dari lisis oleh sel T sitotoksik dengan tidak mengekspresikan antigen MHC yang lain³⁶.

Kemampuan sel NK membunuh sel tumor ditingkatkan oleh sitokin, termasuk IFN, TNF, IL-2 dan IL-12. Karena itu peran sel NK dalam aktivitas anti tumor bergantung pada rangsangan yang terjadi secara bersamaan pada sel T dan makrofag yang memproduksi sitokin tersebut¹⁹. Ketiga jenis IFN (α, β, γ) dapat

meningkatkan fungsi sel NK. IFN mengubah pre-NK menjadi sel NK yang mampu mengenal dan melisis sel sasaran, mempermudah Interaksi dengan dan lisis sel sasaran.³ Sel NK mungkin berperan dalam *immune surveillance* terhadap tumor yang sedang tumbuh, khususnya tumor yang mengekspresikan antigen virus.¹⁹ Aktivitas sel NK sering dihubungkan dengan prognosis. Beberapa penelitian mengungkapkan bahwa ada korelasi antara penurunan kemampuan sitotoksitas sel NK dengan peningkatan resiko metastasis. Dari penelitian-penelitian itu disimpulkan bahwa sitotoksitas alami dapat berperan dalam mencegah pertumbuhan kanker dan metastasis.³⁶

Yang menarik adalah peran sel NK yang diaktifkan dengan stimulasi IL-2 dalam membunuh sel tumor. Sel-sel itu yang disebut *lymphokine activated killer cells* (LAK cells) dapat diperoleh *in vitro* dengan memberikan IL-2 dosis tinggi pada biakan sel-sel limfosit darah perifer atau sel-sel *Tumor Infiltrating Lymphocytes* (TIL) yang berasal dari penderita kanker. Sel-sel yang diaktifkan oleh limfokin (LAK cells) menunjukkan peningkatan aktivitas sitotoksik yang sangat jelas. Besar kemungkinan bahwa sel LAK dapat digunakan dikemudian hari dalam imunoterapi adaptif.^{19,35}

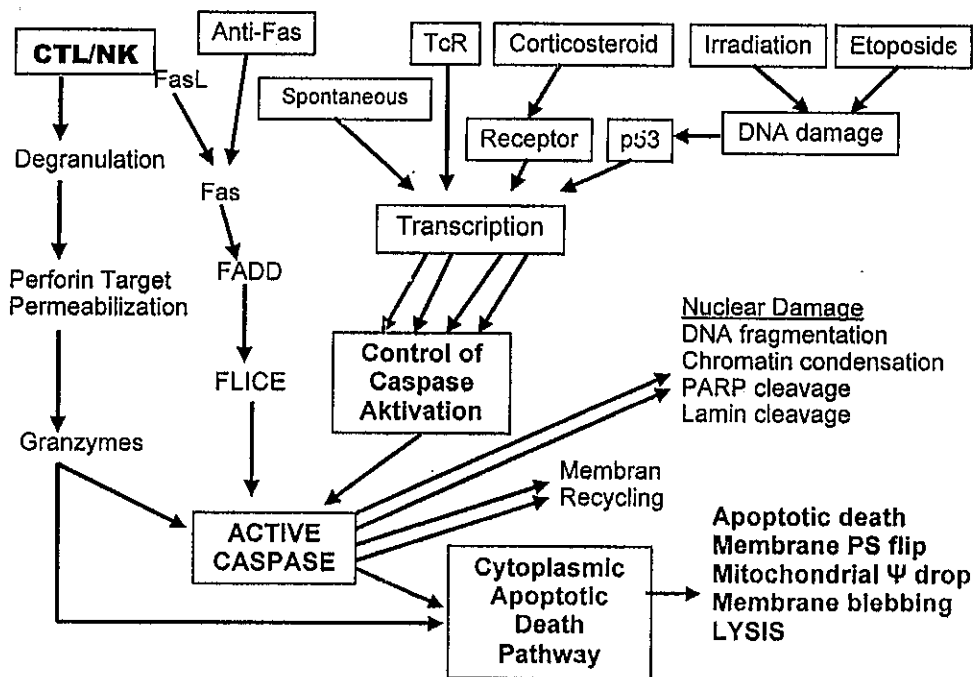
Sel NK juga mempunyai peran penting dalam mencegah metastasis dengan meng-eliminasi sel tumor yang terdapat dalam sirkulasi. Hal itu dibuktikan dengan berbagai penelitian. Salah satu diantaranya mengungkapkan bahwa 90-99% sel tumor yang dimasukkan intravena akan hilang dalam 24 jam pertama,

dan hal ini mempunyai hubungan bermakna dengan jumlah dan aktivitas sel NK. Percobaan menggunakan NK yang di-aktivasi dengan cyclophosphamide (cy) menunjukkan bahwa sel-sel itu gagal mencegah metastasis.³⁶

Setelah mengenal sel tumor dengan caranya masing-masing, CTL dan sel NK melepas granula azurofilik. Granula ini akan menyelubungi sel target, kemudian akan bersatu dengan membrane sel target (*eksositosis*).^{19,37} Granula CTL dan sel NK mengandung *perforin*, *sitotoksin*, *serine esterase (granzyme)* dan *proteoglikan*.^{19,38} Perforin akan menimbulkan lubang pada membran sel target (sel tumor), dimana lubang tersebut merupakan pintu masuk bagi molekul sitotoksik lainnya dalam sitoplasma dan inti sel yang menyebabkan kematian dari sel target.^{19,23,37,38,39}

Dalam membunuh sel target ini melibatkan ekspresi permukaan FAS Ligan yang dipengaruhi reseptor, yang dapat mengakibatkan *cross link* sel target sehingga memicu kematian endogen (dikaitkan dengan apoptosis)^{37,38,39} secara bersama-sama jalur granula (*eksositosis* dan FASL). Granzym akan mengaktifkan procaspase endogen pada sel target. Aktifitas *caspase* merupakan bagian dari jalur kematian *apoptotic* pada umumnya. *Inhibitor caspase* akan menghambat *apoptosis* dari jalur rusaknya nucleus; tetapi tidak menghambat apoptosis karena kerusakan yang bukan dari kerusakan inti tetapi hilangnya mitokondria potensial.³⁷

CTL dan sel NK tidak akan terlisis oleh perforinnya sendiri yang lepas karena ikatan antara CTL dan NK lemah terhadap perforin (oleh karena histon H2B)³⁸.



Gambar 1. Jalur Kematian Sel Target yang dipengaruhi oleh CTL/NK³⁷

2.4. PERAN BIOLOGIK *INTERLEUKIN-2*

Interleukin-2 merupakan glikoprotein dengan berat molekul berkisar antara 14 hingga 17 kD. Glikoprotein ini dikode oleh gen tunggal yang terletak pada kromosom nomor 4. Sitokin ini terutama dihasilkan oleh sel CD4⁺ bila teraktivasi oleh antigen, sedikit dihasilkan oleh sel CD8⁺.

Fungsi utama IL-2 adalah mempengaruhi sel CD4⁺ dan CD8⁺ yang memproduksinya (autokrin) atau pada sel tetangganya (parakrin). Efek yang ditimbulkan oleh IL-2 adalah memacu perkembangan sel T dari fase G1 ke fase sintesa, merangsang tahap sintesa IL-2 selanjutnya oleh sel T dalam waktu 24 jam setelah teraktivasi akan merangsang pembentukan sitokin lain yaitu *interferon* gamma dan limfotoksin, juga meningkatkan sintesa p55 yaitu reseptor IL-2 sendiri, meningkatkan pertumbuhan dan fungsi sitolitik sel NK. Oleh karena fungsinya sangat berkaitan dengan sistem imun maka kuantitas sintesis IL-2 sangat menentukan respon imun.¹⁹

2.5. ANATOMI DAN HISTOLOGI KELENJAR PAYUDARA

Kelenjar ini khas untuk golongan mamalia. Jumlah kelenjar berbeda tergantung jenis spesies. Pada manusia terdapat satu pasang kelenjar. Secara embriologik, payudara manusia berasal dari penebalan ektodermal pada sisi dada dari ketiak kearah vulva pada kedua sisinya. Penebalan bilateral ini (milk streak) timbul pada minggu keenam kehidupan mudigah (*foetal life*). Pada minggu kesembilan, penebalan ini menjadai atrofi, kecuali pada daerah dada dan puncak papilla nampak sebagai daerah proliferasi sel basal. Akhir bulan ketiga gestasi, sel skuamosa dari permukaan mulai *invasi* kepuncak papila. Saluran kelenjar payudara tumbuh berasal dari daerah ini dan berakhir pada puncak lobular yang mana proliferasi keasini seiring dengan maturitas seksual. Kelenjar payudara

dewasa terletak diantara lapisan luar dan dalam fascia pektoralis superfisialis dinding dada depan, berada pada celah iga depan ke dua sampai ke tujuh. Dimensi kepala-ekor antar 10 -12 cm, dan ketebalan kelenjar maksimum 3 – 5 cm. Payudara non laktasi mempunyai berat 150 – 200 gram dan kelenjar yang mengalami laktasi mempunyai berat 400 – 500 gram. Kelenjar payudara merupakan kelenjar tubuloalveolar terdiri atas 15 – 25 lobus yang berfungsi mengeluarkan air susu. Setiap lobus terpisah oleh jaringan ikat padat dan banyak jaringan lemak yang sesungguhnya merupakan kelenjar itu sendiri dengan saluran laktiferus ekskretorius. Saluran ini mempunyai panjang 2 – 4,5 cm yang bermuara pada papila mamma, terdapat 15 – 25 muara dan setiap muara berdiameter 0,5 mm. Susunan histologik kelenjar payudara beragam sesuai jenis kelamin, umur dan keadaan fisiologiknya.⁴⁰

2.6. KANKER PAYUDARA

2.6.1. *Insidens* dan Epidemiologi

Kanker payudara merupakan keganasan yang banyak diderita wanita saat ini. Di Amerika pada tahun 1993, angka kejadian kanker adalah 28 per 100.00 populasi. Singapura pada tahun 1990, kanker payudara merupakan urutan teratas dari seluruh keganasan pada wanita dengan insidens 500 kasus baru dan diperkirakan menjadi 1.000 kasus baru pada tahun 2000⁵. Di India pada tahun 1990, kanker payudara menduduki urutan kedua dengan frekuensi 15,81% dari

seluruh keganasan pada wanita atau 14,15 per 100.000 populasi⁶. Data Badan Registrasi Kanker Ikatan Ahli Patologi Indonesia (BRK-IAPI) 1994 memperlihatkan bahwa frekwensi kanker payudara pada wanita di Indonesia (12,60%) menduduki urutan kedua tertinggi setelah kanker rahim (18,86%).³ Di Semarang pada tahun 2001, ditemukan kasus kanker payudara sebanyak 769 kasus dan insiden ini berada pada urutan tertinggi kedua setelah kanker mulut rahim. Insiden puncak pada kelompok umur 45-54 tahun insiden semakin meningkat sesuai dengan bertambahnya umur. Secara Histopatologi kasus yang tertinggi adalah tipe karsinoma duktus infiltratif (88,3%)⁴.

2.6.2. Etiologi dan patogenesis

Kanker mamma dapat terjadi pada semua golongan umur dengan puncak insidensi pada saat atau sesudah menopause. Kanker mamma lebih sering menyerang mamma daripada mamma kanan. Hal ini mungkin disebabkan oleh karena pada umumnya mamma sebelah kiri lebih besar daripada sebelah kanan dan frekuensi terbanyak terjadi pada kuadran lateral atas mamma.²²

Ada 3 pengaruh penting pada kanker mamma :

a. Faktor genetik

Faktor genetik berpengaruh dalam peningkatan terjadinya kanker mamma. Pada percobaan tikus dengan galur sensitif kanker, melalui persilangan genetik didapatkan tikus yang terkena kanker . Ada faktor turunan pada suatu

keluarga yang terkena kanker mamma. kelainan ini diketahui terletak dilokus kecil di kromosom 17q21 pada kanker mamma yang timbul saat usia muda.^{22,41}

b. Hormon

Kelebihan hormon *estrogen endogen* atau lebih tepatnya terjadi ketidakseimbangan hormon terlihat sangat jelas pada kanker payudara. Banyak faktor resiko yang dapat disebutkan seperti masa reproduksi yang lama, nulipara, dan usia tua saat mempunyai anak pertama akan meningkatkan estrogen pada siklus menstruasi. Wanita *pasca menopause* dengan tumor ovarium fungsional dapat terkena kanker payudara karena adanya hormon estrogen berlebihan. Suatu penelitian menyebutkan bahwa kelebihan jumlah *estrogen* di air seni, frekuensi ovulasi, dan umur saat menstruasi dihubungkan dengan meningkatnya resiko terkena kanker mamma. Epitel mamma normal memiliki reseptor estrogen dan progesteron. Kedua reseptor ditemukan pada sebagian besar kanker payudara. Berbagai bentuk *growth promoters (transforming growth factor-alpha / epithelial growth factor, platelet-derived growth factor), fibroblast growth factor* dan *growth inhibitor* disekresi oleh sel kanker payudara manusia. Banyak penelitian menyatakan bahwa *growth promoters* terlibat dalam mekanisme *autokrin* dari tumor. Produksi GF tergantung pada hormon *estrogen*, sehingga Interaksi antara hormon di

sirkulasi , reseptor hormon di sel kanker dan GF *autokrin* merangsang sel tumor menjadi lebih progresif.²²

c. Faktor lingkungan

Pengaruh lingkungan diduga karena berbagai faktor antara lain : alkohol, diet tinggi lemak, kecanduan minum kopi, dan infeksi virus. Hal tersebut mungkin mempengaruhi onkogen dan gen supresi tumor dari kanker payudara.²²

2.6.3. Klasifikasi

Berdasarkan gambaran histologis, WHO membuat klasifikasi kanker mamma sebagai berikut.²¹

a. Kanker Payudara Non Infiltratif

1. Karsinoma intraduktus

Karsinoma intraduktus adalah karsinoma yang mengenai duktus disertai infiltrasi jaringan stroma sekitar. Terdapat 5 subtype dari karsinoma intraduktus, yaitu: komedokarsinoma, solid, kribriiformis, papiler, dan mikrokapiler.

Komedokarsinoma ditandai dengan sel-sel yang berproliferasi cepat dan memiliki derajat keganasan tinggi. Karsinoma jenis ini dapat meluas ke duktus ekskretorius utama, kemudian menginfiltrasi *papilla* dan *areola*, sehingga dapat menyebabkan penyakit Paget pada payudara.

2. Karsinoma lobular *in situ*

Karsinoma ini ditandai dengan pelebaran satu atau lebih duktus terminal dan atau duktulus, tanpa disertai infiltrasi ke dalam stroma. Sel-sel berukuran lebih besar dari normal, inti bulat kecil dan jarang disertai mitosis.

b. Kanker Payudara Infiltratif

1. Karsinoma duktus infiltratif

Karsinoma jenis ini merupakan bentuk paling umum dari kanker mamma. Karsinoma duktus infiltratif merupakan 65-80% dari karsinoma mamma. Secara histologis, jaringan ikat padat tersebar berbentuk sarang atau beralur-alur. Sel berbentuk bulat sampai poligonal, bentuk inti kecil dengan sedikit gambaran mitosis. Pada tepi tumor, tampak sel kanker mengadakan infiltrasi ke jaringan sekitar seperti sarang, kawat atau seperti kelenjar. Jenis ini disebut juga sebagai *infiltrating ductus carcinoma not otherwise specified (NOS)*, *scirrhous carcinoma*, *infiltrating carcinoma*, atau *carcinoma simplex*.

2. Karsinoma lobular invasive

Jenis ini merupakan karsinoma infiltratif yang tersusun atas sel-sel berukuran kecil dan seragam dengan sedikit pleiomorfisme. Karsinoma lobular invasive biasanya memiliki tingkat mitosis rendah. Sel infiltratif biasanya tersusun konsentris disekitar duktus berbentuk seperti target. Sel tumor dapat berbentuk *signet-ring*, *tubuloalveolar*, atau *solid*.

3. Karsinoma musinosum

Pada karsinoma musinosum ini didapatkan sejumlah besar mucus *intra* dan ekstraseluler yang dapat dilihat secara makroskopis maupun mikroskopis. Secara histologis, terdapat 3 bentuk sel kanker. Bentuk pertama, sel tampak seperti pulau-pulau kecil yang mengambang dalam cairan musin basofilik. Bentuk kedua, sel tumbuh dalam susunan kelenjar berbatas jelas dan lumennya mengandung musin. Bentuk ketiga terdiri dari susunan jaringan yang tidak teratur berisi sel tumor tanpa diferensiasi, sebagian besar sel berbentuk *signert-ring*.

4. Karsinoma meduler

Sel berukuran besar berbentuk polygonal/lonjong dengan batas sitoplasma tidak jelas. Diferensiasi dari jenis ini buruk, tetapi memiliki prognosis lebih baik daripada karsinoma duktus infiltratif. Biasanya terdapat *infiltrasi* limfosit yang nyata dalam jumlah sedang diantara sel kanker, terutama dibagian tepi jaringan kanker.

5. Karsinoma papiler invasive

Komponen *invasive* dari jenis karsinoma *ini* berbentuk papiler.

6. Karsinoma tubuler

Pada karsinoma tubuler, bentuk sel teratur dan tersusun secara tubuler selapis, dikelilingi oleh stroma fibrous. Jenis ini merupakan karsinoma dengan diferensiasi tinggi.

7. Karsinoma adenokistik

Jenis ini merupakan karsinoma *invasive* dengan karakteristik sel yang berbentuk kribriiformis. Sangat jarang ditemukan pada payudara.

8. Karsinoma apokrin

Karsinoma ini didominasi dengan sel yang memiliki sitoplasma *eosinofilik*, sehingga menyerupai sel apokrin yang mengalami metaplasia. Bentuk karsinoma apokrin dapat ditemukan juga pada jenis karsinoma payudara yang lain²².

Berdasarkan gambaran gejala klinik, *The American Joint Comitte* menyusun pentahapan kanker untuk karsinoma payudara sebagai berikut:

- a. Stadium Tis : kanker *insitu* (lobular insitu, intra duktus murni, dan penya kit paget papilla putting susu tanpa tumor yang dapatdiraba).
- b. Stadium I : Tumor dengan diameter terbesar 2 cm atau kurang dan tanpa penyebaran jauh atau regional.
- c. Stadium II : Tumor dengan diameter lebih besar dari 2 cm tetapi kurang dari 5 cm pada ukuran terbesar, tetapi tanpa penyebaran jauh.
- d. Stadium III(A) : Tumor dengan diameter 5 cm atau lebih, dengan atau tanpa penyebaran homolateral regional (lokal) yang dapat atau tidak terfiksasi, tetapi tanpa penyebaran jauh.
- e. Stadium III(B) : Tumor dengan diameter 5 cm atau lebih, dengan metastasis homolateral ke kelenjar getah bening supraklavikular dan intraklavikular.

intraklavikular.

f. Stadium IV : Tumor untuk setiap ukuran dengan atau tanpa penyebaran regional tapi dengan tanda-tanda metastasis jauh.

Apabila dilihat dari derajat histopatologik, adenokarsinoma mamma menurut "Nottingham Modification of The Bloom- Richardson System"¹⁴³

Skor	1	2	3
Formasi tubuler	Terdapat formasi Tubuler > 75 %	Terdapat formasi Tubuler 10 -75 %	Terdapat formasi Tubuler < 10 %
Inti pleimorfik	Terdapat variasi Minimal dari bentuk dan ukuran inti	Terdapat variasi moderat dari bentuk dan ukuran Inti	Terdapat variasi yang nyata dari bentuk dan ukuran Inti
Jumlah mitosis/ LPK	0-5	6-10	>11

Skor total yang dapat menunjukkan derajat keganasan kanker payudara sebagai berikut :

Skor total

Derajat I (keganasan rendah) : 3-5

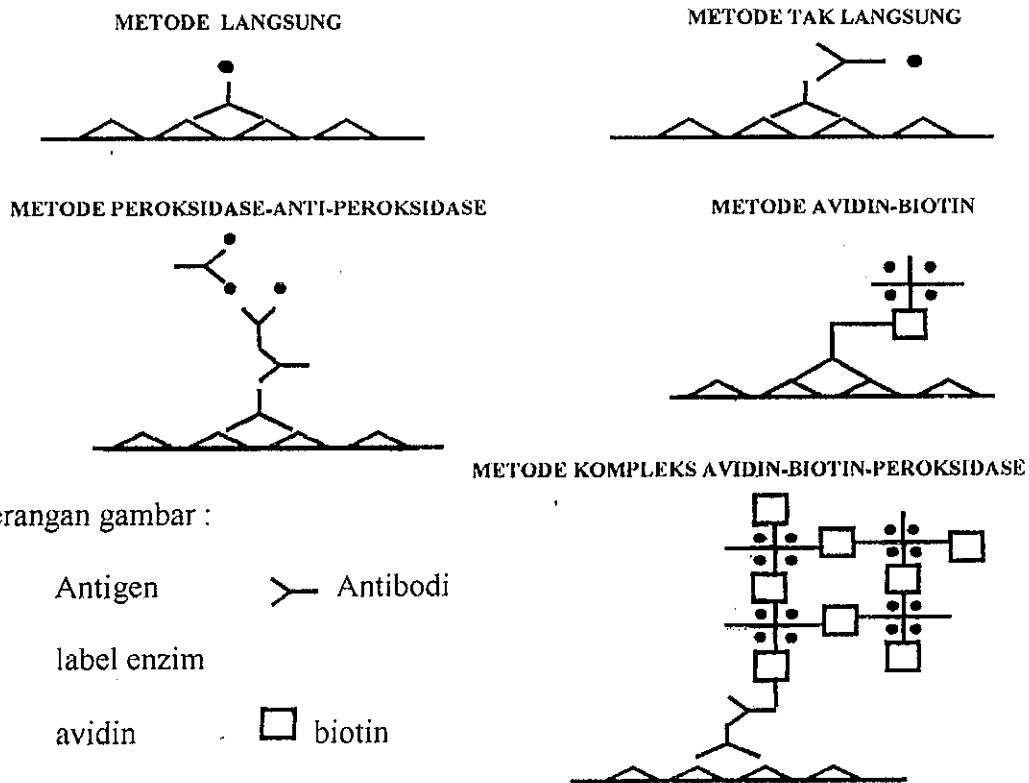
Derajat II (keganasan sedang) : 6-7

Derajat III (keganasan tinggi) : 8-9

2.7. PEWARNAAN IMUNOHISTOKIMIA

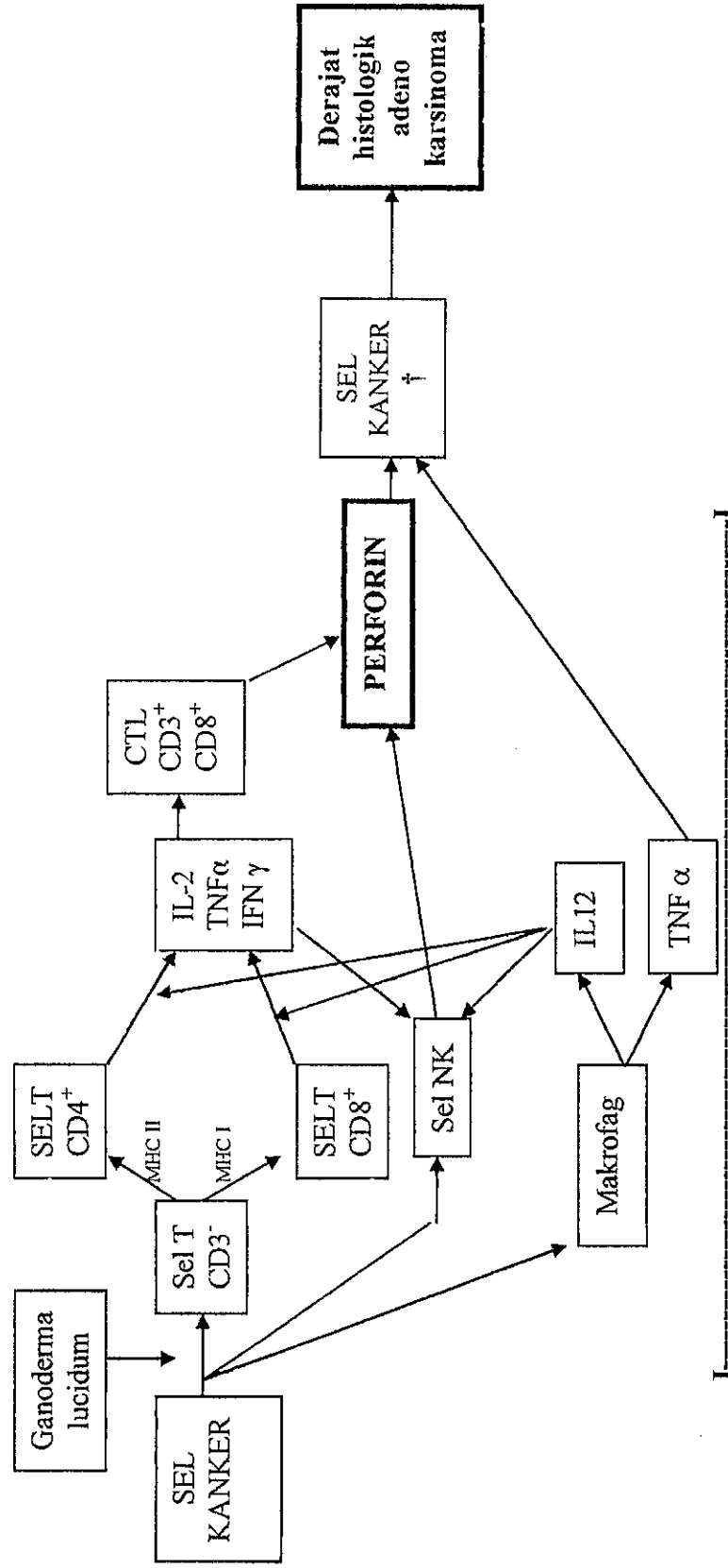
Prinsip pewarnaan imunohistokimia / imunoenzim adalah reaksi antigen dan antibodi dimana antibodi dilabel oleh suatu enzim yang akan tercat dengan suatu kromogen. Ikatan enzim-antibodi menyebabkan perubahan

warna yang terlihat dengan pemberian substrat dan kromogen pada jaringan. Metode pewarnaan ada 2 macam yaitu (1) langsung yang kurang sensitive dibanding (2) tak langsung. Penelitian ini memakai jenis tak langsung dengan teknik *Avidin-Biotin-peroxidase Complex* (ABC) yang dapat dipakai pada *paraffin embedded tissue* dengan fiksasi formalin. Antibodi primer diikat dengan *Avidin-Biotin-peroxidase conjugate* oleh antibodi sekunder. Ikatan ini menunjukkan lokasi antigen yang berwarna coklat pada potongan jaringan jika diberi kromogen Diaminobensen (DAB). Selain dapat mengetahui lokasi terdapatnya antigen pada jaringan, sediaan / preparat yang diwarnai dengan imunohistokimia ini dapat disimpan lama.⁴⁴

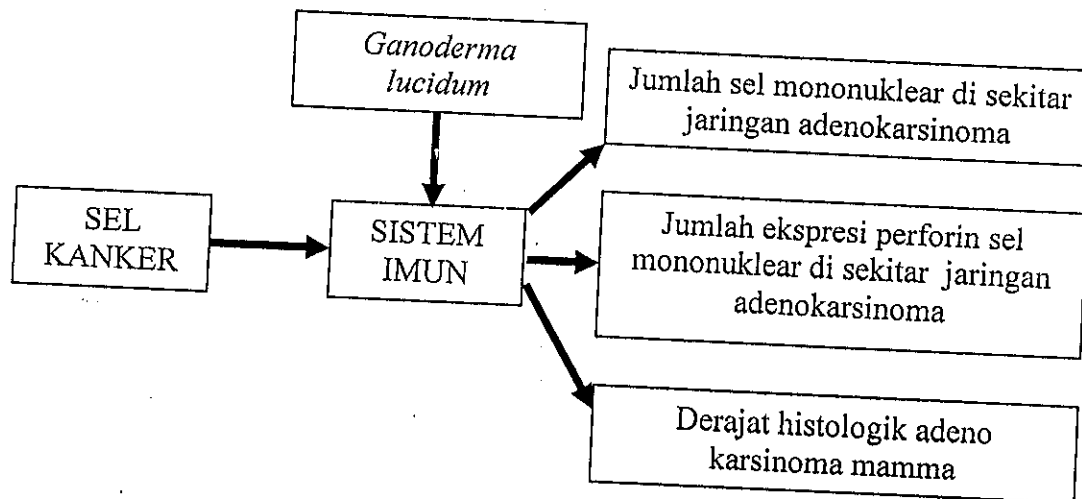


2.8. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

2.8.1. KERANGKA TEORI



2.8.2. KERANGKA KONSEP



2.8.3. HIPOTESIS

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini ialah :

1. Jumlah sel mononuklear disekitar jaringan adenokarsinoma mamma mencit C3H lebih banyak pada mencit yang diberi *Ganoderma lucidum*.
2. Jumlah ekspresi perforin sel mononuklear disekitar jaringan adenokarsinoma mamma lebih banyak pada mencit C3H yang diberi *Ganoderma lucidum*
3. Derajat histopatologik adenokarsinoma mamma mencit C3H yang diberi *Ganoderma lucidum* terlihat lebih rendah.
4. Terdapat hubungan antara jumlah sebulan sel mononuklear disekitar jaringan adenokarsinoma mamma dengan jumlah ekspresi perforin.

5. Terdapat hubungan antara jumlah sebukan sel mononuklear disekitar jaringan adenokarsinoma mamma dengan skor derajat adenokarsinoma mamma.
6. Terdapat hubungan antara skor ekspresi perforin dengan skor derajat adenokarsinoma mamma.

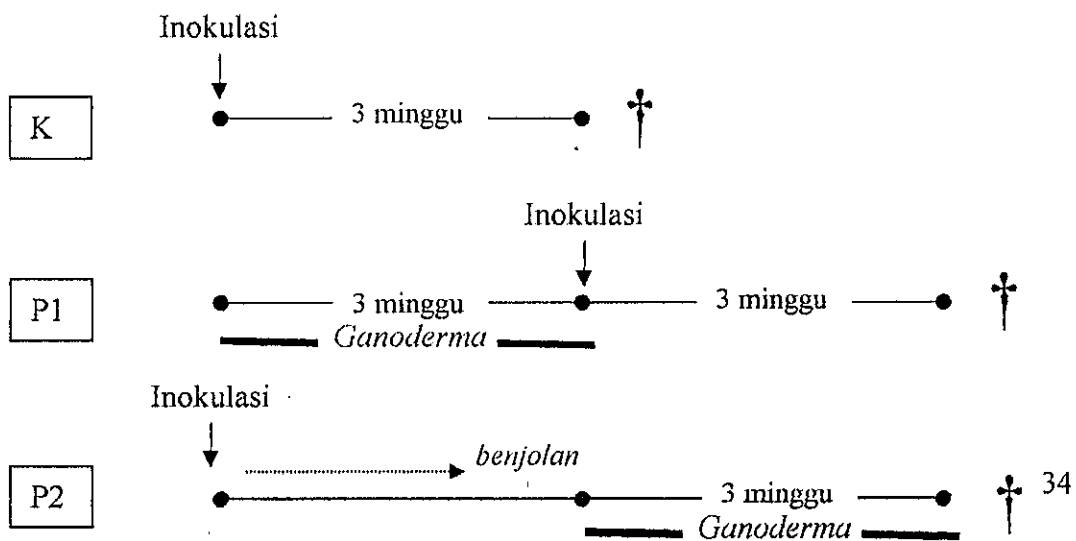
BAB III
METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan penelitian :

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan disain "*Post test only control group design*". Kelompok penelitian dibagi menjadi 3 yaitu kelompok kontrol (K), Perlakuan 1 (P1), Perlakuan 2 (P2) Adapun pembagian kelompok perlakuan adalah sebagai berikut:

- K : Kelompok control, mencit yang di inokulasi sel kanker.
- P1 : Kelompok perlakuan 1, mencit yang mendapat *Ganoderma lucidum*, kemudian diinokulasi sel kanker.
- P2 : Kelompok perlakuan 2, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan kemudian mendapat *Ganoderma lucidum*.

Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut:



3.2. SAMPEL PENELITIAN

Hewan coba adalah mencit strain C3H yang diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Kriteria Inklusi:

- a. Mencit betina
- b. Strain C3H
- c. Berat badan 20-30gram
- d. Selama observasi 7 hari sebelum perlakuan tidak sakit.
- e. Tidak ada abnormalitas anatomis yang tampak

Kriteria Eksklusi:

- a. Berat badan kurang dari 20 gram
- b. Selama observasi 7 hari mencit tampak sakit (gerakan tidak aktif)
- c. Terdapat abnormalitas anatomi .
- d. Mencit mati selama perlakuan berlangsung (*drop out*)

Besar sampel menurut WHO tiap kelompok minimal 5 ekor,⁴² pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok 8 ekor mencit.

Randomisasi: 24 mencit dikelompokkan secara random menjadi 3 kelompok yaitu:

- Kelompok K : 8 mencit
- Kelompok P1 : 8 mencit
- Kelompok P2 : 8 mencit.

3.3. WAKTU DAN LOKASI PENELITIAN

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 6 bulan.

Perlakuan pada mencit dilakukan di Laboratorium Histologi FK UNDIP, proses pengambilan jaringan dilakukan di Laboratorium Bioteknologi FK UNDIP, proses pembuatan blok parafin sampai pewarnaan HE dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang dan Pewarnaan imunoperoksidase dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FK UGM/ RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta.

3.4. VARIABEL PENELITIAN

3.4.1. Variabel bebas

Sebagai variabel bebas adalah pemberian *Ganoderma lucidum*

3.4.2. Variabel perantara

Sebagai variabel perantara adalah sel tumor yang diinokulasi pada mencit.

3.4.3. Variabel tergantung

Sebagai variabel tergantung adalah :

1. Sebaran sel mononuklear sekitar jaringan tumor adalah: sebaran sel mononuklear sekitar jaringan tumor (pembesaran 400X). Dengan pemberian nilai dilakukan sebagai berikut³³ :

- Tidak ada.....0
- Sedikit (sampai dengan ¼ LPB).....1
- Sedang (1/4 sampai dengan 1/2 LPB)..... 2
- Banyak (lebih dari 1/2 LPB).....3

2. Produk Perforin dengan pewarnaan *antibody monoclonal* anti-perforin pada seluruh jaringan tumor adenokarsinoma.

Skor produksi perforin sel mononuklear:

Skor 1 = Jumlah sel mononuklear yang tercat < 5 sel

Skor 2 = Jumlah sel mononuklear yang tercat 5 sel - < 25%

Skor 3 = Jumlah sel mononuklear yang tercat > 25% - < 50%

Skor 4 = Jumlah sel mononuklear yang tercat >50% - < 75 %

Skor 5 = Jumlah sel mononuklear yang tercat > 75% - 100%

3. Derajat Histologis kanker mamma menurut *Nottingham Modification of The Bloom- Richardson System*⁴³

Skor	1	2	3
Formasi tubuler	Terdapat formasi Tubuler > 75 %	Terdapat formasi Tubuler 10 –75 %	Terdapat formasi Tubuler < 10 %
Inti pleimorfik	Terdapat variasi Minimal dari bentuk dan ukuran inti	Terdapat variasi moderat dari bentuk dan ukuran Inti	Terdapat variasi yang nyata dari bentuk dan ukuran Inti
Jumlah mitosis/ LPK	0-5	6-10	>11

Skor total yang dapat menunjukkan derajat keganasan kanker payudara sebagai berikut :

Skor total

- Derajat I (keganasan rendah) : 3-5
 Derajat II (keganasan sedang) : 6-7
 Derajat III (keganasan tinggi) : 8-9

3.4.4. Definisi operasional

1. Pertumbuhan kanker mamma dilihat secara mikroskopis: pertumbuhan kanker mamma mencit C3H yang diamati setelah pemberian perlakuan dan dinilai berdasarkan derajat histologis kanker payudara.
2. Derajat histologis kanker mamma: penggolongan kanker payudara menjadi 3 derajat keganasan, yaitu: Derajat I (keganasan rendah dengan skor 3-5), Derajat

II (keganasan sedang dengan skor 6-7), dan Derajat III (keganasan tinggi dengan skor 8-9) yang dilihat berdasarkan adanya formasi tubuler, inti yang pleimorfik dan mitosis.

3. Sebaran sel mononuklear : semua sel mononuklear disekitar jaringan kanker yang dilihat dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x pada 5 lapang pandang dan dinyatakan dalam skor 0,1,2,3.
4. Sel CTL dan sel NK : Jumlah semua sel mononuklear disekitar jaringan kanker, yang dari hasil pewarnaan *antibody monoclonal anti-perforin* dan dilihat dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x, berwarna coklat.

3.5. BAHAN DAN ALAT PENELITIAN

3.5.1 Bahan untuk perlakuan

Hewan coba adalah mencit betina strain C3H dengan umur 6 bulan, dan berat 20 - 30 gram. Mencit diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Selama percobaan, hewan coba ditempatkan pada kandang dan diberi pakan dan minum secara *ad libitum*. Sebelum perlakuan, mencit menjalani masa adaptasi selama 1 minggu.

Adenokarsinoma diperoleh dari mencit donor. Tumor yang mengandung sel adenokarsinoma dari mencit donor akan ditranplantasikan ke mencit resipien. *Ganoderma lucidum* yang digunakan diperoleh dari PT Sidomuncul Semarang.

Kemudian dibuat ekstrak di Laboratorium Kimia Fakultas MIPA UNDIP. Dosis yang digunakan adalah 0,5 mg/hari

3.5.2. Bahan transplantasi jaringan tumor pada mencit

- a. Alkohol 70 %
- b. Larutan Garam fisiologik
- c. Es batu
- d. Mencit donor bertumor
- e. Mencit resipien

3.5.3. Bahan untuk pemeriksaan histopatologi rutin

- a. Formalin buffer 10%
- b. Alkohol 50%, 70%, 80%, 96%, absolute
- c. Xylol
- d. Parafin cair (Histoplast)
- e. Albumin dan Poly-L-Lysine
- f. Bahan pengecatan Hematoksin-Eosin (HE)
- g. Canada balsam dan Entelan

3.5.4. Bahan tambahan untuk pewarnaan imunoperoksidase

- a. Antibodi primer: *Mouse Monoclonal Antibody (MoAb) anti-perforin*
(Kamiya Biomedical Science cat.no. MC-030)
- b. *Kit Universal Streptavidin-Biotin(Labvision^R)*

3.5.5. Alat transplantasi jaringan tumor pada mencit:

1. Cawan petri ukuran 6 Cm
2. Cawan petri ukuran 15 Cm
3. Cawan ukuran 10 Cm
4. Spuit 1cc
5. Jarum suntik trocar
6. Gunting lurus 10 Cm
7. Gunting bengkok 10 Cm
8. Pinset anatomi 10 Cm
9. Pinset biasa 12 Cm
10. Alas fiksasi

3.5.6. Alat untuk pembuatan sediaan penelitian dengan pewarnaan H&E:

- a. Inkubator suhu 56^oC
- b. Mikrotom
- c. Kaca obyek dan kaca penutup

3.5.7. Alat tambahan untuk pewarnaan imunoperoksidase

- a. Pensil PAP
- b. *Waterbath*
- c. Tempat pewarnaan dan pencucian
- d. *Timer*
- e. Pipet serologic

- f. Kertas saring
- g. *Freezer*
- h. Tabung plastic dan pipet *Ependorf*
- i. *Epismikrometer sekuler*

3.5.8. Alat untuk dokumentasi sediaan adalah fotomikrograf dan kotak sediaan.

3.6. PELAKSANAAN PENELITIAN

3.6.1. Cara perlakuan

24 ekor mencit betina strain C3H diadaptasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi ransumpakan standard selama 1 minggu secara ad libitum.

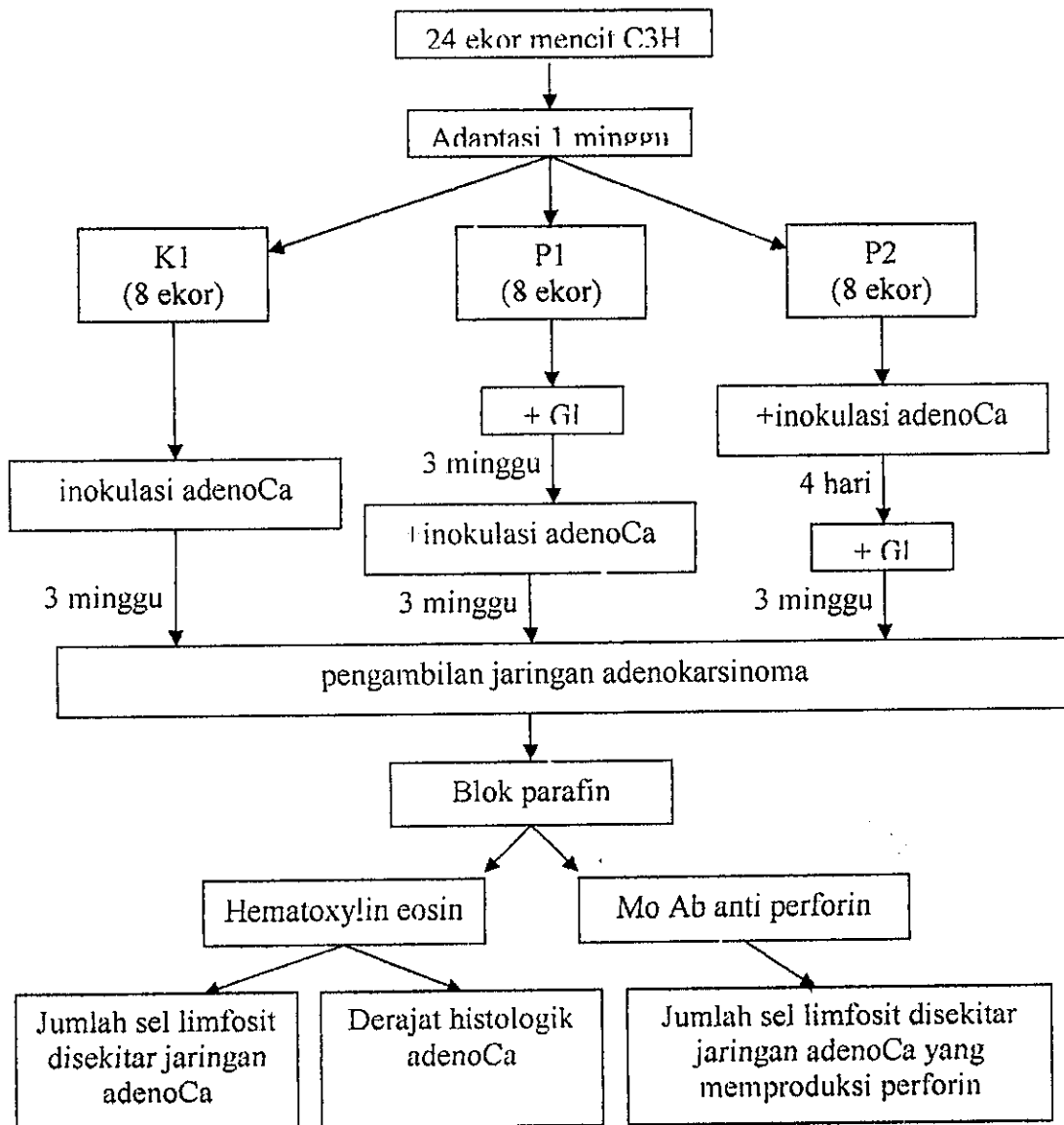
24 ekor mencit tersebut kemudian dibagi menjadi 3 kelompok masing-masing terdiri dari 8 ekor mencit yang ditentukan secara acak. Masing-masing kelompok dikandangkan secara individual dan mendapatkan pakan standard yang sama dan minum ad libitum.

Perlakuan yang diberikan adalah:

- Kelompok I (K) : Diberi inokulasi sel kanker.
- Kelompok II (P1) : Diberi *Ganoderma lucidum* (X1) dengan dosis 0,5 mg / hari selama 1 bulan, kemudian diinokulasi dengan sel kanker (X2).
- Kelompok III (P2) : Diinokulasi dengan sel kanker (X2), setelah teraba benjolan kemudian diberi *Ganoderma lucidum* (X1) selama 1 bulan dengan dosis 0,5 mg / hari

Mencit di anaestesi dengan ether selanjutnya mencit dibunuh kemudian diambil jaringan tumornya. Jaringan tumor diproses menjadi preparat histologik setelah dibuat dengan blok paraffin.

3.7. ALUR KERJA



3.8. PROSEDUR PEMERIKSAAN

3.8.1. Prosedur transplantasi tumor

- a. Mencit donor dimatikan dengan eter, kemudian diletakkan terlentang pada tatakan / alas fiksasi dan keempat kakinya difiksasi dengan jarum.
- b. Kulit dibagian yang bertumor diusap dengan alkohol 70 %, kemudian dibuat sayatan dengan gunting lurus, untuk mengeluarkan tumor.
- c. Tumor diletakkan di cawan petri kecil yang telah terlebih dahulu dicuci dengan garam fisiologis dan diletakkan diatas es.
- d. Amati bentuk dan keadaan tumor, kemudian ambil/potong jaringan tumor yang masih baik yaitu bagian yang tanpa nekrosis (biasanya di daerah tepi jika tumor besar) sebanyak kira-kira yang dapat menghasilkan bubur tumor paling sedikit 1 ml dan taruh dicawan petri kecil lainnya. Bersihkan dari jaringan ikat (simpai), jaringan nekrotik dan darah, kemudian cacah/potong-potong sampai halus dengan gunting hingga akhirnya terbentuk "bubur tumor" yang partikelnya dapat melewati jarum trokar. Tambahkan garam fisiologis lebih kurang sama banyak dengan volume tumor.
- e. Bubur tumor disuntikkan subkutan di aksila kanan mencit dengan dosis 0,2 ml.
- f. Sisa tumor yang padat dimasukkan ke dalam botol formalin untuk dibuat sediaan mikroskopik.

- g. Masing-masing mencit diberi nomor ditelinganya (lihat bagan) dan dimasukkan ke dalam kandang yang diberi label berisi : jenis kelompok perlakuan, tanggal transplantasi

3.8.2. Prosedur pembuatan preparat histopatologi

a. Fiksasi

Potongan adenokarsinoma dimasukkan dalam larutan formalin buffer (larutan formalin 10% dalam buffer Natrium asetat sampai mencapai pH 7,0).

Waktu fiksasi jaringan 18-24 jam. Setelah fiksasi selesai, jaringan dimasukkan dalam larutan akuades selama 1 jam untuk proses penghilangan larutan fiksasi.

b. Dehidrasi

Potongan adenokarsinoma dimasukkan dalam alkohol konsentrasi bertingkat. Jaringan menjadi lebih jernih dan transparan. Jaringan kemudian dimasukkan dalam larutan alkohol-xylol selama 1 jam dan kemudian larutan xylol murni selama 2 x 2jam.

c. Impregnasi

Jaringan dimasukkan dalam paraffin cair selama 2x2 jam.

d. Embedding .

Jaringan ditanam dalam paraffin padat yang mempunyai titik lebur 56-58⁰C, ditunggu sampai paraffin padat. Jaringan dalam paraffin dipotong setebal

4 mikron dengan mikrotom. Potongan jaringan ditempelkan pada kaca obyektif yang sebelumnya telah diolesi polilisin sebagai perekat. Jaringan pada kaca obyektif dipanaskan dalam incubator suhu 56-58⁰C sampai paraffin mencair.

e. Pewarnaan jaringan dengan H&E

Secara berurutan jaringan pada kaca obyektif dimasukkan dalam:

- | | | | |
|---------------------------|-----------|-------------------------------|-----------|
| 1. Xylol I | 5 menit | 11. Alkohol | 3x2 menit |
| 2. Xylol II | 5 menit | 12. Xylol | 3x5 menit |
| 3. Alkohol absolute | 3x2 menit | 13. Eosin | |
| 4. Air mengalir | 2 menit | 14. Alkohol 70% | 3 kali |
| 5. HE Lilie –Mayer | 5 menit | 15. Carbol Xylol | |
| 6. Air mengalir | 2 menit | 16. Xylol | 3 kali |
| 7. Alkohol asam 0, | 3 celup | 17. Xylol | 20 menit |
| 8. Air mengalir | 2 menit | 18. Canada balsam | |
| 9. Lithium carbonat jenuh | 3 celup | 19. Tutup dengan kaca penutup | |
| 10. Air mengalir | 2 menit | | |

f. Pewarnaan imunoperoxisidase dengan *Streptavidin-Biotin*

Supaya dapat dilakukan pewarnaan dengan antibodi, jaringan harus terbebas dari paraffin. Deparafinisasi mengikuti urutan seperti tersebut pada lampiran. Setelah diberi substrat kromogen, perforin yang terdapat dalam sitoplasma sel CTL dan sel NK akan berwarna merah kecoklatan.

Prosedur pewarnaan *Mo Ab Anti perforin*

(Lab.Patologi Anatomi FK UGM / RSUP Dr.Sardjito Yogyakarta, Juli 2003)

Xylol I.....	5-10 menit
Xylol II.....	5-10 menit
Alkohol absolut	10 menit
Alkohol 95%	5-10 menit
Alkohol 70%	5-10 menit
Cuci air (celup-celup)	1-2 menit
Cuci dengan Phospat buffer saline (PBS) celup-celup	1-2 menit
Sekitar jaringan dibersihkan dengan lap	
Slide dimasukkan kedalam tempat yang lembab dan tertutup	
H2O2 0,3% dalam methanol	10 menit
Masuk rak berdiri	
Cuci PBS 3 kali @ 1-2 menit	
Slide ditata dalam wadah gelas	
Rendam dengan Citrat Buffer	
Masukkan dalam microwave 2 kali @ 5 menit (jangan sampai mendidih)	
Keluar dari microwave didiamkan sampai dingin selama 20 menit.	
Slide ditata dirak	
Cuci PBS (celup-celup)	2 menit
Slide ditata didalam tempat yang lembab dan tertutup.	
Blocking Agent (Kit)	10 menit

Bloking agent dibuang (tanpa dicuci)

Inkubasi MoAb primer 10 ul (diencerkan pakai PBS-BSA)..... overnight

Simpan dalam tempat lembaba tertutup dan simpan dalam lemari es bawah
supaya tidak mongering

Cuci PBS (celup-celup) 10 menit

CuciPBS2-3 menit

Streptavidin10 menit

Cuci PBS2-3 menit

DAB8 menit

DAB dibuang

Slide ditata pada rak

Cuci air mengalir kemudian dicelup di tempat berisi Aquadest (jaringan
terlihat coklat)

Slide ditata dalam tempat

Counterstain dengan Hematoksilin4 menit

Hematoksilin dibuang, cuci air mengalir kemudian dicelup di aquadest

Entellan kemudian tutup deck glass.

3.9. CARA MENGUMPULKAN DATA

Dari masing-masing kelompok dibuat preparat setebal 6 mikron,
diwarnai dengan pengecatan HE kemudian diamati sebulan limfosit sesuai

dengan kelompoknya dan dinilai derajat histologinya. Tiap kelompok juga dibuat preparat untuk mengetahui produk Perforin dengan pewarnaan *antibody monoclonal anti-perforin*, kemudian dihitung jumlah sel limfosit disekitar sel kanker yang memproduksi perforin

3.10. ANALISIS DATA

Setelah data terkumpul dilakukan *data cleaning, coding* dan tabulasi. Analisa data meliputi analisis deskriptif dan uji hipotesis, Pada analisa deskriptif jumlah sebukan sel mononuklear disekitar jaringan adenokarsinoma mamma, produksi perforin dan skor derajat adenokarsinoma mamma disajikan dalam bentuk tabel rerata, SD, median dan grafik Box plot. Karena data berskala ordinal maka uji hipotesis yang digunakan adalah uji Non Parametrik Kruskal Wallis yang dilanjutkan dengan uji Mann Whitney untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Korelasi antara perubahan jumlah sebukan sel mononuklear disekitar jaringan adenokarsinoma mamma jumlah sel mononuklear yang memproduksi perforin dan derajat histologik adenokarsinoma mamma dianalisis dengan Uji Korelasi dari Spearman.

Batas derajat kemaknaan adalah apabila $P \leq 0,05$ dengan 95% interval kepercayaan. Analisa data dilakukan dengan program komputer SPSS 10.0 for Windows.

BAB IV

HASIL PENELITIAN

4.1. Sebulan Sel mononuklear disekitar jaringan adenokarsinoma mamma mencit C3H

Rerata jumlah sebulan sel mononuklear disekitar jaringan adenokarsinoma pada kelompok kontrol dan perlakuan ditampilkan pada tabel 1.

Tabel 1. Rerata jumlah sebulan sel mononuklear disekitar sel kanker pada kelompok kontrol (n=8), Perlakuan 1 (n=8) dan Perlakuan 2 (n=8).

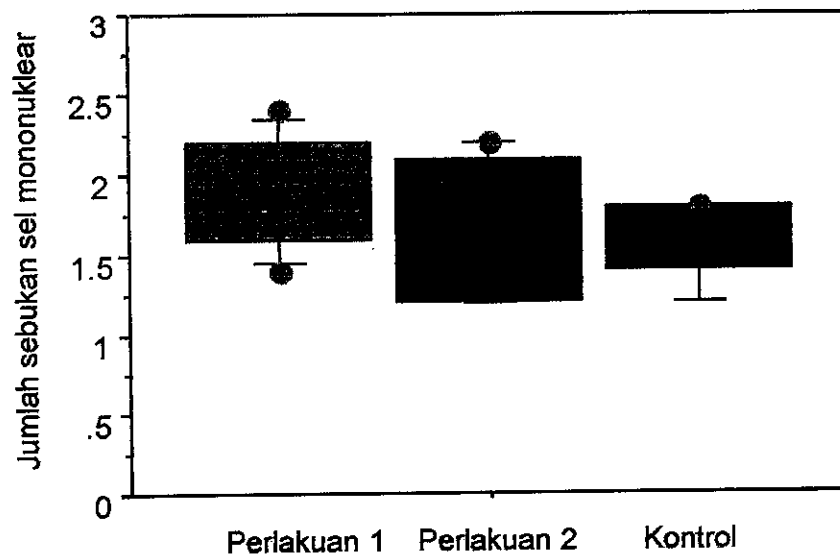
Kelompok	Sebulan sel mononuklear sekitar jar adenokarsinoma			P*	P**
	Rerata	SD	Median		
Perlakuan 1	1,9	0,4	1,8	0,3	0,2
Perlakuan 2	1,6	0,5	1,5		0,9
Kontrol	1,6	0,3	1,6		-

* Uji Kruskal Wallis

** Uji Mann-Whitney

Tabel 1 menunjukkan jumlah sebulan sel mononuklear disekitar jaringan adenokarsinoma mamma mencit C3H yang tertinggi adalah pada kelompok Perlakuan 1, sedangkan pada kelompok Perlakuan 2 adalah 1,6 (0,5) dan kelompok Kontrol 1,6 (0,3). Grafik Box plot pada gambar 2 menunjukkan median kelompok Perlakuan 1, Perlakuan 2 dan Kontrol tampak tidak jauh berbeda. Hasil uji non-parametrik Kruskal Wallis menunjukkan tidak ada perbedaan yang

bermakna antara rerata jumlah sebukan sel mononuklear disekitar sel kanker antar kelompok perlakuan, pada (Kelompok Kontrol, Perlakuan 1 dan Perlakuan 2, ($p=0,3$). Pada uji statistik Mann-Whitney perbandingan antar kelompok tidak terdapat perbedaan bermakna antara sebukan sel mononuklear antara kelompok perlakuan 1 dengan kelompok kontrol ($p=0,2$). Hasil yang sama juga pada perbandingan antara kelompok kontrol dengan kelompok Perlakuan 2 ($p=0,9$). Hasil uji statistik Mann-Whitney juga menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna antara jumlah sebukan sel mononuklear disekitar sel kanker pada kelompok Perlakuan 1 dengan Perlakuan 2 ($p=0,2$).



Gambar 2. Diagram *box-plot* jumlah sebukan sel mononuklear pada kelompok kontrol (■), kelompok perlakuan 1 (■) dan kelompok perlakuan 2 (■).

4.2. Skor ekspresi perforin sel mononuklear

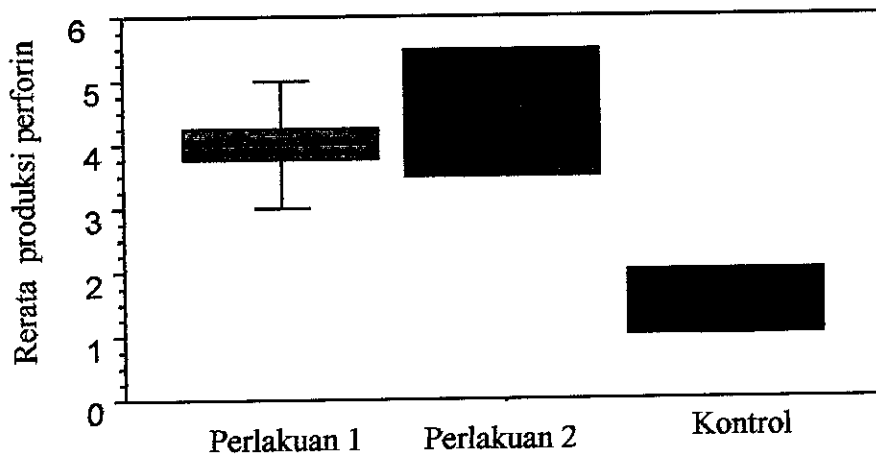
Skor ekspresi perforin sel mononuklear disekitar jaringan adenokarsinoma mamma mencit C3H ditampilkan pada tabel 2.

Tabel 2. Skor ekspresi perforin sel mononuklear disekitar jaringan adenokarsinoma mamma mencit C3H pada kelompok kontrol (n=5), Perlakuan 1 (n=5) dan Perlakuan 2 (n=5).

Kelompok	Skor ekspresi perforin sel mononuklear			P*	P**
	Rerata	SD	Median		
Perlakuan 1	4,0	0,7	4,0	-	0,008
Perlakuan 2	4,0	1,0	5,0	-	0,008
Kontrol	1,4	0,6	1,0	0,008	-

* Uji Non-parametrik Kruskal-Wallis

** Uji Mann-Whitney



Gambar 3. Diagram Box-plot skor ekspresi perforin sel monuklear disekitar jaringan adenokarsinoma mamma. Kelompok perlakuan 1 (■), perlakuan 2 (■) dan kontrol (■).

Tabel 2 menunjukkan rerata skor ekspresi perforin disekitar jaringan adenokarsinoma pada kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 2 kurang lebih sama yaitu 4,0 (SD=0,8) pada perlakuan 1 dan pada perlakuan 2 adalah 4,0 (SD=1,0), sedangkan pada kelompok kontrol adalah lebih rendah yaitu 1,4 (SD=0,6). Grafik Box plot menggambarkan median kelompok Perlakuan 1 dan Perlakuan 2 tampak jelas berbeda dibandingkan median kelompok K, sedangkan median kelompok Perlakuan 1 tampak sedikit berbeda dengan kelompok Perlakuan 2. (Gambar 3) Secara statistik dengan uji Kruskal-Wallis perbedaan skor ekspresi perforin disekitar jaringan adenokarsinoma antara kelompok perlakuan 1, perlakuan 2 dan kelompok kontrol adalah bermakna ($p=0,008$). Rerata skor ekspresi perforin disekitar sel adenokarsinoma pada kelompok perlakuan 1 adalah lebih tinggi secara bermakna dibanding kontrol ($p=0,008$; Uji Mann-Whitney), hal yang sama juga dijumpai pada perbandingan antara kelompok perlakuan 2 dengan kontrol ($p=0,008$; Uji Mann-Whitney). Sedangkan antara kelompok perlakuan 1 dan perlakuan 2 perbedaan tersebut tidak bermakna ($p=1,0$).

4.3. Derajat histologik adenokarsinoma mamma mencit C3H

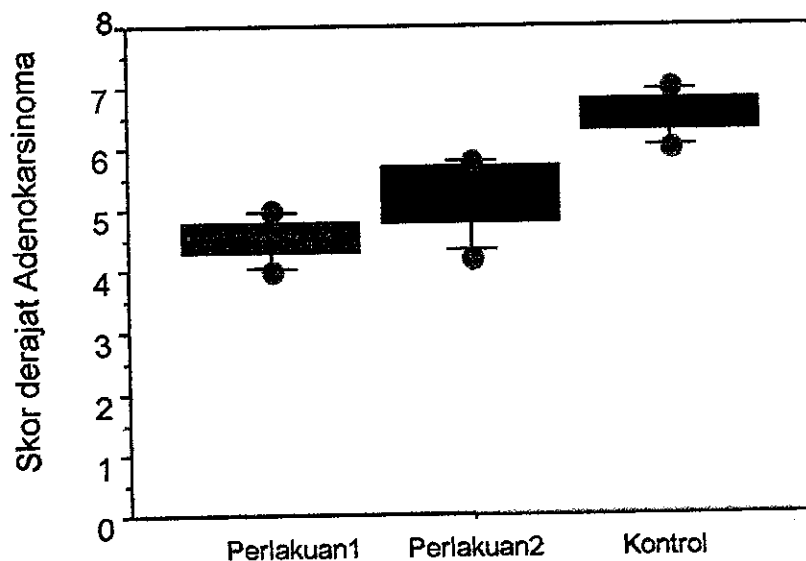
Rerata jumlah skor derajat histologik adenokarsinoma mamma mencit C3H pada kelompok kontrol dan perlakuan ditampilkan pada tabel 3.

Tabel 3. Rerata jumlah skor derajat histologik adenokarsinoma mamma mencit C3H pada kelompok kontrol (n=8), Perlakuan 1 (n=8) dan Perlakuan 2 (n=8).

Kelompok perlakuan	Skor adenokarsinoma			P*	p**
	Rerata	SD	Median		
Perlakuan 1	4,5	0,3	4,0	< 0,001	< 0,001
Perlakuan 2	5,2	0,6	5,6		
Kontrol	6,6	0,3	6,8		-

* Kruskal Wallis

** Uji Mann-Whitney



Gambar 4. Diagram *box-plot* Skor derajat Adenokarsinoma mamma mencit C3H kelompok kontrol (■), kelompok perlakuan 1 (■) dan kelompok perlakuan 2 (■).

Tabel 3 menunjukkan rerata skor derajat histologik Adenokarsinoma mamma mencit C3H yang tertinggi adalah 6,6(0,3) pada kelompok Kontrol; selanjutnya 5,2(0,6) pada kelompok Perlakuan 2, dan yang terendah adalah

4,5(0,3) pada kelompok Perlakuan 1. Grafik Box plot menunjukkan median kelompok Perlakuan 1 dan Perlakuan 2 tampak jauh berbeda dibandingkan kelompok Kontrol.(gambar 4) Hasil uji Non-Parametrik Kruskal Wallis menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara rerata skor derajat histologik adenokarsinoma antar kelompok perlakuan pada (kelompok Kontrol, Perlakuan 1 dan Perlakuan 2 ($p < 0,001$)). Rerata skor adenokarsinoma kelompok Kontrol lebih tinggi secara bermakna dibanding kelompok perlakuan 2 ($p < 0,001$). Demikian pula kelompok Kontrol lebih tinggi secara bermakna dibanding dengan kelompok Perlakuan 1 ($p < 0,001$). Perbedaan bermakna juga terdapat antara skor derajat adenokarsinoma Kelompok Perlakuan 1 dibanding Perlakuan 2 ($p = 0,03$).

Tabel 4. Hasil uji korelasi antara sebulan sel mononuklear, ekspresi perforin dan derajat adenokarsinoma mamma*

	Jumlah sebulan sel mononuklear	Ekspresi perforin	Skor derajat histologik
Jumlah sebulan sel mononuklear		rho : 0,4 p : 0,01	rho : - 0,5 p : 0,02
Ekspresi perforin	rho : 0,4 p : 0,01		rho : - 0,7 p : 0,003
Skor derajat histologik	rho : - 0,5 p : 0,02	rho : - 0,7 p : 0,003	

* uji Spearman

Hubungan antara sebulan sel mononuklear di sekitar jaringan adenokarsinoma mamma dengan ekspresi perforin sel mononuklear yang dinilai dari uji korelasi Spearman menunjukkan adanya korelasi positif derajat sedang (rho= 0,4) dan $p = 0,01$. Hal ini menggambarkan bahwa ada hubungan antara peningkatan

ekspresi perforin dengan peningkatan jumlah sebukan sel mononuklear di sekitar jaringan adenokarsinoma mamma pada kelompok yang diberi *Ganoderma lucidum*. (Tabel 4)

Pada uji korelasi antara sebukan sel mononuklear dengan skor derajat histologik adenokarsinoma mamma didapatkan adanya korelasi negatif derajat sedang ($\rho = -0,5$) dan $p=0,02$. Hal ini berarti ada hubungan antara peningkatan jumlah sebukan sel mononuklear dengan penurunan skor derajat histologik adenokarsinoma mamma. (Tabel 4)

Uji korelasi Spearman terhadap hubungan ekspresi perforin sel mononuklear dengan derajat histologik adenokarsinoma mamma juga menunjukkan adanya korelasi negatif derajat kuat ($\rho = -0,7$) dan $p=0,003$. Artinya peningkatan ekspresi perforin sel mononuklear akan disertai dengan penurunan skor derajat histologik adenokarsinoma mamma. (Tabel 4)

BAB V

PEMBAHASAN

Fungsi sistem imun adalah fungsi protektif dengan mengenal dan menghancurkan sel-sel abnormal sebelum berkembang menjadi tumor atau membunuhnya kalau tumor itu sudah tumbuh.

Sistem imun berperan dalam melawan pertumbuhan tumor ganas, telah dibuktikan pada beberapa penelitian, antara lain hal-hal berikut: 1) banyak tumor mengandung infiltrasi sel-sel mononuklear yang terdiri atas sel T, sel NK dan makrofag; 2) tumor dapat mengalami *regresi* secara spontan, 3) tumor lebih sering berkembang pada individu dengan imunodefisiensi atau bila fungsi sistem imun tidak efektif; (bahkan imunosupresi seringkali mendahului pertumbuhan tumor); 4) dilain pihak tumor seringkali menyebabkan imunosupresi pada penderita. Bukti lain yang juga mendukung bahwa tumor dapat merangsang sistem imun adalah ditemukannya sel mononuklear dalam kelenjar limfe yang merupakan *draining sites* dari pertumbuhan tumor, disertai peningkatan ekspresi MHC dan *Interseuler adhesion molecule* (ICAM) yang mengindikasikan sistem imun yang aktif.¹⁹

Tabel 1 membuktikan pemberian *Ganoderma lucidum* sebelum *inokulasi* sel adenokarsinoma mamma yang dilakukan terhadap mencit C3H (perlakuan 1) menyebabkan peningkatan sebaran sel mononuklear disekitar sel adenokarsinoma lebih tinggi dibanding pemberian *Ganoderma lucidum* setelah *inokulasi* (perlakuan 2) ataupun tanpa pemberian *Ganoderma lucidum* (kontrol). Hal ini mungkin disebabkan

karena *Ganoderma lucidum* yang diberikan sebelum *inokulasi* sel kanker akan memacu *proliferasi* sel mononuklear. Sehingga meningkatkan jumlah sebukan sel mononuklear disekitar jaringan adenokarsinoma mamma. Perbedaan sebukan sel mononuklear yang tidak bermakna dapat dipahami karena sel kanker sendiri merupakan antigen asing yang dapat menstimulasi *proliferasi* sel mononuklear. Sebukan sel mononuklear disekitar sel kanker secara histologik mempunyai nilai prognostik yang baik karena kecepatan pertumbuhan sel kanker akan menurun. Secara invitro, beberapa sel imun disekitar sel kanker terbukti dapat membunuh sel kanker disekelilingnya.^{16,17} Hubungan antara banyaknya sel mononuklear yang ditemukan diantara kelompok sel kanker secara histopatologi dengan prognosis penderita telah dilaporkan oleh Sarjadi pada kanker leher rahim.³⁰

Sel mononuklear disekitar jaringan kanker yang menghasilkan perforin dan berperan dalam perondaan imun terhadap kanker tersebut adalah CTL dan sel NK.

Tabel 2 membuktikan bahwa *Ganoderma lucidum* secara bermakna meningkatkan kemampuan ekspresi perforin dari sel NK dan CTL. Hasil rerata skor ekspresi perforin disekitar jaringan adenokarsinoma pada kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 2 berbeda secara bermakna dibanding kontrol. Hal ini sesuai dengan pendapat yang menyatakan bahwa setelah mengenal sel tumor dengan caranya masing-masing, CTL dan sel NK melakukan cara sitotoksisitas yang sama yaitu dengan mengeluarkan perforin, .^{16,17,19} Perforin akan menimbulkan lubang pada membran sel target (sel tumor), dimana lubang tersebut merupakan pintu masuk bagi

molekul sitotoksik lainnya dalam sitoplasma dan inti sel yang menyebabkan kematian dari sel target.^{19,23,40,41,42}

Dari tabel 3 terbukti bahwa rerata skor derajat histologik adenokarsinoma mamma mencit C3H berbeda bermakna (tertinggi adalah pada kelompok kontrol, kelompok perlakuan 2 dan yang terendah adalah pada kelompok perlakuan 1).

Pada diagram hubungan masing-masing kelompok terbukti bahwa pemberian *Ganoderma lucidum* meningkatkan sebulan sel mononuklear disekitar sel adenokarsinoma disertai peningkatan ekspresi perforin tetapi pada kelompok kontrol peningkatan sebulan sel mononuklear tidak disertai peningkatan ekspresi perforin.

Demikian juga pemberian *Ganoderma lucidum* meningkatkan sebulan sel mononuklear disekitar sel adenokarsinoma disertai penurunan skor derajat adenokarsinoma, tetapi pada kelompok kontrol peningkatan sebulan sel mononuklear tidak disertai penurunan skor derajat adenokarsinoma. Dengan kedua fakta tersebut diatas dapat disimpulkan lebih lanjut bahwa walaupun *Ganoderma lucidum* tidak secara bermakna meningkatkan sebulan sel mononuklear tetapi *Ganoderma lucidum* mampu meningkatkan kapasitas ekspresi perforin. Peningkatan ekspresi perforin ini akan menyebabkan penurunan skor derajat histologik adenokarsinoma mamma. Hal ini sesuai dengan penelitian Smyth yang membuktikan bahwa perforin, IFN γ dan Sel NK terbukti bersama-sama menghambat pertumbuhan dan metastasis Sarkoma.⁴⁵

Smyth juga membuktikan pada sarkoma, sel efektor pada sistem imun baik *inate* maupun *adaptif* memberi kontribusi pada pencegahan, perkembangan dan metastasis tumor melalui perforin dan IFN γ .⁴⁶ Smyth juga melaporkan bahwa sel NK yang

defisiensi perforin tidak mampu melisis tumor dan kemampuan untuk merejeksi pertumbuhan dan metastasis sel tumor berkurang 10 – 100X.⁴⁷

KETERBATASAN PENELITIAN

Dalam meneliti manfaat suatu zat perlu diperhatikan apakah dosis yang dipakai aman atau menimbulkan efek samping, untuk itu perlu dilakukan pemeriksaan jaringan hepar dan jaringan ginjal. Karena keterbatasan kami, penelitian ini belum dapat kami lakukan .

BAB VI

SIMPULAN DAN SARAN

6.1. SIMPULAN

1. Terdapat peningkatan jumlah sel mononuklear disekitar jaringan adenokarsinoma akibat pemberian *Ganoderma lucidum* sebelum inokulasi sel adenokarsinoma dibanding setelah inokulasi maupun tanpa pemberian *Ganoderma lucidum*.
2. Pemberian *Ganoderma lucidum* meningkatkan secara bermakna ekspresi perforin disekitar jaringan adenokarsinoma pada pemberian sebelum inokulasi maupun setelah inokulasi dibanding kontrol. Tidak terdapat perbedaan bermakna antara pemberian *Ganoderma lucidum* sebelum dengan sesudah inokulasi.
3. Derajat histologik adenokarsinoma mamma mencit C3H dengan pemberian *Ganoderma lucidum* prainokulasi maupun pascainokulasi berbeda bermakna dibanding kontrol.
4. Walaupun *Ganoderma lucidum* tidak meningkatkan sebaran sel mononuklear tetapi secara bermakna meningkatkan kapasitas ekspresi perforin.
5. Dari hal-hal tersebut diatas dapat disimpulkan pula bahwa peningkatan ekspresi perforin disekitar jaringan adenokarsinoma menyebabkan penurunan derajat histologik adenokarsinoma mamma.

6.2. SARAN

Perlu penelitian tentang:

1. Pengaruh *Ganoderma lucidum* terhadap metastasis dari Adenokarsinoma mamma.
2. Analisa kesintasan mencit yang diinokulasi adenokarsinoma dan diberi *Ganoderma lucidum*
3. Pengaruh *Ganoderma lucidum* sebagai terapi pendamping terhadap terapi sitostatika.
4. Pengaruh *Ganoderma lucidum* terhadap mekanisme kematian sel kanker (produk granzyme, sitotoksin, FAS dan FASL)
5. Pemeriksaan terhadap jenis kanker yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

1. Shirley IM. Epidemiologi kanker payudara dan pengendaliannya. *Medika* 2000;5:326-9.
2. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Departemen Kesehatan RI dan Biro Pusat Statistik. Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT). 1992:44.
3. Didit T, Gunawan T, Muchlis R, Yoshiyuki O, Indra O, Goi S, et al. Longitudinal clinicopathological follow up of breast cancer patient from 1988 to 1996 in Jakarta. *Med J Indonesia* 1999;8:109-16.
4. Sarjadi, Trihartini. Cancer registration in Indonesia. *Asian Pasific J Cancer Prev, IACR Supplement*, 2001; 2: 21-24.
5. Nambiar. Breast cancer in Singapore. The 10th Asia Pasific cancer conference. 1st ed. IAP. Beijing, 1991.
6. Chandrasekhar A. Ten Years review of mammary cancer. The 10th APCC. 1st ed. IAP. Beijing, 1991.
7. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Pokok-pokok penanggulangan penyakit kanker di Indonesia. 1989:1.
8. Wuyung PE, Kusmardi, Pringgoutomo S. Daya hambat β -karoten pada minyak kelapa sawit terhadap pertumbuhan in vitro sel tumor kelenjar susu mencit C3H. *Majalah Patologi Indonesia*. 1999; 8:12 – 16.

9. Kim DH, Shim SB, Kim NJ, Jang IS. Beta-glucuronidase-inhibitory activity and hepatoprotective effect of *ganoderma lucidum*. *Biol Pharm Bull.* 1999; 22:162-4.
10. Park EJ, Ko G, Kim J, Sohn DH. Antifibrotic effects of a polysaccharide extracted from *ganoderma lucidum*, glycyrrhizin, and pentoxifylline in rats with cirrhosis induced by biliary obstruction. *Biol Pharm Bull.* 1997; 20: 417-20.
11. Wan F, Huang D. Anti inflammatory and analgesic actions of artificial and fermentative *ganoderma sinense* (AFGS). *Chung Kao Chung Yao Tsa Chih.* 1992;17:619-22, 640.
12. Sunee S, Phanuphak P, Hanvanich M. The immunomodulating effects of lacquired mushroom (*ganoderma lucidum*) on lymphocytes of HIV-infected patients. *Int Conf AIDS.* 1992; 3: 135.
13. Wang SY, Hsu ML, Hsu HC, et al. The anti-tumor effect of *ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *Int J Cancer.* 1997; 70: 699-705.
14. Kim HS, Kacew S, Lee BM. In vitro chemopreventive effects of plant polysaccharides (*aloe barbadensis miller*, *lentinus edodes*, *ganoderma lucidum* and *coriolus versicolor*). *Carcinogenesis.* 1999; 20: 1637-40.
15. Yun TK, Kim SH, Lee YS. Trial of a new medium term model using benzo(a)pyrene induce lung tumor in newborn mice *Anti cancer Res* 1995; 15: 839-45.

16. Min BS, Gao JJ, Nakamura N, Hattori M. Tritetpenes from the spores of *Ganoderma Lucidum* and their cytotoxicity against Meth-A and LLC tumor cell. *Chem Pharm Bull* 2000; 48(7): 1026-33.
17. Kim HS, Kacew S, Lee BM. In vitro chemopreventive effects of plant polysaccharides (*aloe barbadensis miller*, *lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* and *coriolus versicolor*). *Carcinogenesis* 1999; 20: 1637-40.
18. Goodman JW, 1994. The Immune Response, in *Basic and Clinical Immunology*. 8th ed. Stites DP, Terr A I eds., Prentice-Hall Int. Inc., USA
19. Abbas A, Lichtman Ah, Pober JS. *Cellular and Molecular Immunology*. 3rd ed. Philadelphia : WB Saunders, 1997.
20. Constatinides P. *General Pathobiology*. Connecticut: Appleton & Lange, 1994
21. Henkart. PA et al. Molecular mechanism of lymphocytes-mediated cytotoxicity, molecular mechanism of T lymphocyte apoptosis. Pierre Henkart laboratory. <http://rex.nci.nih.gov/RESEARCH/BASIC/EIB/HENKART.HTM>. 2002.
22. Contran RS, Kumar V, Robbins SL. *Robbin Pathologic basis of Disease*. 5th ed. Philadelphia : WB Saunders, 1994.
23. Kawasaki, et al. Perforin, a pore-forming protein detectable by monoclonal antibodies, is a functional marker for killer cells. *International Immunology*. 1990;2: 677-684.
24. Jones K. *Reishi: ancient herb for modern times*. Issaquah, WA; Sylvan Press, 1990:6.

25. Willard T. Reishi mushroom: herb of spiritual potency and wonder. Issaquah, WA: Sylvan Press, 1990, i l.
26. Shu HY. Oriental materia medica: a concise guide. Palos Vardes, CA: Oriental Healing Arta Press, 1986, 640-41.
27. Takashi M. Studies on bioactive substances and medicinal effects of reishi, *Ganoderma lucidum* in Japan. Kenson Electronic Publishing, 1997.
28. Raymond YC. Role of *Ganoderma* supplementation in cancer management. Kenson Electronic Publising, 1997.
29. Won SJ , Lin MT , Wu WL . *Ganodera tsugae* mycelium enhances splenic natural killer cell activity and serum interferon production in mice. *Jpn J Pharmacol.* 1992 ; 59(2) : 171-6.
30. Roitt IM, 1988. *Essentiale Immunology*, 6th ed. Black well sci. publ. London.
31. Subowo, 1993. *Imunobiologi*. Cetakan ke-1, Penerbit Angkasa, Bandung
32. Constantinides P. *General Pathobiology*. Connecticut: Appleton and Lange, 1994.
33. .Sarjadi. *Karsinoma epidermoid serviks uteri (Beberapa aspek epidemiologi serta peran histopatologi dan petanda tumor dalam penentuan prognosis)*. Disertasi doktor Universitas Diponegoro. Semarang, 1985.
34. Stites DP, Terr Abba I, Parslow TP, .*Medical Immunology*, 9th ed, Stamford Connecticut, USA: Appleton & Lange, 1997.

35. Whiteside TL, Haberman RB. Characteristics of natural killer cell and lymphokine-activated killer cells. In: Oettgen H.F ed. Human cancer immunology. WB saunders company philadelphia 1990
36. Kresno SB. Aspek imunologi pada kanker. Nelwan et al eds. Simposium 4th Jakarta Antimicrobial Update 2003. Sub Bagian Penyakit Tropik dan Infeksi Bagian Ilmu penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Rumah Sakit Umum Pusat Nasional Dr Cipto Mangunkusumo. Jakarta. 2003: 59 – 71.
37. Henkart PA. Molecular mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity.
<http://rex.nci.nih.gov/RESEARCH/basic/eib/henkart.htm>.2002
38. Lehman C, Zeis M, Schmithz N, Uharek L. Impaired binding of perforin on the surface of tumor cells is a cause of target cell resistance against cytotoxic effector cells. Blood. 2000; 96: 594 – 600.
39. Thornthwaite JT. My discovery of the natural killer cell.
<http://www.cancerfoundation.com/NKcells.html>. 2002
40. Junqueira LC, Arneiro j, Kelley RO. Basic Histology.. 8th ed. Prentice Hall International inc London.1995:423-46.
41. Virginia KL, Colin AP, Raman Q, Edwin DS. Breast cancer. In: Philip R, Sandra M, Raman Q, editors. Clinical oncology. 7th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1993: 187-94.
42. World Health Organization. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. 1993: 44.

43. Rosai J. Ackerman's surgical pathology. 8th ed. Missouri: Mosby-Year Book Inc, 1996: 1624-5.
44. Leong ASY. Immunohistochemistry-theoretical and practical aspects. In: Applied Immunohistochemistry for the surgical pathologist. London: Edward Arnold, 1993.
45. Reuters Health Information (2001 -01-12). Perforin, interferon-gamma contribute independent antitumor effects.
http://www.hci.utah.edu/content/reuters/2001/01/12/20010112_scie001.html
46. Smyth M. Expanding our view of tumor immunity.
http://www.wellcome.ac.uk/en/isrf/if_cancer_msmyt.shtm. 2002
47. Smyth MJ et al. Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis. The Journal of Immunology. 1999; 162: 6658 – 6662.