

**PENGARUH PEMBERIAN ECHINACEA PURPUREA
TERHADAP PRODUKSI IFN- γ DAN INDEKS
APOPTOSIS SEL TUMOR MENCIT DENGAN
KANKER PAYUDARA YANG MENGALAMI STRES**

*THE EFFECT OF ECHINACEA PURPUREA ON
IFN- γ PRODUCTION AND CELL TUMOUR APOPTOTIC
INDEX OF
BREAST CANCER C3H MICE WITH STRESS*



Tesis

**untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat
Sarjana S-2 dan memperoleh keahlian dalam bidang Ilmu Bedah**

A Agung Purnama

**PROGRAM PASCA SARJANA
MAGISTER ILMU BIOMEDIK
DAN
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I
ILMU BEDAH
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2008**

Tesis

**PENGARUH PEMBERIAN ECHINACEA
PURPUREA TERHADAP PRODUKSI IFN- γ DAN
INDEKS APOPTOSIS SEL TUMOR MENCIT
DENGAN KANKER PAYUDARA YANG
MENGALAMI STRES**

Disusun oleh

A Agung Purnama

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji dan dinyatakan telah memenuhi syarat
untuk diterima

Menyetujui :
Komisi Pembimbing

Pembimbing I

Pembimbing II

dr. Djoko Handojo, SpB, SpB(K)Onk
NIP. 130 675 341

Prof.dr. Edi Dharmana, MSc, PhD, Sp.ParK
NIP. 130 529 451

Mengetahui :

Ketua
Program Studi PPDS I Bedah
Universitas Diponegoro

Ketua
Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Program Pasca Sarjana
Universitas Diponegoro

dr. Sidharta Darsojono, SpB, SpU
NIP. 131 757 921

Prof. dr. Soebowo, SpPA(K)
NIP. 130 352 249

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 atau lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 17 September 2008

Penulis

RIWAYAT HIDUP SINGKAT

A. IDENTITAS

Nama : dr. A Agung Purnama
NIM Magister Biomedik : G4A003005
NIM PPDS I Bedah : G3A003002
Tempat / Tgl lahir : Malang, 20 September 1978
Agama : Katolik
Jenis kelamin : Laki-laki
Istri : dr. Lina Tantoso
Anak : Anastasia Stella Carmelita
Benedicta Angeline Christabelle

B. Riwayat Pendidikan

1. SD Tarakanita Magelang, Jawa Tengah: Lulus tahun 1990
2. SMP Tarakanita Magelang, Jawa Tengah :Lulus tahun 1993
3. SMA Tarakanita Magelang, Jawa Tengah :Lulus tahun 1996
4. FK ATMAJAYA Jakarta, :Lulus tahun 2002
5. PPDS I Bedah FK UNDIP Semarang, Jawa Tengah
6. Magister Ilmu Biomedik Pasca Sarjana UNDIP Semarang Jawa Tengah

KATA PENGANTAR

Puji Syukur dipanjatkan kehadiran Tuhan YME atas limpahan rahmat dan anugerahNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul “PENGARUH PEMBERIAN ECHINACEA PURPUREA TERHADAP PRODUKSI IFN- γ DAN INDEKS APOPTOSIS SEL TUMOR MENCIT DENGAN KANKER PAYUDARA YANG MENGALAMI STRES”

Penelitian ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar derajat sarjana S2 Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana dan Program Pendidikan Dokter Spesialis I Bedah Universitas Diponegoro Semarang.

Penulis menyadari tugas ini tidak dapat diselesaikan dengan baik tanpa dukungan dari berbagai pihak. Kepada dr. Djoko Handojo, SpB, SpB(K)Onk dan Prof. Dr. Edi Dharmana, MSc, PhD, SpParK sebagai dosen pembimbing, penulis mengucapkan terima kasih atas bimbingan, sumbangan pikiran, serta kesabarannya dalam proses penyelesaian tesis ini.

Dalam kesempatan ini penulis juga menghaturkan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. dr. Susilo Wibowo, SpAnd, Rektor Universitas Diponegoro Semarang.
2. Prof. Drs. Y. Warella, MPA, PhD, Direktur Pasca Sarjana Universitas Diponegoro Semarang.
3. Prof. dr. H. Soebowo, SpPA(K), Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro Semarang.
4. dr. Soejoto, SpKK(K), Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang

5. Prof. Dr. dr. Tjahjono, SpPA(K) FIAC, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran UNDIP / RS dr. Kariadi Semarang.
6. dr. Djoko Handojo, SpB, SpB(K)Onk, Ketua Bagian Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RSUP dr. Kariadi Semarang.
7. dr. Sidharta Darsojono, SpB, SpU, Ketua Program Studi PPDS I Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
8. dr. Harijadi , SpPA(K), Kepala Instalasi Patologi Anatomi RSU Sardjito FK UGM Yogyakarta.
9. Tim penguji dan dan nara sumber yang telah dengan sabar berkenan memberi masukan, arahan dalam penelitian dan penulisan tesis ini.
10. Semua rekan sejawat Residen Bedah FK UNDIP yang tak dapat disebutkan satu per satu.
11. Ucapan terima kasih khusus kepada orang tua dan mertua saya, istriku tercinta Lina dan Anakku tersayang Tasia dan Angel, yang telah memberikan dukungan moril dan material untuk keberhasilan studi saya.

Penulis menyadari bahwa penelitian ini masih jauh dari sempurna. Kritik dan saran demi kesempurnaan penelitian ini akan diterima dengan senang hati. Penulis berharap penelitian ini dapat berguna bagi masyarakat serta memberi sumbangan bagi perkembangan ilmu kedokteran.

Semarang, 17 September 2008

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
ABSTRAK.....	xiv
<i>ABSTRACT</i>	xv
BAB 1. Pendahuluan	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	5
1.3.1. Tujuan Umum	5
1.3.2. Tujuan Khusus	5
1.3.3. Manfaat Penelitian.....	5
1.4. Orisinalitas.....	7
BAB 2. Tinjauan Pustaka	8
2.1. Kanker payudara.....	8
2.1.1. Etiologi dan patogenesis	8

2.1.2. Stadium klinik kanker payudara.....	10
2.2. Respon imunologik terhadap sel tumor ganas.....	10
2.2.1. Antigen tumor.....	11
2.2.2. Peran sistem imun pada tumor.....	13
2.2.3. Peran IFN- γ	16
2.2.4. Limfosit T sebagai efektor anti tumor.....	18
2.2.5. Apoptosis.....	21
2.3. Pengaruh stres terhadap respons imunitas seluler.....	26
2.4. Echinacea sp sebagai imunostimulator.....	30
2.4.1. Latar belakang echinacea sp.....	30
2.4.2. Mekanisme echinacea sp sebagai imunostimulator.....	32
2.4.3. Hasil-hasil penelitian echinacea sp.....	32
2.4.5. Keamanan dan khasiat echinacea sp.....	34
2.4.6. Dosis.....	38
BAB 3. Kerangka Konseptual dan Hipotesis.....	39
3.1 Kerangka Teori.....	39
3.2 Kerangka Konsep.....	39
3.3 Hipotesis Penelitian.....	40
BAB 4 . Metode Penelitian.....	41
4.1 Sampel.....	41
4.2 Tempat Penelitian.....	42
4.3 Variabel Penelitian.....	43
4.3.1. Variabel bebas.....	43
4.3.2. Variabel tergantung.....	43

4.4 Definisi Operasional	43
4.5 Bahan dan alat	44
4.6. Instrumen Penelitian.....	46
4.7 Rancangan Penelitian.....	47
4.8 Prosedur Pengumpulan Data	48
4.9 Prosedur-prosedur laboratorium.....	49
4.9.1 Prosedur transplantasi tumor.....	49
4.9.2 Prosedur pemberian stressor renjatan listrik.....	50
4.9.3 Prosedur pengambilan sampel dari hewan percobaan.....	51
4.9.4 Prosedur pemeriksaan interferron gamma makrofag.....	53
4.9.5 Prosedur pembuatan preparat histologi.....	55
4.10 Alur Kerja	57
4.11 Analisa data	58
4.11.Persyaratan Etik.....	58
BAB 5. Hasil	59
5.1. Produksi IFN- γ	59
5.2. Indeks apoptosis.....	60
5.3. Uji Statistik	62
BAB 6. Pembahasan	64
BAB 7. Simpulan dan Saran	68
7.1. Simpulan	68
7.2. Saran	68
Daftar Pustaka	69
Lampiran.....	74

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Tumor antigen yang menstimulasi respon sel-T.....	13
Tabel-2. Nilai rata-rata hasil penghitungan produksi IFN- γ pada tiap kelompok percobaan.....	59
Tabel-3. Nilai rata-rata hasil penghitungan indeks apoptosis pada tiap kelompok percobaan.....	60

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Reaksi immune <i>T-Cell mediated</i>	20
Gambar 2.	Tahapan sitolitik sel target oleh CTLs.....	21
Gambar 3.	Jalur Kematian Sel Target yang dipengaruhi oleh CTL/NK.....	22
Gambar 4	Jalur Apoptosis Sel Target yang diinduksi oleh granzyme B...24	
Gambar 5	Jalur Apoptosis Sel Target yang diinduksi oleh granzyme A...25	
Gambar 6.	Mekanisme yang terjadi pada stres dan sistem imun.....	26
Gambar 7.	Fungsi sel-sel Th1.....	29
Gambar 8.	Fungsi sel-sel Th2.....	29
Gambar 9.	<i>Boxplot</i> produksi IFN- γ	60
Gambar 10.	<i>Boxplot</i> Indeks apoptosis.....	61
Gambar 11.	Hasil <i>Post Hoc test</i> produksi IFN- γ dengan menggunakan uji <i>Bonferroni</i>	63
Gambar 12.	Hasil <i>Post Hoc test</i> indeks apoptosis dengan menggunakan uji <i>Bonferroni</i>	63
Gambar 13.	Mekanisme yang terjadi pada stres dan sistem imun.....	65
Gambar-14.	Mekanisme yang terjadi pada stres dan sistem imun.....	66

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran pewarnaan HE pembesaran 100x.....	74
Lampiran pewarnaan HE pembesaran 400x.....	74
Lampiran <i>apoptotic body</i>	75
Lampiran ELISA READER.....	76
Lampiran IFN- γ ELISA Kit.....	76

ABSTRAK

Latar belakang : *Echinacea sp* merupakan salah satu imunostimulator yang dapat meningkatkan imunitas seluler, yang telah tersedia di pasaran. Pada penderita yang menderita karsinoma payudara yang mengalami stres, respon imun akan bergeser ke respon imunitas humoral. Salah satu respon imunitas seluler yang berguna dalam perondaan sel kanker adalah peningkatan produksi IFN- γ dan respons terhadap perondaan sel kanker dapat dilihat dari indeks apoptosis sel tumor.

Tujuan : Membuktikan terdapatnya perbedaan produksi IFN- γ dan indeks apoptosis sel tumor antara yang diberi *Echinacea sp* dan yang tidak diberi.

Metoda : Dilakukan penelitian *post test only control group design* pada hewan coba. Sampel 18 ekor mencit C3H yang diinokulasi adenokarsinoma payudara, dibagi 3 kelompok yang terbagi K-P1-P2, pada P1 diberikan diet standart dan stres sedangkan P2 diberikan diet standard, *Echinacea sp* 0,195 mg/gramBB/hari dan stres. Perlakuan dilakukan selama 10 hari. Analisis statistik dengan menggunakan uji *One Way ANOVA* dan *Post Hoc Bonferoni Test*.

Hasil : Terdapat perbedaan yang signifikan pada semua kelompok dalam hal produksi IFN- γ ($p=0,001$) dan indeks apoptosis sel tumor ($p=0,004$). Uji *Post Hoc Bonferoni* pada variabel produksi IFN- γ menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,001$) antara kelompok kontrol (K) ($42,75 \pm 6,49$) dan (P1) ($29,83 \pm 2,64$), dan terdapat perbedaan yang bermakna juga ($p=0,019$) antara kelompok (P1) ($29,83 \pm 2,64$) dan (P2) ($38,17 \pm 3,66$). Sedangkan antara kelompok (K) dengan kelompok (P2) tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,307$). Uji *Post Hoc Bonferoni* pada variabel indeks apoptosis menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,004$) antara kelompok (K) ($5,034 \pm 0,274$) dan (P1) ($4,384 \pm 0,169$), dan terjadi perbedaan bermakna ($p=0,038$) juga antara kelompok (P1) ($4,384 \pm 0,169$) dan (P2) ($4,848 \pm 0,169$). Sedangkan antara kelompok (K) dengan kelompok (P2) tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,829$).

Simpulan : Terdapat peningkatan yang signifikan produksi IFN- γ dan indeks apoptosis tumor payudara pada mencit yang diberi *echinacea sp* daripada yang tidak

Kata kunci : *Echinacea sp*, *Produksi IFN- γ* , *Indeks apoptosis*, *karsinoma payudara*, *stres*

ABSTRACT

Background: *Echinacea sp* is one of the immunostimulators which is already available in the market that could increase cellular immunity. Patients with breast carcinoma and stress, the immune response will shift to the humoral immune response. One of the cellular immune response marker is the increase of IFN- γ production and the result can be seen from apoptotic index of tumour cell.

Objective: To prove the difference of IFN- γ production and apoptotic index of tumour cell between that given *Echinacea* and not given.

Material and method: A randomized post test only control group design on 18 C3H-mice that was inoculated by breast adenocarcinomas were divided into 3 groups : K-P1-P2, the P1 group received standard diet and stress, whereas P2 group received standard diet, *Echinacea sp* 0,195 mg/gram/day and stress. The intervention was performed for 10 days. Statistical analysis were using One Way ANOVA Test and Post Hoc Bonferoni test.

Result: There is significantly difference in all groups for IFN- γ production ($p=0,001$) and apoptotic index of tumour cell ($p=0,004$). Post Hoc Bonferoni Test for IFN- γ production is significantly difference ($p=0,001$) for control groups (K) ($42,75 \pm 6,49$) and P1 ($29,83 \pm 2,64$), and have a significantly difference too ($p=0,019$) between P1 ($29,83 \pm 2,64$) and P2 ($38,17 \pm 3,66$). There was no significant differences K with P2 ($p=0,307$). Post Hoc Bonferoni Test for apoptotic index is significantly difference ($p=0,004$) between K ($5,034 \pm 0,274$) and P1 ($4,384 \pm 0,169$), and there is significantly difference ($p=0,038$) between P1 ($4,384 \pm 0,169$) and P2 ($4,848 \pm 0,169$). But between (K) and P2, there is no significantly difference ($p=0,829$).

Conclusion: It is shown this study that the IFN- γ production and apoptotic index of breast tumour between treated mice with *echinaceae* is significantly higher than non treated mice

Key words : *Echinacea sp*, IFN- γ production, apoptotic index, adenokarsinoma mammae, stress

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. LATAR BELAKANG

Kanker merupakan penyebab kematian kedua tertinggi setelah penyakit kardiovaskuler¹. Tumor ganas payudara merupakan keganasan yang sering ditemukan di seluruh dunia, dengan insidensi relatif tinggi yaitu sebesar 20% dari seluruh keganasan. Sekitar 600.000 kasus baru setiap tahunnya dan 250.000 kasus diantaranya ditemukan di negara berkembang, sedangkan 350.000 kasus lainnya ditemukan dinegara maju¹. Di Amerika pada tahun 2003 ditemukan 180.000 kasus baru per tahun, sedangkan pada tahun 2005 di Amerika ditemukan 211.240 kasus baru dengan jumlah kematian 40.410 wanita per tahun².

Insiden tumor ganas payudara di Amerika adalah 100 per 100.000 penduduk per tahun³. Di Asia secara keseluruhan insidennya 20 per 100.000 penduduk per tahun³. Di Indonesia, insiden tumor ganas payudara adalah 100 per 100.000 penduduk, dan menempati urutan kedua jumlah tumor ganas terbanyak (11% dari jumlah seluruh tumor ganas di Indonesia) setelah tumor ganas leher rahim⁴. Data dari BRK-IAPI (Badan Registrasi Kanker Ikatan Ahli Patologi Indonesia) 1994 menunjukkan bahwa persentase tumor ganas payudara wanita menduduki urutan kedua tertinggi (11,77%) setelah tumor ganas rahim (17,70%) dari semua kasus tumor ganas di seluruh senter Patologi Anatomi di Indonesia⁵. Di Jawa Tengah pada tahun 2005 ditemukan sebanyak 3.884 kasus (36,83%) dari keseluruhan kasus tumor ganas dan merupakan urutan kedua setelah tumor ganas

leher rahim. Sedangkan di Semarang pada tahun 2005, ditemukan tumor ganas payudara sebanyak 749 kasus atau 19,62% dari keseluruhan kasus tumor ganas payudara di Jawa Tengah, dan insiden ini berada pada urutan tertinggi⁶. Insiden puncak pada kelompok umur 45-54 tahun⁷.

Data dari Departemen Kesehatan RI hasil survei kesehatan rumah tangga (SKRT) menunjukkan bahwa angka kematian karena tumor ganas payudara meningkat yaitu pada tahun 1972: 1,4%, tahun 1980:3,4% tahun 1986: 4,3%, dan tahun 1992:4,4%⁸. Penyakit tumor ganas umumnya dipandang oleh masyarakat sebagai penyakit yang tidak dapat disembuhkan dan berakhir dengan kematian disertai dengan penderitaan hebat. Asumsi masyarakat yang demikian ini akan sangat menimbulkan stres bagi penderitanya. Stres akan menurunkan imunitas seluler karena bergesernya respon Th1 ke Th2 sehingga terjadi penurunan fungsi makrofag sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC) untuk menghasilkan IFN- γ . Imunitas seluler sangat penting dalam perondaan (*imunosurveillance*) tubuh terhadap sel tumor. Sel imun yang berada disekitar sel kanker dan berperan dalam perondaan terhadap kanker adalah limfosit T sitotoksik (CTL), Sel NK (*Natural Killer*) dan makrofag⁹. Setelah mengenal sel kanker sebagai sel asing, ketiga sel imun tersebut akan menghancurkan sel kanker. Aktivitas sel-sel tersebut melibatkan sitokin-sitokin yang akan memacu aktivitasnya terhadap sel-sel tumor. Salah satu sitokin yang penting adalah Interferon- γ (IFN- γ). IFN- γ adalah aktivator yang kuat untuk sel-sel fagosit mononuklear, dapat meningkatkan ekspresi baik MHC-I maupun MHC-II, meningkatkan sel T untuk berdiferensiasi dan memacu aktivitas sitolitik dari sel-sel NK yang sangat berperan pada imunologi tumor⁹.

IFN- γ sangat penting untuk menstimulasi CTL dan sel-NK untuk melakukan proses *killing* yang mengakibatkan apoptosis dari sel-sel tumor. Apoptosis adalah suatu kematian sel yang terprogram atau *programmed cell death*. Sekali terjadi aktivasi akan menyebabkan reaksi enzimatik intraseluler. Enzim, protein, dan DNA akan terurai. Sel yang mengalami apoptosis akan mengeluarkan signal ke ekstraseluler dan dikenali sel-sel imun. Apoptosis yang terjadi pada populasi sel tumor dapat dinilai dengan indeks apoptosis¹⁰.

Peranan sistem imun tersebut dapat ditingkatkan dengan pemberian imunostimulator yang dapat meningkatkan respon imunitas seluler. Saat ini telah tersedia imunostimulator di pasaran baik dalam bentuk obat maupun minuman suplemen dengan harga murah dan cara yang mudah. Imunostimulator tersebut adalah *Echinacea sp*. *Echinacea sp* dapat memacu makrofag untuk menghasilkan sitokin yang akan membantu regulasi sistem imun. Kultur makrofag yang mendapat stimulasi *Echinacea sp* menunjukkan efek antiviral dibandingkan dengan yang tidak distimulasi¹¹. Sitokin yang dihasilkan makrofag darah perifer mencit yang mendapat *Echinacea purpurea* akan mengaktivasi sel T helper untuk berproliferasi. Dilaporkan juga bahwa aktivasi makrofag yang berhubungan dengan aktivasi limfosit T akan meningkatkan produksi IFN- γ dan merangsang proliferasi sel-sel T sitotoksik^{9,12}.

Imunitas seluler sangat penting dalam perondaan (*imunosurveillance*) tubuh terhadap sel tumor. Belum pernah ditemukan penelitian efek imunostimulator *Echinaceae sp* terhadap respon tubuh pada sel tumor. Dalam penelitian ini digunakan hewan coba mencit C3H yang diberi kanker payudara sebagai obyek penelitian karena merupakan penelitian pra klinik. Sudah banyak

laporan keberhasilan untuk membuat kanker payudara pada hewan coba mencit C3H.

1.2. RUMUSAN MASALAH

Melihat hal-hal tersebut diatas, penelitian ini berusaha menjawab beberapa masalah :

- 1.2.1. Apakah terdapat perbedaan kadar IFN- γ pada kelompok mencit C3H dengan kanker payudara yang mendapatkan stres, antara yang diberi *Echinacea sp* dan yang tidak diberi *Echinacea sp*?
- 1.2.2 Apakah terdapat perbedaan indeks apoptosis pada kelompok mencit C3H dengan kanker payudara yang mendapatkan stres, antara yang diberi *Echinacea sp* dan yang tidak diberi *Echinacea sp*?

1.3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

1.3.1. TUJUAN UMUM

Membuktikan adanya perbedaan kadar IFN- γ dan indeks apoptosis pada mencit C3H dengan kanker payudara yang mengalami stres antara yang mendapat *Echinacea sp* dan yang tidak mendapatkan *Echinacea sp*.

1.3.2. TUJUAN KHUSUS

1. Menganalisis perbedaan kadar IFN- γ mencit C3H dengan kanker payudara yang mendapat stres antara yang mendapat *Echinacea sp* dengan yang tidak mendapatkan *Echinacea sp*.
2. Menganalisis perbedaan indeks apoptosis tumor antara mencit C3H dengan kanker payudara yang mendapat stres antara yang mendapat *Echinacea sp* dengan yang tidak mendapatkan *Echinacea sp*.

1.3.3. MANFAAT PENELITIAN

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi :

1. Bahan informasi mengenai pentingnya penggunaan imunostimulator pada penderita kanker terutama yang mengalami stres sehingga tidak

akan menimbulkan dampak lebih lanjut dengan menurunnya sistem kekebalan seluler yang ditandai dengan rendahnya kadar IFN- γ

2. Bila *Echinacea sp* pada penelitian ini terbukti dapat meningkatkan Indeks Apoptosis dan meningkatkan kadar IFN- γ antara kelompok yang diberi *Echinacea sp* dan yang tidak, maka penggunaan *Echinacea sp* pada penderita kanker dapat dipertimbangkan.
3. Penelitian ini juga bermaksud memberikan alternatif dalam upaya menanggulangi efek negatif berupa penurunan respon imunitas seluler tersebut dengan memberikan *Echinacea* pada penderita kanker terutama yang mengalami stres. Karena penelitian ini dilakukan pada hewan coba maka hasil penelitian ini diharapkan juga dapat memberikan landasan untuk penelitian lebih lanjut pada manusia.

1.4. ORISINALITAS

Penulis	Judul / penerbit	Hasil
Burger R, Torres A, Warren R, Caldwell V, Hughes B.	<i>Echinacea-induced cytokine production by human macrophages.</i> Int J Immunopharmacol. 1997; 19(7): 371-9 ¹¹ .	<i>Echinacea sp</i> dapat meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag alveoler. Disamping itu juga didapatkan peningkatan TNF- α , <i>interferon-γ</i> dan pelepasan <i>Nitric Oxide (NO)</i> makrofag alveoler yang dirangsang dengan <i>Lipopolisakarida (LPS)</i> .
Mishima S, Saito K, Maruyama H, Inoue M, Yamashita T, Ishida T, Gu Y.	<i>Antioxidant and immuno-enhancing effects of Echinacea purpurea.</i> Biol Pharm Bull. 2004;27(7):1004-	Kultur makrofag yang mendapat stimulasi <i>echinacea sp</i> menunjukkan efek antiviral dibandingkan dengan yang tidak distimulasi.

See D, Broumand N, Sahl L, Tilles J.	<i>In vitro effects of echinacea sp and ginseng on natural killer and anti-body-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or AIDS patients.</i> <i>Immunopharmacology.</i> Jan 1997; 35(3): 229-35 ¹³ .	Ekstrak <i>echinacea sp</i> secara nyata akan meningkatkan fungsi imun yang imunitas selulernya tertekan seperti pada AIDS
Bratman S, Kroll D.	<i>Everything You Need to Know About Echinacea and Immunity.</i> Natural Health Bible. Prima Publishing. 1999: 179-81 ¹⁴ .	Penelitian klinis <i>double blind</i> terhadap 120 orang <i>common cold</i> yang mendapat <i>echinacea sp</i> dibanding plasebo didapatkan perbaikan klinisnya lebih cepat pada kelompok yang mendapatkan <i>echinacea sp</i>
Currier NL, Miller SC.	<i>Natural Killer cells from aging mice treated with extracts from echinacea sp purpurea are quantitatively and functionally rejuvenated.</i> <i>Exp Gerontol.</i> 2000 Aug;35(5): 627-39 ¹⁵ .	<i>E.purpurea</i> dengan komponen-komponen fitokimianya dapat merangsang produksi sel-sel NK demikian juga fungsi sitolitiknya pada binatang coba yang mengalami penuaan
Goel V, Chang C, Slama J, Barton R, Bauer R, Gahler R, Basu T.	<i>Echinacea sp stimulates macrophage function in lung and spleen of normal rats.</i> J Nutr Biochem. 2002;13(8):487 ¹⁶ .	<i>Echinacea purpurea</i> lebih meningkatkan sistem imunologis subset CD ⁴⁺ dan CD ⁸⁺ dibanding sel-sel <i>T helper</i> dan sel <i>T supresor</i> sebagaimana hasil penelitiannya dan ini menunjukkan adanya peningkatan respon imunitas seluler

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. KANKER PAYUDARA

2.1.1 Etiologi dan patogenesis

Ada 3 pengaruh penting pada kanker payudara :

a. Faktor genetik

Faktor genetik berpengaruh dalam peningkatan terjadinya kanker payudara¹⁷. Pada percobaan tikus dengan galur sensitif kanker, melalui persilangan genetik didapatkan tikus yang terkena kanker¹⁶. Ada faktor turunan pada suatu keluarga yang terkena kanker payudara. kelainan ini diketahui terletak di lokus kecil di kromosom 17q21 pada kanker payudara yang timbul saat usia muda^{18, 19}.

b. Hormon

Kelebihan hormon estrogen endogen atau lebih tepatnya terjadi ketidak seimbangan hormon terlihat sangat jelas pada kanker payudara¹⁷⁻¹⁹. Banyak faktor resiko yang dapat disebutkan seperti masa reproduksi yang lama, nulipara, dan usia tua saat mempunyai anak pertama akan meningkatkan estrogen pada siklus menstruasi¹⁸. Wanita pasca menopause dengan tumor ovarium fungsional dapat terkena kanker payudara karena adanya hormon estrogen berlebihan¹⁸. Suatu penelitian menyebutkan bahwa kelebihan jumlah estrogen di air seni, frekuensi ovulasi, dan umur saat menstruasi dihubungkan dengan meningkatnya resiko terkena kanker payudara¹⁷. Epitel payudara normal memiliki reseptor estrogen dan progesteron. Kedua reseptor ditemukan pada sebagian besar kanker payudara¹⁷⁻¹⁹. 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 tumor¹⁸. 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 progresif¹⁷⁻¹⁹.

c. Faktor lingkungan

Pengaruh lingkungan diduga karena berbagai faktor antara lain : alkohol, diet tinggi lemak, kecanduan minum kopi, dan infeksi virus¹⁹. Hal tersebut mungkin mempengaruhi onkogen dan gen supresi tumor dari kanker payudara¹⁷.

2.1.2 Stadium klinik kanker payudara

Pengelolaan penderita sangat tergantung pada stadium klinik. Klasifikasi kanker payudara adalah berdasarkan *International Classification of Staging* atau berdasarkan klasifikasi TNM (*Tumour, Node, Metastasis*) *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) atau *International Union Against Cancer* (UICC)²⁰.

Apabila pada penderita karsinoma primer telah ditemukan penyebaran metastasis ke kelenjar limfe aksilaris, kemungkinan hidup 5 tahun dan 10 tahun lebih rendah bila dibandingkan pada penderita tanpa metastasis. Penderita dengan metastasis jauh mempunyai prognosis yang lebih buruk^{20,21}.

American Joint Committee on Cancer (AJCC) membuat sistim *staging* untuk mengelompokkan penderita kanker payudara berdasarkan prognosanya. Keputusan terapi diformulasikan dengan mempertimbangkan katagori- katagori tersebut, terutama adalah ukuran tumor status limfonodi, tingkat reseptor estrogen dan progesteron pada jaringan tumor, status menopause dan keadaan umum kesehatan pasien. *Staging* dari AJCC didisain berdasarkan klasifikasi TNM^{20,21}.

2.2. RESPON IMUNOLOGIK TERHADAP SEL TUMOR GANAS

Respon imun merupakan hasil interaksi antara antigen dengan sel-sel *imunokompeten*, termasuk mediator-mediator yang dihasilkannya. Limfosit merupakan unit dasar terbentuknya respon imun karena selain mampu berdiferensiasi menjadi seri lainnya, juga karena berperan dalam mengenal sekaligus bereaksi dengan antigen. Limfosit T dapat bertindak sebagai efektor dalam respon imun, tetapi dapat pula bertindak sebagai regulator respon imun

karena kemampuannya dalam mempengaruhi aktifitas sel *imunokompeten* lainnya melalui *limfokin* yang dilepaskannya. Limfosit T-*helper* (Th) akan mempengaruhi produksi *immunoglobulin* oleh limfosit B. Setelah limfosit B berkontak dengan antigen kemudian berproliferasi, sebagian berdiferensiasi menjadi sel plasma yang berfungsi mensintesis serta mensekresi *immunoglobulin*, dan sebagian lagi menjadi limfosit B memori²²⁻²⁸.

Induksi limfosit T dalam respon imun hampir selalu bersifat makrofag “*dependent*”. Makrofag berfungsi untuk memproses *immunogen* dan menyajikannya – sebagai *Antigen Presenting Cells* (APC) – 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 imunogen²²⁻²⁸.

2.2.1. Antigen tumor

Meski tumor ganas berasal dari jaringan tubuh sendiri, ada beberapa sel tumor yang dapat mengekspresikan molekul yang akan dikenali oleh limfosit B dan T sebagai benda asing. Protein asing pada permukaan sel tumor ganas juga menjadi target sel NK. Sedangkan antigen tumor dapat dikelompokkan menjadi :

- *Tumor-specific antigens* (TSAs)

Adalah tumor antigen yang diekspresikan oleh sel tumor ganas tetapi tidak diekspresikan oleh sel-sel normal. Dan bila antigen ini karakteristik untuk satu jenis tumor / satu *clone* tumor disebut *Unique tumor antigen*.

- *Tumor-associated antigens* (TAAs)

Bila tumor antigen juga diekspresikan oleh jaringan normal di dalam tubuh, antigen ini juga dapat menginduksi respon imun tetapi biasanya tidak menginduksi respon imun tubuh.

Antigen tumor biasanya diekspresikan bersama *Major Histocompatibility Complex* kelas I (MHC kelas I) yang akan dikenali oleh sel limfosit T CD8. Jadi sel tumor sendiri dapat menjadi *Antigen Presenting Cells* (APCs) dari antigennya sendiri. Dan apabila protein antigen ini terlepas ke medium ekstraseluler bersama sel tumor yang mati atau sel tumor yang utuh akan diendositososis oleh APCs dan diekspresikan sebagai MHC tipe II yang akan dikenali oleh limfosit *T Helper* CD4²²⁻²⁸. Antigen tumor yang diekspresikan bisa berasal dari anomali sintesa protein maupun anomali dari sintesa protein tumor *supressor* pada sel *maligna*. Beberapa tumor antigen yang menstimulasi respon sel-T antara lain dapat dilihat pada tabel-1.

Tabel-1. Tumor antigen yang menstimulasi respon sel-T²².

Kategori	Contoh
Produk Onkogen	p21^{ras} protein (10% karsinoma pada manusia) p210 (chronic myelogenous leukemia) HER-2/neu , merupakan over ekspresi dari gen normal (karsinoma mamma)
Produk dari gen <i>tumor-supressor</i> yang mengalami mutasi	p53 (\approx 50% ca mamma pada manusia)
Produk dari gen virus yang berkaitan dengan keganasan	SV40T antigen HPV E6 dan E7 (karsinoma serviks pada manusia) EBNA-1 (<i>limphoma Burkitt's</i> , dan karsinoma nasofaring)

2.2.2. Peran sistem imun pada tumor

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 tumor²²⁻²⁷.

Beberapa bukti yang mendukung bahwa ada peran sistem imun dalam melawan tumor ganas diperoleh dari beberapa penelitian, diantaranya yang mendukung teori itu adalah:

- a. Banyak tumor mengandung infiltrasi sel-sel mononuklear yang terdiri atas sel T, Sel NK dan Makrofag
- b. Tumor dapat mengalami regresi secara spontan

- c. Tumor lebih sering berkembang pada individu dengan *imunodefisiensi* atau bila fungsi sistem imun tidak efektif; bahkan *imunosupresi* seringkali mendahului pertumbuhan tumor
- d. Dilain pihak tumor seringkali menyebabkan *imunosupresi* pada penderita
- e. 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 *Interseleuler adhesion molecule* (ICAM) yang mengindikasikan sistem imun yang aktif²²⁻²⁷.

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^{25,29}. Hubungan antara banyaknya limfosit yang ditemukan diantara kelompok sel kanker secara histologi dengan prognosis penderita telah ditunjukkan pada kanker leher rahim³⁰.

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 kanker²²⁻²⁷.

Sel CTL dan sel NK melakukan cara sitotoksitas yang sama yaitu dengan mengeluarkan perforin/granzym^{10,19,26}. 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^{10,19,25}. Komponen efektor pada sistem imun yang memiliki kemampuan bereaksi dengan sel tumor ialah limfosit T, *antibody-dependent cellular cytotoxicity* (ADCC), sel NK dan makrofag²²⁻²⁸.

Respon Imun pada dasarnya terdiri dari tiga fase :

- a. Fase Kognitif

Fase kognitif dari respon imun terdiri dari pengikatan *immunogen* 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.

b. Fase Aktifasi

Fase aktifasi 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. 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. Limfosit T *helper* tersebut juga menghasilkan *interleukin* lain yang dapat menginduksi berbagai sel lain seperti limfosit B, makrofag, *precursor* 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. Pada fase Efektor, imunogen tidak lagi berperan kecuali sebagai suatu target untuk dihancurkan²²⁻²⁸.

2.2.3 Peran IFN- γ

IFN- γ disebut juga interferon tipe 2, yaitu glikoprotein homodimer yang terdiri dari dua subunit 21 kD sampai 24 kD. Variasi subunit ini disebabkan bervariasinya derajat glikosilasi, tetapi masing-masing subunit identik dengan polipeptida 18 kD yang dikode dari gen yang sama, diproduksi oleh aktivasi sel T CD4⁺, CD8⁺ dan sel NK²²⁻²⁸.

IFN- γ berfungsi dalam imunoregulasi sebagai berikut:²²⁻²⁸

1. IFN- γ adalah aktivator yang kuat untuk fagosit mononuklear.

Dapat secara langsung menginduksi sintesis enzim yang memediasi “*respiratory burst*” sehingga memungkinkan makrofag manusia membunuh mikroba yang telah difagositosis. Makrofag dapat bekerjasama dengan TNF atau LT untuk menginduksi NO Sintase sehingga menghasilkan NO yang berfungsi untuk melakukan “*killing*” intrasel. Merupakan *Macrophage Activating Factors* (MAFs) utama yang menunjukkan adanya bukti bahwa makrofag diaktivasi oleh sel Th1. Sedangkan MAFs yang lain adalah GM-CSF, dan yang pengaruhnya kecil yaitu: IL-1, TNF dan LT.

2. IFN- γ dapat meningkatkan ekspresi baik MHC-I maupun MHC-II.

Jadi IFN- γ akan melipatgandakan fase kognitif respon imun dengan memacu ikatan MHC-II dengan Limfosit T CD4⁺. Dengan pelipatgandaan fase kognitif ini, secara *in vivo*, IFN- γ akan mempercepat respon seluler maupun humoral.

3. IFN- γ akan meningkatkan sel T untuk berdiferensiasi.

Disini IFN- γ akan memacu *naïve* CD4⁺ untuk berdiferensiasi ke subset sel Th1 dan menghambat proliferasi Th2 pada percobaan dengan mencit. Efek ini mungkin terjadi karena diperantarai oleh aktivasi sel fagosit mononuklear yang melepaskan IL-12 dan sel T yang mengekspresikan reseptor IL-12. IFN- γ juga dibutuhkan untuk maturasi sel T sitolitik CD8⁺.

4. IFN- γ berfungsi pada sel B untuk memacu *switching* ke sub kelas IgG2a dan IgG3 di mencit dan menghambat *switching* ke IgG1 dan IgE.

IFN- γ akan mempengaruhi subtype IgG dalam berikatan dengan Fc γ Rs pada sel fagosit dan NK, juga berpengaruh secara kuat pada IgG yang diaktivasi oleh komplemen. Jadi IFN- γ akan menginduksi respon antibodi yang akhirnya berpengaruh pada eliminasi mikroba oleh fagosit.

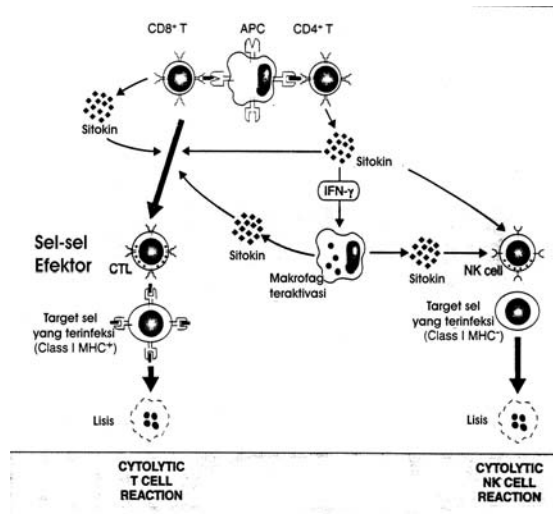
5. IFN- γ mengaktivasi netrofil untuk melakukan *respiratory burst* meskipun pengaruhnya kalah kuat dibandingkan TNF atau LT.
6. IFN- γ memacu aktivitas sitolitik dari sel-sel NK yang sangat berperan pada imunologi tumor.
7. CD4⁺ dan perubahan morfologiknya untuk melakukan ekstrasvasasi. IFN- γ juga meningkatkan fungsi TNF di sel-sel endothelial.

Hasil akhir dari berbagai aktivitas ini adalah memacu reaksi inflamasi yang mendatangkan makrofag dan disisi lain menghambat reaksi eosinofil yang tergantung Ig E. Mencit *knockout* yang telah dirusak IFN- γ nya atau dirusak reseptor IFN- γ nya menunjukkan defek imunologis yang berat²²⁻²⁸.

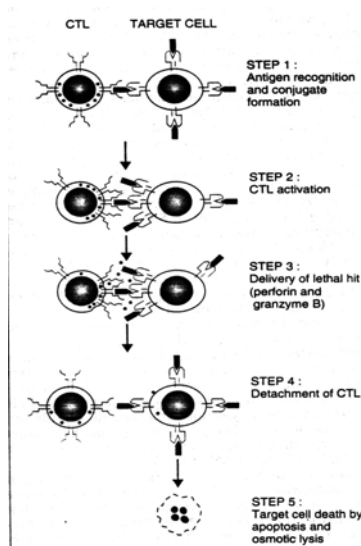
2.2.4. Limfosit T sebagai Efektor anti tumor

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), mengaktifasi 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 mengaktifasi 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 sitotoksitas dari sel T-sitotoksik (CD8)²²⁻²⁸

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 (Gambar 1). Beberapa tumor yang antigennya diekspresikan bersama dengan 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 memfagositosis, memproses dan menampilkan protein yang berasal dari sel-sel tumor yang mati kepada sel T CD4⁺, sehingga terjadi aktivasi sel-sel tersebut. Proses sitolitik CTLs terhadap sel target dengan mengaktifkan penggunaan enzim Perforin dan Granzym, ada beberapa langkah proses sitolitik CTLs terhadap sel target (Gambar 2)²²⁻²⁸



Gambar 1. Reaksi immune *T-Cell mediated*²⁴.



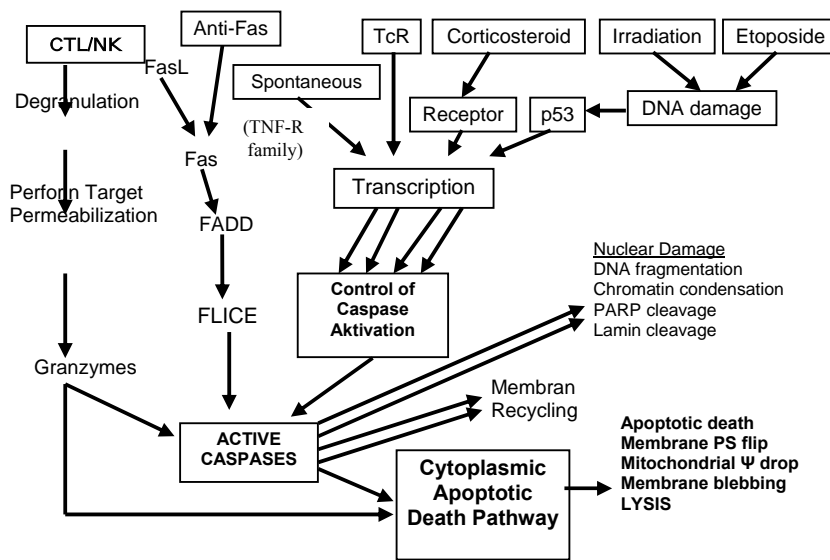
Gambar 2. Tahapan sitolitik sel target oleh CTLs²⁵.

2.2.5. Apoptosis

Apoptosis adalah suatu kematian sel yang terprogram atau *programmed cell death*. Sekali terjadi aktivasi akan menyebabkan reaksi enzymatic intraseluler. Enzim, protein, dan DNA akan terurai, dan tidak ada komponen intraseluler yang

terdispersi ke ekstraseluler. Sel mengalami apoptosis akan mengeluarkan signal ke ekstraseluler berupa phospholipid pada membrane selnya yang dapat dikenali oleh sel-sel imun, terutama makrofag¹⁰.

Ada banyak stimulasi yang dapat menginduksi apoptosis. Stimulasi utama adalah agen kemoterapi, ultraviolet/radiasi, panas, *osmotic imbalance*, dan *Nitric Oxide*. Menurut jenis triger dan tipe selnya, ada banyak jalur signal untuk mengaktifasi apoptosis (Gambar 3). Yang akan kami sebutkan disini adalah apoptosis yang diinduksi oleh CTL dan sel-NK yang diinduksi baik oleh *nonsecretory induced*, *ligand-induced*, dan *secretory induced* dengan granzyme melalui perantaraan sekresi perforin^{10,24}.



Gambar-3. Jalur Kematian Sel Target yang dipengaruhi oleh CTL/NK²⁴

Kerusakan DNA dipicu oleh enzym caspase aktif, di mana caspase ini merupakan suatu molekul protein 10 dan 20 kD berupa protease cystein. Saat ini sudah dikenal ± 12 jenis caspase. Protein target dari caspase ini adalah protein

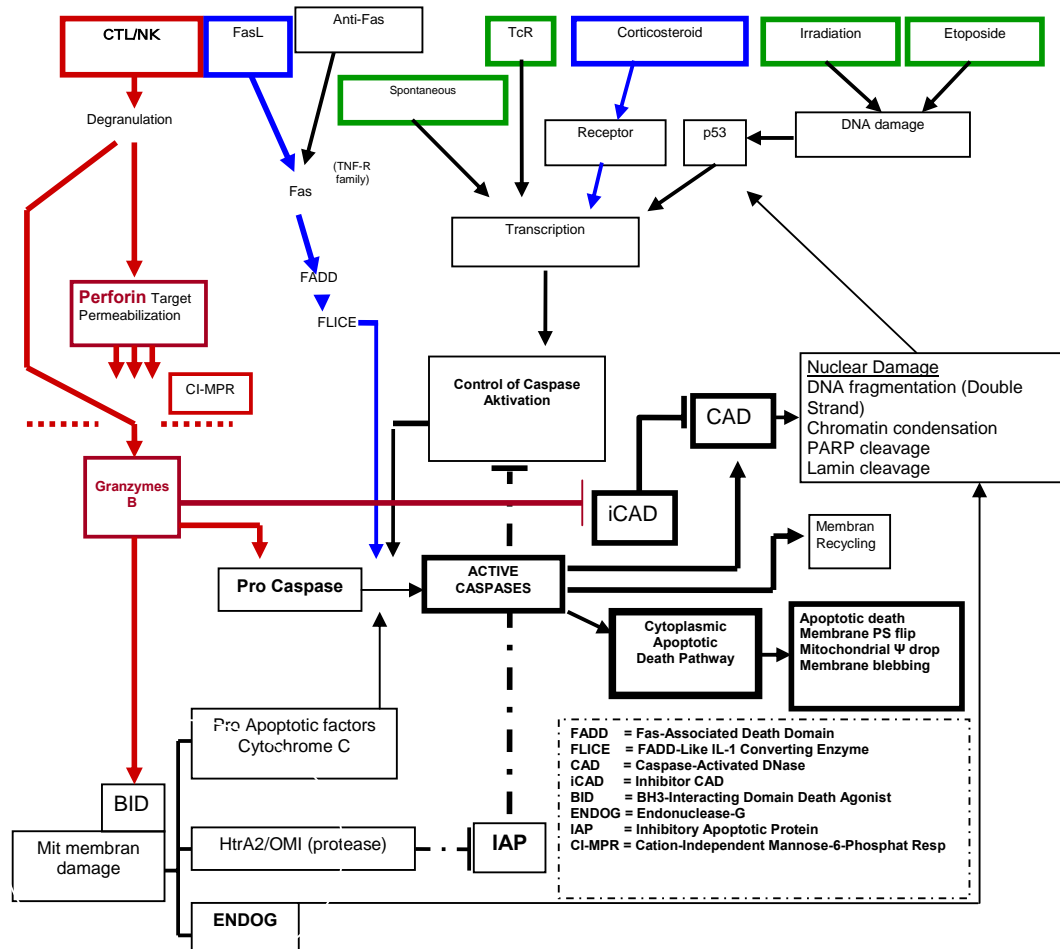
DNA repair system [seperti (ADP-ribose)-polymerase], protein struktural/sitoskeletal (seperti lamin, actin, cytokeratin, dll) , dan onkoprotein (terutama Rb protein). Yang terakhir diketahui, caspase juga akan mengaktifkan Dnase yang menyebabkan kerusakan DNA selama apoptosis. Sehingga yang akan terjadi adalah merusak organel dan inti sel^{10,24}.

Caspase (terutama caspase 8 dan 10) dapat diaktifkan oleh granzyme maupun suatu katalisator protease yaitu FLICE (*FADD-Like IL-1 Converting Enzyme*) yang berikatan oleh FADD (*Fas-Associated Death Domain*), pada reseptor CD95/Fas setelah kontak dengan Fas ligand. Pengaktifan caspase melalui reseptor CD95/Fas terjadi bila kontak dengan Fas ligand. Fas ligand ini bisa berasal dari ekspresi protein antigen dari CTL, sitokin TNF, ataupun metabolit ligand pada Fas reseptor.²³

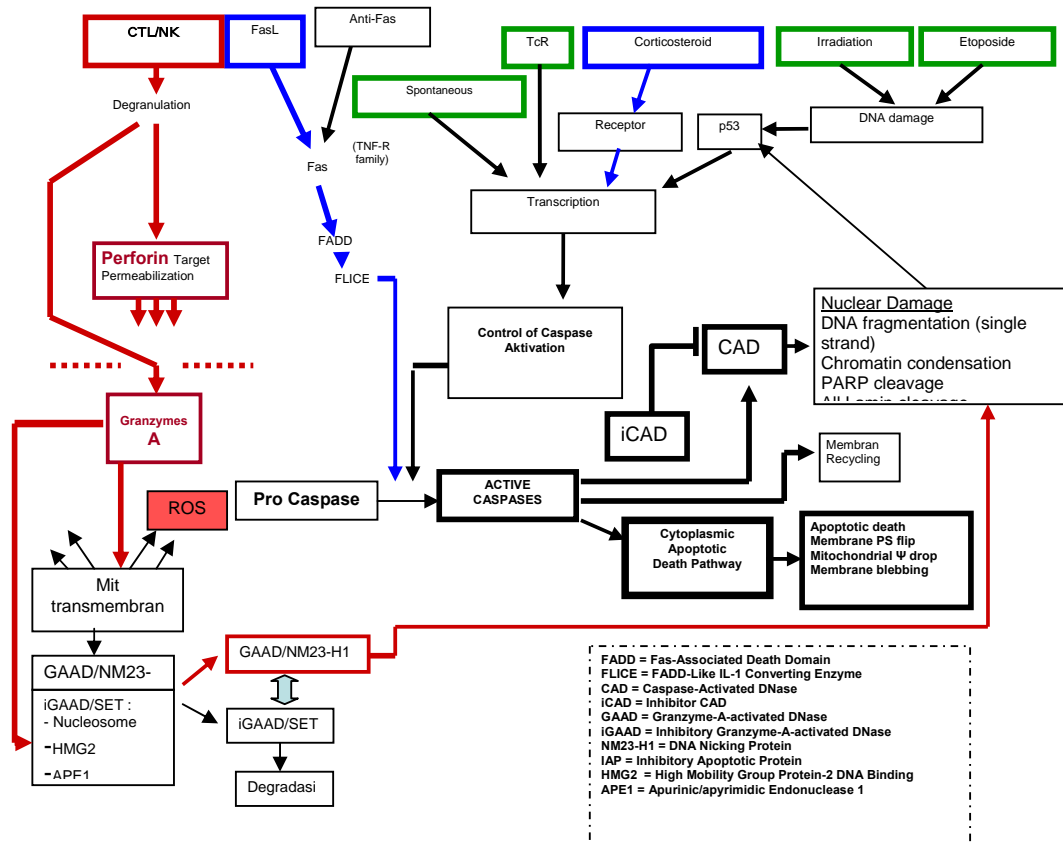
Aktifasi *secretory induce* caspase dilakukan oleh CTL dan sel-NK oleh granula sitotoksiknya yang berisi protein *pore-forming* perforin (cytolysin) dan enzim famili dari serine protease yang bernama granzyme sebagai senjata dari CTL/sel-NK. Granzyme ini terdiri dari granzyme B (gambar-4), granzyme A (gambar-5), C,D,E,F,G,H,K, dan M²⁴.

Secara mikroskopik apoptosis dapat diketahui dengan pengecatan HE, dengan melihat *apoptotic body* yang ada. *Apoptotic body* secara mikroskopik dengan pengecatan HE akan tampak sebagai sel tunggal bulat dengan gambaran kromatin yang terkondensasi berwarna basofilik, kadang gambaran kromatinnya terlihat pecah-pecah, dengan sitoplasma yang eosinofilik. Sering terlihat *apoptotic body* terpisah dari sel-sel sekitarnya yang intak dengan gambaran halo yang

jelas¹⁰. Indeks apoptosis dihitung sesuai dengan metoda yang digunakan oleh Aihara M et al¹⁰.



Gambar-4. Jalur Apoptosis Sel Target yang diinduksi oleh granzyme B²⁴.

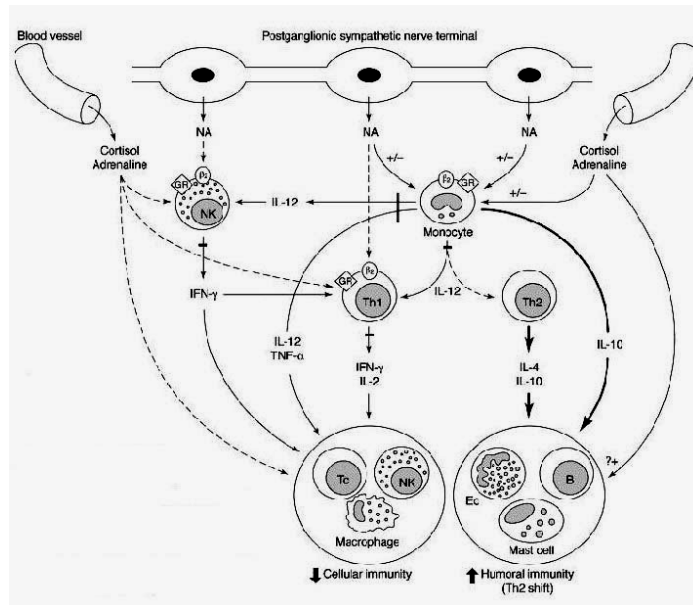


A²⁴ **Gambar-5. Jalur Apoptosis Sel Target yang diinduksi oleh granzyme**

2.3. PENGARUH STRES TERHADAP RESPONS IMUNITAS SELULER

Stres sangat berpengaruh terhadap imunitas tubuh melalui stimulasi sekresi *kortisol* dan *adrenalin* dari korteks dan medula adrenal. Juga berpengaruh terhadap pelepasan *noradrenalin* dari *postganglion* simpatik terminal saraf di pembuluh darah dan organ limfoid. Efek sistemik dari glukokortikoid dan katekolamin ini mempengaruhi pengaturan sitokin tipe 1 dan tipe 2. Stres akan

menurunkan produksi sitokin tipe 1 yang dibutuhkan dalam menanggapi infeksi bakterial melalui respon imunitas seluler (Gambar 6) ⁹.



Gambar 6. Mekanisme yang terjadi pada stress dan sistem imun⁹

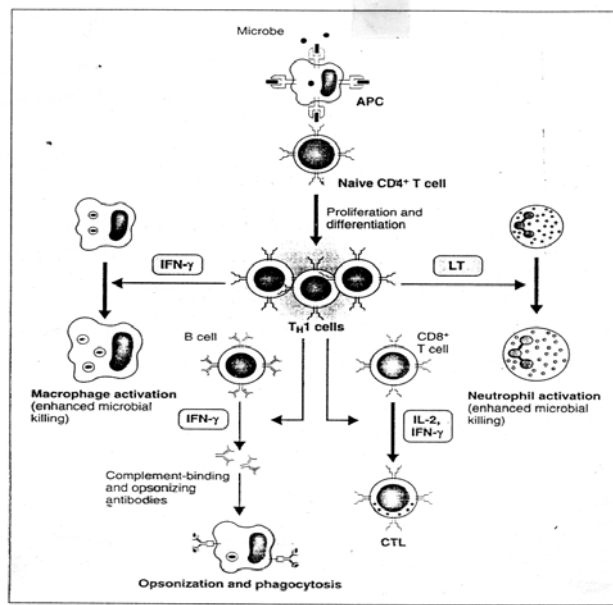
Sel T CD4+ yang telah teraktifasi akan berdiferensiasi tergantung tipe stimulan terutama adalah sitokin yang dihasilkan pada saat pengenalan antigen. Sitokin terpenting yang dihasilkan sel Th1 pada fase efektor adalah IFN- γ . IFN- γ akan memacu aktifitas pembunuhan mikroba sel-sel fagosit dengan meningkatkan destruksi intrasel pada mikroba yang difagositosis. Jadi fungsi pokok efektor Th1 adalah sebagai pertahanan infeksi dimana proses fagositosis sangat diperlukan. Th1 juga mengeluarkan IL-2 yang berfungsi sebagai faktor pertumbuhan autokrin dan memacu proliferasi dan diferensiasi sel T CD8+. Jadi Th1 berfungsi sebagai pembantu (helper) untuk pertumbuhan sel limfosit T sitotoksik yang juga meningkatkan imunitas terhadap mikroba intrasel. Sel-sel Th1 memproduksi LT yang meningkatkan pengambilan dan aktifasi netrofil (gambar 7) ^{9,25}.

Karakteristik sitokin yang dihasilkan Th2 adalah IL-4 dan IL-5. Sehingga Th2 adalah mediator untuk reaksi alergi dan pertahanan infeksi terhadap cacing dan arthropoda. Th2 juga memproduksi sitokin seperti IL-4, IL-13 dan IL-10 yang bersifat antagonis terhadap IFN- γ dan menekan aktivasi makrofag. Jadi Th2 kemungkinan berfungsi sebagai regulator fisiologis pada respon imun dengan menghambat efek yang mungkin membahayakan dari respon Th1. Pertumbuhan yang berlebihan dan tak terkontrol dari Th2 berhubungan dengan berkurangnya imunitas seluler terhadap infeksi mikroba intraseluler seperti mikobakteria (gambar 8)^{9,25}.

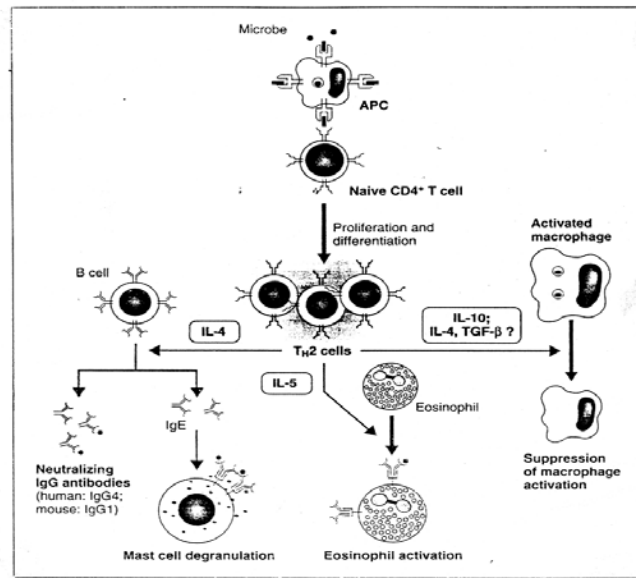
Diferensiasi Sel T CD4⁺ menjadi Th1 dan Th2 tergantung sitokin yang diproduksi pada saat merespon mikroba yang memacu reaksi imunitas. Beberapa bakteri intraseluler seperti *Listeria* dan *Mycobakteria* dan beberapa parasit seperti *Leishmania* menginfeksi makrofag dan makrofag merespon dengan mengeluarkan IL-12. Mikroba lain mungkin memacu produksi IL-12 secara tidak langsung. Misalnya virus dan beberapa parasit memacu sel NK untuk memproduksi IFN- γ yang memacu makrofag mengeluarkan IL-12. IL-12 berikatan dengan Sel T CD4⁺ sehingga memacu untuk menjadi sel Th1. IL-12 juga meningkatkan produksi IFN- γ dan aktifitas sitolitik yang dilakukan oleh sel T sitotoksik dan sel NK sehingga memacu imunitas seluler. IFN- γ yang diproduksi Th1 akan menghambat proliferasi sel Th2 sehingga meningkatkan dominasi sel Th1^{9,25}.

Diferensiasi Sel T CD4⁺ menjadi Th2 dipacu oleh IL-4. Peranan IL-4 untuk memacu diferensiasi sel T CD4⁺ menjadi Th2 menimbulkan pertanyaan, darimana datangnya IL-4 sebelum Th2 dipacu karena sel Th2 adalah sumber

utama IL-4. Ternyata Sel T CD4⁺ mengeluarkan IL-4 dalam jumlah kecil pada saat aktivasi inisial. Apabila antigen bersifat persisten dan berada dalam konsentrasi tinggi maka konsentrasi lokal IL-4 perlahan-lahan akan meningkat. Jika antigen tidak memicu inflamasi dengan mengeluarkan IL-12 maka hasilnya adalah peningkatan diferensiasi Sel T ke subset Th2 dan terjadi penumpukan efektor Th2. Jadi respon terhadap parasit cacing dan alergen lingkungan yang menyebabkan bergeser ke Th2 adalah stimulasi sel T yang persisten dan berulang-ulang dengan inflamasi yang kecil atau aktivasi makrofag. Keterangan lain yang diajukan adalah produksi IL-4 oleh tipe sel lain dan perbedaan struktur antigen atau signal yang melengkapi APC selain sitokin. Faktor genetik juga mempengaruhi apakah akan bergeser ke Sel Th1 atau Th2^{9,25}.



Gambar 7. Fungsi sel-sel Th1²⁵



Gambar 8. Fungsi sel-sel Th2²⁵

2.4. Echinacea sp *SEBAGAI IMUNOSTIMULATOR*

2.4.1. Latar belakang *Echinacea sp*

Suplemen diet *Echinacea sp* berisi ekstrak segar bagian tumbuhan yang berada diatas tanah dan dipanen pada musim berbunga, meskipun bagian lain tumbuhan itu telah digunakan untuk kepentingan medis. Dari 9 spesies, *E.angustifolia*, *E.purpurea* dan *E.pallida* sudah biasa digunakan untuk mengobati *common cold* dan infeksi saluran pernafasan atas (ISPA). Meskipun sudah lama *E.angustifolia* diketahui mempunyai efek imunostimulasi yang besar tetapi sekarang tidak banyak digunakan^{32,33,34}. *E.purpurea* lebih mudah dibudidayakan secara komersial, sehingga merupakan spesies yang paling banyak digunakan di Amerika³⁵.

Echinacea sp memegang peranan penting pada pengobatan tradisional di Amerika. Nama umumnya adalah *cone flower*, *black susan*, *black sampson*, *Rudbeckia*, *Missouri snakeroot*, *Red sunflower*, *coneflower* ungu dan *narrow-leafed coneflower*. Ekstrak *echinacea sp* sering diresepkan sampai diperkenalkan sulfa pada tahun 1930-an. Tanaman obat ini menjadi populer lagi pada tahun 1980-an³⁶.

Echinacea sp telah digunakan dengan aman selama berabad-abad. *Echinacea sp* dapat meningkatkan jumlah sel darah putih dan meningkatkan daya tahan tubuh, merangsang sel-sel *killer* dan menunjukkan aktifitas antiviral³⁷. Kegunaan *echinacea sp* adalah untuk terapi suportif *common cold*, infeksi traktus respiratorius kronik, pengobatan infeksi *traktus urinarius* bawah dan pengobatan luka superfisial bila diberikan secara eksternal. Pada percobaan manusia dan hewan, sediaan diberikan secara oral atau parenteral untuk menghasilkan efek imunostimulasi. Diantara aksi-aksi fisiologik yang lain, jumlah sel-sel darah putih meningkat, fagositosis granulosit manusia meningkat dan peningkatan temperatur tubuh³⁷.

Aktifitas lainnya bisa bersifat antiviral, antiinflamasi, antibakterial yang secara terus-menerus dilaporkan pada percobaan-percobaan invitro. Komponen kimia yang terdapat pada *Echinacea sp* meliputi karbohidrat: *polisakarida* (*arabinogalaktan*, *xyloglycan*, *echinacin*), *inulin*; *glikosida*: *asam kafeat* dan derivatnya (*chichoric acid*, *echinacoside*, *chlorogenic acid*), *cynarin*; *alkaloids*: *isotussilagine*, *tussilagine*; *alkylamides* (alkamides) seperti *echinacein*; *polyacetylenes*; *germacrene sesquiterpene* alkohol; komponen lain: *glikoprotein*, *flavonoids*, *resin*, asam lemak, minyak esensial, *phytosterol* dan mineral. Derivat

asam kafeat, *cynarin*, polisakarida, dan glikoprotein bersifat polar sedangkan *alkylamides* dan *polyacetylenes* bersifat lipofilik. Penelitian untuk mencari komponen aktif *Echinacea sp* telah dilakukan sejak lama, tetapi hasilnya masih belum pasti³⁵. Karena komponen kimia yang begitu banyak terdapat pada *Echinacea sp* dan komposisinya berbeda-beda di tiap bagian tanaman dan tiap spesies, maka bahan aktif yang sebenarnya memiliki efek imunomodulasi belum diketahui. Banyak *herbalist* yang menyimpulkan bahwa efek yang muncul karena adanya interaksi diantara komponen-komponen tersebut, tetapi hal ini belum dievaluasi secara formal^{38,39}.

2.4.2 Mekanisme *Echinacea sp* sebagai Imunostimulator

Echinacea sp mempengaruhi sistim imun terutama sistim imun non spesifik³⁸. Pemberian *Echinacea sp* meningkatkan respon imun fase awal dan mempercepat terjadinya respon imun adaptif. Burger A. Roger dkk melakukan percobaan secara *in vitro* menggunakan *fresh pressed juice* dan *dried juice Echinacea sp* dengan konsentrasi 10µg/ml-0,012 µg/ml yang dicampur dengan makrofag darah tepi manusia yang telah diisolasi dan dibandingkan dengan kelompok kontrol (*endotoksin* yang distimulasi dan tidak distimulasi). Dilakukan penghitungan produksi sitokin rata-rata. Dari hasilnya didapatkan bahwa kultur makrofag yang telah dicampur dengan *Echinacea sp* bermakna meningkatkan produksi IL-1, IL-6, IL-10 dan TNF-α (P<0,05), pada semua konsentrasi yang

digunakan. Bagaimana mekanisme aktivasi sistem imun melalui jalur sitokin ini oleh *Echinacea sp* belum diketahui. Disamping itu *Echinacea sp* juga diketahui dapat mengaktifasi *Natural Killer* (NK) sel dan *antibody-dependent cellular cytotoxicity* oleh sel mononuklear³⁹.

2.4.3 Hasil-hasil penelitian *Echinacea sp*

Bahan aktif *Echinacea sp* adalah *echinacoside*, polisakarida (*echinacin*), antibiotik *polyacetylenes*, *betaine*, *caffeic acid glycosides*, *inulin*, *isobutyl amides*, minyak esensial (*humulene*, *caryophyllene*), *isobutyl+alkylamine*, *resin*, *flavonoid* (pada akar dan batang), ester *sesquiterpene* (*echinadiole*, *epoxyechinadiole*, *echinax-anthole* dan *dihydro-xynardole*).

Penelitian-penelitian terdahulu menunjukkan bahwa *Echinacea sp* dapat meningkatkan produksi antibodi, jumlah dan aktifitas sel-sel darah putih sehingga dapat disimpulkan hal-hal inilah yang meningkatkan sistem kekebalan untuk mencegah sakit⁴⁰⁻⁴⁵. Bahkan pada salah satu buku yang berjudul “*The AIDS Fighters*” menyebutkan bahwa *Echinacea sp* mungkin dapat membantu meningkatkan sistem kekebalan tubuh yang menurun pada penderita AIDS⁴⁶.

Pada penelitian *invivo* menggunakan tikus *sprague-dawley* didapatkan bahwa kandungan aktif *Echinacea sp* yang meliputi *cichroid acid*, polisakarida dan alkylamid yang diberikan dalam dosis bertingkat sebanyak 2 kali sehari selama 4 hari akan meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag alveoler. Disamping itu juga didapatkan peningkatan TNF- α dan pelepasan *Nitric Oxide* (NO) makrofag

alveoler yang dirangsang dengan Lipopolisakarida (LPS). Selain itu juga didapatkan peningkatan kadar TNF- α dan IFN- γ pada makrofag liennya⁴¹.

Penelitian efek protektif *Echinacea purpurea* terhadap radiasi dievaluasi dengan mengukur subset limfosit T pada darah perifer mencit setelah mendapatkan irradiasi seluruh tubuh. *Echinacea purpurea* mengaktivasi makrofag untuk memproduksi IFN- γ yang berhubungan dengan efek sekunder aktivasi limfosit T, sehingga terjadi penurunan produksi IgG dan IgM. Sitokin yang dihasilkan makrofag darah perifer mencit yang mendapat *Echinacea purpurea* akan mengaktivasi sel T helper untuk berproliferasi. Dilaporkan juga bahwa aktivasi makrofag yang berhubungan dengan aktivasi limfosit T sekunder akan meningkatkan kadar IFN- γ dan merangsang proliferasi sel-sel T sitotoksik dan sel-sel T supresor. Peneliti berpendapat bahwa *Echinacea purpurea* lebih meningkatkan sistem imunologis Th1 yang menunjukkan aktifnya respon imunitas seluler yang penting dalam perondaan sel kanker⁴⁴.

Echinacea sp yang diberikan selama 10 hari sesaat orang mengalami gejala *common cold* dapat mengurangi gejala-gejala simptomatis yang dialami. Dalam penelitian *double blind* terhadap 120 orang yang mendapat *echinacea* dibanding plasebo didapatkan bahwa hanya 40% yang menjadi *common cold* pada kelompok yang mendapat *echinacea*, sementara 60% yang mendapat plasebo benar-benar mengalami sakit. Yang menarik dalam penelitian ini bahwa mereka yang benar-benar menjadi sakit, perbaikan klinisnya lebih cepat pada kelompok yang mendapatkan *Echinacea sp*⁴⁴.

2.4.4. Keamanan dan khasiat *Echinacea sp*

Meskipun sekolah farmasi di *Richmond, Virginia* sudah menyatakan bahwa *Echinacea sp* aman, namun para peneliti dalam edisi *Pharmacotherapy* pada bulan Juni 2000 menegaskan lagi bahwa *echinacea sp* aman untuk digunakan. Pasien-pasien tanpa kontraindikasi tidak perlu dicegah bila akan menggunakan sediaan *echinacea sp* untuk mengobati *commom cold*⁴⁷.

Penelitian *RCT double blinded* tahun 1999 juga mendukung kemanjuran dan keamanan *Echinacea sp*. Para peneliti Jerman meneliti 238 kasus *common cold*. Pasien –pasien diberi *Echinacea sp* atau plasebo selama 7 sampai 9 hari dan ditanya beratnya gejala *common cold* menggunakan skala yang berjumlah 10. Dokter juga memeriksa pasien di hari ke-4 dan ke-8. Pasien-pasien yang menderita sakit dalam skala sedang pada awalnya menunjukkan perbaikan sebesar 55% pada kelompok yang mendapat *Echinacea sp* dibandingkan 27% pada kelompok plasebo. Pasien yang mendapat terapi lebih awal akan menunjukkan perbaikan yang lebih cepat, pada umumnya pada hari ke-2, dilanjutkan sampai akhir pengobatan. Semua perbaikan terlihat pada 3 hari pertama pada kelompok yang mendapat *Echinacea sp* dan tidak ada efek serius yang dilaporkan. Para peneliti menyimpulkan bahwa *Echinacea sp* adalah aman digunakan. Mereka juga menggarisbawahi bahwa kegunaan terapetikanya adalah cepatnya onset penyembuhan gejala *common cold* dan perlunya menggunakan *echinacea sp*

sesegera mungkin bila gejala-gejala *common cold* mulai dirasakan. Keampuhan *Echinacea sp* mengatasi flu sudah banyak dibuktikan⁴⁷.

Hasil uji invitro yang dilakukan A. Vogel pada tahun 1999 bekerja sama dengan tim riset dari *Eidgenossische Technische Hochschule* (Institut Tehnologi Federal Swiss), *Echinacea sp* mengandung senyawa *alkilamid*. Senyawa ini menetap dalam reseptor CB2 dari sel imun. *Alkilamid* membantu mengendalikan TNF- α , pengaktif sistem kekebalan tubuh. Senyawa lainnya antara lain asam *sikorat*, *polisakarida*, *glikoprotein*, *flavonoid* dan minyak esensial. Senyawa-senyawa ini berperan menghambat peradangan, pertumbuhan bakteri, virus, dan cendawan⁴⁸. Produk *echinacea sp* yang dihasilkan A.Vogel diakui pemerintah Swiss sebagai obat karena teruji secara klinis. Uji klinis dilakukan pada 77 pasien dengan influenza yang dirawat di beberapa rumah sakit di Austria. Masing-masing pasien diberi asupan ekstrak *echinacea sp* cair 3 kali sehari masing-masing 30 tetes. Dua pekan kemudian kondisi pasien diperiksa. Hasilnya angka indeks gejala 76 pasien menurun secara signifikan. Ini menandakan kondisi pasien semakin membaik. Seorang pasien memburuk kondisinya karena menghentikan terapinya. *Echinacea sp* yang diolah dalam bentuk tablet juga teruji secara klinis. Saat itu A. Vogel bersama dengan dr. R. Brinkeborn pada tahun 1999, dokter spesialis penyakit infeksi di rumah sakit Uppsala, Swedia. Dari 41 pasien flu yang diberi asupan ekstrak *Echinacea sp* berdosisi 2 tablet (setara dengan 6,78 mg ekstrak *Echinacea sp*) 3 kali sehari, 79 % pasien membaik setelah perlakuan 8 hari⁴⁹.

Echinacea sp selain sebagai imunostimulator juga sebagai antioksidan. Obat yang berperan sebagai antioksidan biasanya juga berkasiat sebagai hepatoprotektor. Sering dikombinasikan dengan tanaman obat lain seperti yang

diproduksi oleh salah satu produsen obat, dengan komposisi *Echinacea sp* 150 mg, *Sylibum marianum* (35 mg), *Curcuma xanthorium* (20 mg)⁴⁹.

Keamanan penggunaan *Echinacea sp* selama kehamilan belum dapat dijelaskan, hanya sedikit data relevan yang menunjang. Michael Gallo dkk. pada tahun 2000 melaporkan *prospective controlled study* untuk menilai keamanan fetus pada penggunaan *Echinacea sp* selama kehamilan. Penelitian melibatkan wanita yang mengikuti *Motherisk Program* di Toronto, yang menggunakan *Echinacea sp* dalam kurun waktu 1996-1998. Wanita yang menggunakan *Echinacea sp* selama kehamilan (206 orang, 112 orang, (54%) menggunakan pada trimester pertama dan 17 (8%) menggunakan selama 3 trimester), dipantau secara prospektif dan dibandingkan dengan kelompok kontrol (wanita hamil yang mengikuti *Motherisk Program* yang tidak menggunakan *Echinacea sp* atau menggunakan antibiotik nonteratogenik), 206 orang. Dilakukan perbandingan terhadap kejadian malformasi mayor, minor, keguguran dan komplikasi neonatal pada kedua kelompok⁵⁰.

Pada penelitian terhadap 206 wanita hamil yang mengonsumsi *Echinacea* selama masa hamil dan 112 diantaranya mengonsumsi pada trimester pertama menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan terhadap bayi-bayi yang dilahirkan dalam hal kelainan kongenital. Penelitian prospektif ini menyimpulkan bahwa *Echinacea sp* aman digunakan pada ibu hamil dan penggunaan *Echinacea sp* pada saat organogenesis tidak berhubungan dengan meningkatnya resiko malformasi mayor^{39,50}.

Efek stimulasinya berubah bila digunakan berkepanjangan, seharusnya jangan digunakan secara terus-menerus selama 8 minggu. Setelah penghentian obat, bisa di *restart* lagi untuk pengobatan 8 minggu berikutnya⁵¹.

2.4.5. Dosis

Preparat *Echinacea sp* terdiri dari bermacam-macam bentuk sehingga dosisnya juga bervariasi. Dosis untuk berbagai jenis sediaan tersebut adalah: ⁵²

Akar kering = 0.5 – 1.0 gram diberikan 3X sehari

Tincture (1:5) = ½ - 1 sendok teh diberikan 3X sehari

Ekstrak bubuk kering (standarisasi 3.5% echinacoside) = 300 mg diberikan 3X sehari

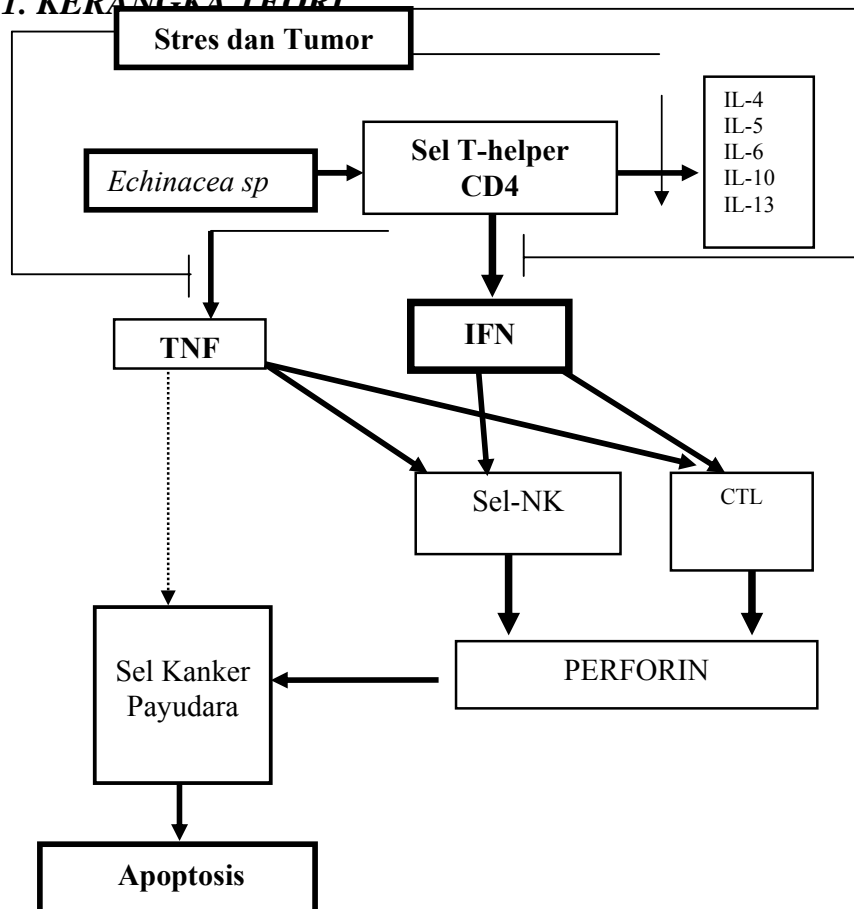
Ekstrak cair (1:1) = ¼ sampai ½ sendok teh diberikan 3X sehari

Freeze dried = 1 sampai 2 kapsul atau tablet diberikan 3X sehari

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3. 1. KERANGKA TEORI



|

Makrofag



Caspase 8
dan 10
diaktifkan

3. 2. KERANGKA KONSEP



3.3 HIPOTESIS

1. Terdapat perbedaan bermakna kadar IFN- γ mencit C3H dengan kanker payudara yang mendapat stres antara yang mendapat *Echinacea sp* dan yang tidak mendapat *Echinacea sp*
2. Terdapat perbedaan bermakna Indeks Apoptosis sel tumor mencit C3H dengan kanker payudara yang mendapat stres antara yang mendapat *Echinacea sp* dan yang tidak mendapat *Echinacea sp*

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. SAMPEL

Sampel penelitian ini adalah mencit betina strain C3H Strain ini dipilih karena selain sudah sering digunakan untuk penelitian kanker juga dapat diamati respon imunologiknya. Sedang penentuan jenis kelamin mencit yang dipakai pada penelitian ini dilakukan untuk memudahkan pemeliharaan karena jenis kelamin betina tidak begitu agresif dibandingkan jenis jantan sehingga dapat mengurangi resiko terjadinya cedera karena perkuliahan. Adanya cedera ini akan menimbulkan kerancuan dalam menilai respon imunitasnya. 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 setelah aklimatisasi.
- d. Tidak ada abnormalitas anatomis yang tampak

Kriteria Eksklusi:

- a. Tidak tumbuh tumor setelah dilakukan inokulasi
- b. Selama inokulasi dan perlakuan mencit tampak sakit (gerakan tidak

aktif)

Besar sampel menurut WHO tiap kelompok minimal 5 ekor, dengan cadangan 1 ekor ⁵², pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok 6 ekor mencit. Bila diperhitungkan kemungkinan *drop out* akibat mencit mati selama pemeliharaan dan besarnya diperkirakan adalah 10% maka besar sampel untuk setiap kelompok adalah:

$$n_{do} = \frac{n}{(1 - do)^2} = \frac{1}{(1 - 0,1)^2} = 6,2 \approx 6$$

Besar sampel untuk setiap kelompok adalah 6 mencit. Total sampel untuk 3 kelompok adalah 18 mencit ⁵³.

Sebelum digunakan dalam penelitian, 18 ekor mencit diadaptasikan terlebih dahulu selama 1 minggu. Selama dalam pemeliharaan mencit diberi makan dan minum secara ad libitum. Untuk menghindari bias terhadap berat badan maka dilakukan penimbangan mencit sebelum mendapat perlakuan.

4.2. TEMPAT PENELITIAN

Penelitian dilakukan di:

- Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Undip.
- Laboratorium Fisika Medik Fakultas Kedokteran Undip.

- Laboratorium Bioteknologi Fakultas Kedokteran Undip.

4.3. VARIABEL PENELITIAN

4.3.1. Variabel bebas:

1. Pemberian stressor berupa *electric foot shock*.
2. Pemberian ekstrak *Echinacea sp*

4.3.2. Variabel tergantung:

1. Kadar IFN- γ
2. Indeks apoptosis

4.4. Definisi Operasional:

1. *Electric foot shock* dilakukan dengan cara mengalirkan arus listrik pada lempeng tembaga di dasar kandang perlakuan tempat kaki mencit berpijak. Aliran listrik akan mengejutkan mencit.
2. Pemberian *Echinacea sp* (ekstrak bubuk kering dengan 3.5% echinacoside) dilakukan melalui sonde dengan dosis 0,195 mg/gramBB/hari atau 5,85 gram/hari untuk mencit dengan BB 30 gram yang dilarutkan dalam 2 ml aquadest steril.
3. Kadar IFN- γ adalah IFN- γ yang diukur dari supernatan kultur makrofag peritoneum dengan menggunakan metode ELISA.

4. Indeks apoptosis sel tumor payudara dihitung sesuai dengan metoda yang digunakan oleh Aihara M et al.

4.5. BAHAN DAN ALAT

- **Mencit betina *strain* C3H dengan umur 6 bulan, dan berat 20 - 30 gram. Mencit diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Selama penelitian, setiap mencit ditempatkan pada kandang sesuai dengan kelompoknya. Satu kandang diisi 3 – 4 mencit. Pencahayaan, suhu serta kelembaban yang sama. Pakan yang diberikan pelet standar pakan mencit. Pakan dan minum diberikan secara *ad libitum*. Aklimatisasi untuk adaptasi sebelum perlakuan adalah selama 1 minggu. Kandang dibersihkan setiap hari dan frekuensi dan tingkat kebersihan adalah sama. Mencit diaklimatisasi selama kurang lebih 3 sampai 4 hari sebelum digunakan untuk penelitian. Mencit akan akan mendapat pakan standar dan minum *ad libitum*.**
- Adenokarsinoma diperoleh dari mencit donor. Tumor yang mengandung sel adenokarsinoma dari mencit donor akan ditransplantasikan ke mencit resipien. Sebelum ditransplantasikan, tumor dari mencit donor akan diincisi biopsi dan dilakukan pemeriksaan histologi untuk mengkonfirmasi jenis tumornya
- ***Echinacea sp* yang digunakan diperoleh dari industri farmasi (PT. S; Semarang) diperoleh dalam bentuk ekstrak.**
- Bahan-bahan untuk pemeriksaan imunologi:

- *Peritoneal Exudate Cells* (PEC) dari mencit betina strain C3H (hewan percobaan).
- Ekstrak *Echinacea sp* yang diperoleh langsung dari perusahaan farmasi yang memproduksi echinacea.
- RPMI 1640
- *Foetal Bovine Serum* (FBS)
- *Phosphate Buffer Saline* (PBS)
- Metanol, Larutan Giemsa, Tripian Blue
- Aquadest steril

- Bahan transplantasi jaringan tumor pada mencit
 - Alkohol 70 %
 - Larutan Garam fisiologik
 - Es batu
 - Mencit donor bertumor
 - Mencit resipien

- Bahan untuk pemeriksaan histopatologi rutin
 - Formalin buffer 10%
 - Alkohol 50%, 70%, 80%, 96%, absolute
 - Xylol
 - Parafin cair (Histoplast)
 - Albumin dan Pole-L-Lysine
 - Bahan pengecatan Hematoksilin-Eosin (HE)

- Canada balsam dan Entelan

4.6. INSTRUMEN PENELITIAN

- Mikroskop
- Spuit 1cc, 10 cc
- Tabung Sentrifus 15 cc, 50 cc
- Lampu Bunsen
- Cawan Petri
- Gunting bengkok dan lurus
- Kanul mulut
- Pipet Pasteur & Pipet Eppendorf
- ELISA reader
- Timbangan elektronik dan biasa
- Kandang hewan coba
- Alat sentrifugasi yang dilengkapi pengatur suhu
- Inkubator buatan Schwabach
- Termometer
- *Laminar Flow*
- Tabung reaksi biasa
- Kaca benda
- Trokar
- Pinset, scalpel
- *Yellow & Blue tape*
- Autoclav
- IFN- γ mouse ELISA KIT

4.7. RANCANGAN PENELITIAN

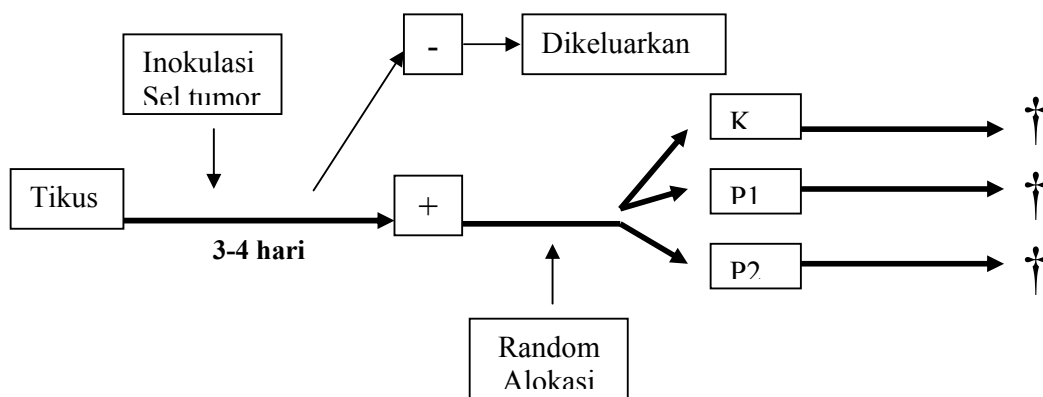
Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan rancangan *The Post Test – Only Control Group Design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian⁵⁴. Percobaan dilakukan dengan rancangan acak lengkap (*Completely Randomized Design*), randomisasi dilakukan menggunakan *computer generated random number*. Kelompok penelitian dibagi

menjadi 3 yaitu kelompok kontrol (K), Perlakuan 1 (P1), Perlakuan 2 (P2).

Adapun pembagian kelompok perlakuan adalah sebagai berikut:

- K : Kelompok kontrol, mencit yang diinokulasi sel tumor
- P1 : Kelompok perlakuan 1, mencit yang diinokulasi sel tumor, setelah timbul benjolan, mendapat stressor renjatan listrik.
- P2 : Kelompok perlakuan 2, mencit yang diinokulasi sel tumor, setelah timbul benjolan, selain mendapat stressor renjatan listrik juga mendapat ekstrak *Echinacea sp*

Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut:



4.8. PROSEDUR PENGUMPULAN DATA

- ◆ 18 ekor mencit betina strain C3H dengan umur 6 bulan, dan berat 20 - 30 gram diaklimatisasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi pakan standar selama satu minggu secara ad libitum.
- ◆ Dilakukan inokulasi sel-sel kanker pada masing-masing mencit kemudian ditunggu selama 3-4 hari.

- ◆ 18 ekor mencit yang telah terpapar kanker tersebut kemudian dibagi menjadi 3 kelompok masing-masing 6 ekor yang ditentukan secara acak dengan komputer, masing-masing kelompok dikandangkan secara individual.
- ◆ Masing masing kelompok mendapatkan pakan standar yang sama.
- ◆ Kelompok pertama hanya mendapatkan makanan standar, pada hari ke-8 disuntikkan *Foetal Bovine Serum (FBS)* 0,3cc secara i.p. 3 hari kemudian (hari ke-11) mencit dibunuh untuk diperiksa kadar IFN- γ , dan Indeks Apoptosis.
- ◆ Kelompok kedua selain mendapatkan makanan standar juga mendapatkan stressor renjatan listrik menggunakan *electric foot shock*, pada hari ke-8 disuntikkan *Foetal Bovine Serum (FBS)* 0,3cc secara i.p. 3 hari kemudian (hari ke-11) mencit dibunuh untuk diperiksa kadar IFN- γ , dan Indeks Apoptosis.
- ◆ Kelompok ketiga selain mendapatkan stressor renjatan listrik menggunakan *electric foot shock* juga mendapatkan ekstrak *Echinacea sp*, pada hari ke-8 disuntikkan *Foetal Bovine Serum (FBS)* 0,3cc secara i.p. 3 hari kemudian (hari ke-11) mencit dibunuh untuk diperiksa kadar IFN- γ , dan Indeks Apoptosis.

4.9. PROSEDUR-PROSEDUR LABORATORIUM

4.9.1. PROSEDUR TRANSPLANTASI TUMOR

1. Mencit donor dimatikan dengan eter, kemudian diletakkan terlentang pada tatakan / alas fiksasi dan keempat kakinya difiksasi dengan jarum.

2. Kulit dibagian yang bertumor diusap dengan alkohol 70 %, kemudian dibuat sayatan dengan gunting lurus, untuk mengeluarkan tumor.
3. Tumor diletakkan di cawan petri kecil yang telah terlebih dahulu dicuci dengan garam fisiologis dan diletakkan diatas es.
4. 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.
5. Bubur tumor disuntikkan subkutan di aksila kanan mencit dengan dosis 0,2 ml.
6. Sisa tumor yang padat dimasukkan ke dalam botol formalin untuk dibuat sediaan mikroskopik.
7. Masing-masing mencit diberi nomor ditelinganya (lihat bagan) dan dimasukkan ke dalam kandang berbeda yang diberi label berisi : jenis kelompok perlakuan, tanggal transplantasi

4.9.2. PROSEDUR PEMBERIAN STRESSOR RENJATAN LISTRIK

Besar arus listrik 220 VAC antara 1 – 3mA. Jumlah renjatan adalah sebagai berikut:

Hari ke-	Renjatan	sesi
1	4	2
2	8	2
3	10	3
4	12	3
5	14	4
6	16	4
7	18	5
8	20	5
9	22	6
10	24	6

Lama 1 kali renjatan = 1 kejut, diberikan interval 4 menit untuk tiap sesi.

Hari pertama diberikan 4 renjatan-2 sesi, hari kedua diberikan 8 renjatan-2 sesi bukannya 6 renjatan-2 sesi, karena peningkatan sebanyak 2 renjatan x 2 sesi untuk hari kedua dianggap terlalu kecil.

Pemilihan stressor berupa renjatan listrik pada alas kaki dengan *electric foot shock* karena intensitas dapat terukur dengan tepat, penjalaran arus listrik dari kaki ke seluruh tubuh termasuk ke otak berjalan cepat dan pemulihan setelah renjatan tidak ada efek ikutan. Banyak penelitian telah dilakukan dengan renjatan listrik sebagai stressor untuk menimbulkan stres dan memberi dampak pada target spesifik, telah terbukti dan menunjukkan akurasi yang tepat. Sedangkan pemilihan lama waktu 10 hari adalah berdasarkan penelitian terdahulu bahwa kadar kortisol mulai meningkat

pada hari ke-4, mencapai puncak pada hari ke-7 dan mulai menurun pada hari ke-14. Sehingga dapat diharapkan pengambilan unit sampel pada hari ke-11 sudah terjadi modulasi sistem imun⁵⁵.

4.9.3 PROSEDUR PENGAMBILAN SAMPEL DARI HEWAN PERCOBAAN

1. Mencit dimatikan dengan dislokasi leher setelah dinarkose menggunakan chloroform. Mencit diletakkan dalam posisi terlentang, kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritoneumnya dengan alkohol 70%.
2. Suntikkan 10 ml medium RPMI yang mengandung 2% FBS ke dalam rongga peritoneum, tunggu 2 menit sambil ditekan-tekan secara perlahan.
3. Cairan peritoneal diaspirasi dari rongga peritoneum dengan cara menekan organ dalam dengan 2 jari, cairan diaspirasi dengan spuit injeksi, dipilih bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus. Aspirat yang didapat ditampung dalam tabung sentrifus.
 - a. Aspirat yang didapat kemudian disentrifus pada 400g, 4°C selama 10'.
 - b. Supernatan dibuang, cuci 2X dengan RPMI yang mengandung 2% FBS.
 - c. Kemudian ditambahkan 2 ml medium RPMI komplet (RPMI 1640 yang mengandung *L-glutamin* (1mM), *Foetal Bovine Serum* (FBS)5% dan disentrifusasi pada 400g, 4°C selama 10'.

- d. Buang supernatan dan bila perlu larutkan dengan 3% asam asetat dalam PBS untuk melisiskan sel darah merah kemudian disentrifus pada 400g, 4°C selama 10'.
- e. Cuci dengan RPMI yang mengandung 2% FBS.
- f. Resuspensikan dengan medium komplit.
- g. Jumlah sel yang didapat dihitung menggunakan bilik hitung Neubauer setelah diwarnai dengan Tripian Blue sehingga didapatkan suspensi sel dengan kepadatan 10^6 / ml.
- h. Sel yang didapatkan ini digunakan untuk pemeriksaan IFN- γ

4.9.4. PROSEDUR PEMERIKSAAN IFN- γ

- a. Disiapkan microplate 96 sumuran yang telah dilapisi antibodi monoklonal terhadap IFN- γ mencit
- b. Microplate dicuci dengan memasukkan buffer pencuci sebanyak 300 μ l setiap sumuran. Caranya dengan melakukan aspirasi berulang menggunakan pipet tanpa menggores permukaannya. Lakukan pengeringan dengan membalikkan mikroplate diatas kertas tissue selama \pm 15 menit.
- c. Larutan standar dibuat dengan memasukkan 100 μ l larutan sampel dalam sumuran. Tambahkan 100 μ l larutan standar IFN- γ dalam sumuran. Lakukan pengenceran bertahap sebanyak 5 kali dengan memasukkan 100 μ l campuran larutan yang diambil dari sumuran

pertama ke sumuran kedua dan seterusnya. Pada sumuran yang terakhir larutan dibuang. Semua dilakukan secara duplo.

- d. Larutan blangko dibuat dengan hanya memasukkan 100µl larutan sampel secara duplo.
- e. Kultur yang akan diperiksa disiapkan dengan memasukkan 50µl larutan sampel dalam semua sumuran yang telah diisi 50µl kultur.
- f. 50 µl larutan *biotin konjugat* ditambahkan ke semua sumuran termasuk sumuran blangko.
- g. Tutup dengan *plate cover* dan diinkubasikan dalam suhu ruangan (18⁰C – 25⁰C) selama 2 jam diatas *microplate shaker* dengan kecepatan 200 rpm.
- h. Buka *plate cover* , kosongkan sumuran dan dicuci 3X.
- i. 50 µl larutan *Streptavidin-HRP* ditambahkan ke semua sumuran termasuk sumuran blangko.
- j. Tutup dengan *plate cover* dan diinkubasikan dalam suhu ruangan (18⁰C – 25⁰C) selama 1 jam diatas *microplate shaker* dengan kecepatan 200 rpm.
- k. Buka *plate cover* , kosongkan sumuran dan dicuci 3X.
- l. 100 µl campuran larutan *substrat TMB* ditambahkan ke semua sumuran termasuk sumuran blangko.
- m. Tutup dengan *plate cover* dan diinkubasikan dalam suhu ruangan (18⁰C – 25⁰C) selama 10 menit diatas *microplate shaker* dengan

kecepatan 200 rpm. Hindari sinar matahari langsung. Amati terjadinya perubahan warna.

- n. Stop reaksi enzim dengan menambahkan 100µl *stop solution* dalam tiap sumuran. Baca absorbansinya pada gelombang 450 nm menggunakan *Elisa Microplate Reader ELX 800*

4.9.5. PROSEDUR PEMBUATAN PREPARAT HISTOLOGI

- 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 aquadest selama 1 jam untuk proses penghilangan larutan fiksasi.

- a. 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 2x2 jam.

- b. Impregnasi

Jaringan dimasukkan dalam paraffin cair selama 2x2 jam.

- c. Embedding

Jaringan ditanam dalam paraffin padat yang mempunyai titik lebur 56-58°C, ditunggu sampai paraffin padat. Jaringan dalam paraffin

dipotong setebal 4 mikron dengan mikrotom. Potongan jaringan ditempelkan pada kaca obyek yang sebelumnya telah diolesi polilisin sebagai perekat. Jaringan pada kaca obyek dipanaskan dalam inkubator suhunya 56-58°C sampai paraffin mencair.

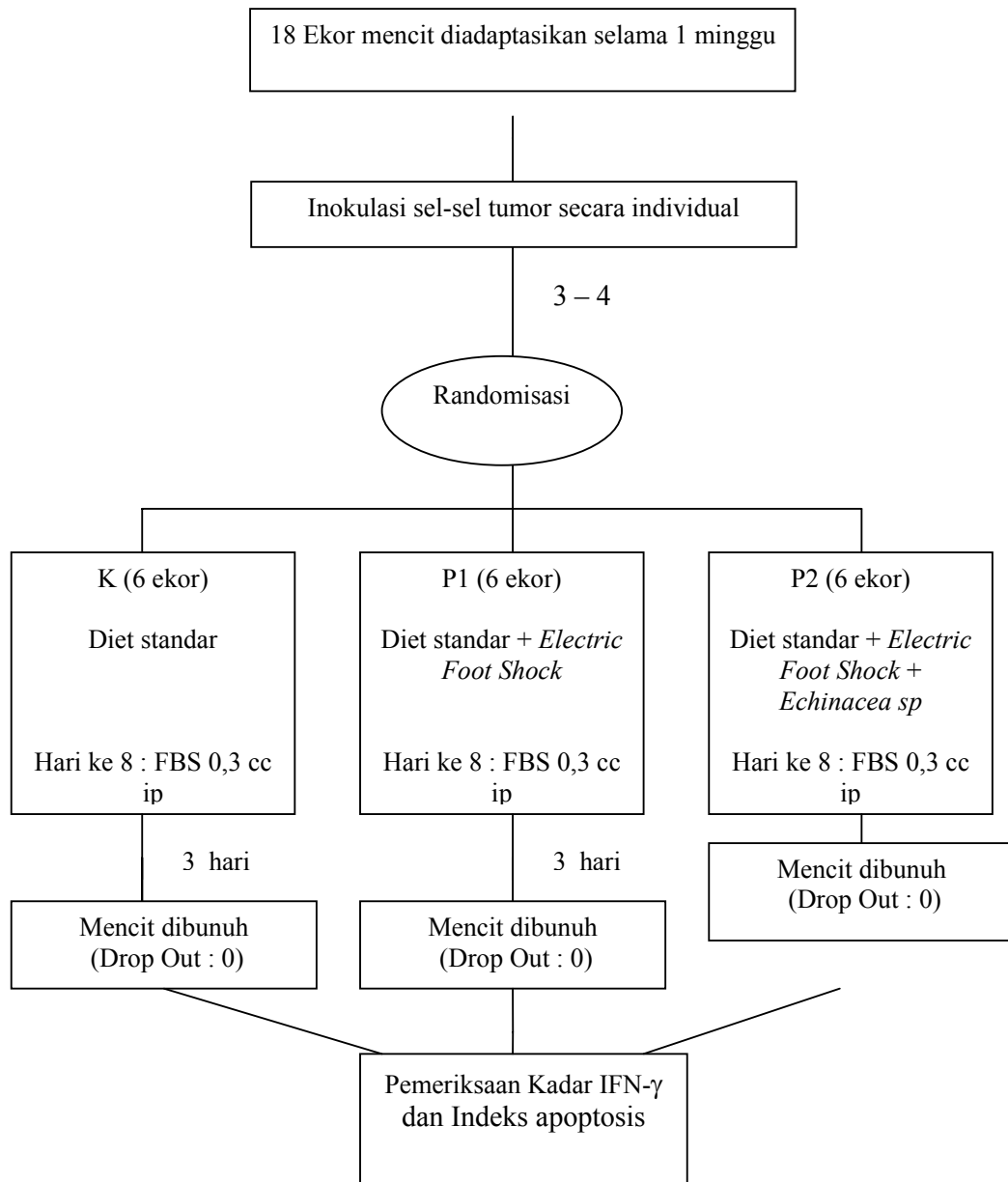
d. Pewarnaan jaringan dengan H&E

1. Xylol	1 menit	11. Air	15
	detik		
2. Xylol	2 menit	12. Alkohol 80%	15
	detik		
3. Xylol	2 menit	13. Alkohol 96%	30
	detik		
4. Alkohol 100%	2 menit	14. Alkohol 100%	45
	detik		
5. Alkohol 96%	2 menit	15. Xylol	1 menit
6. Alkohol 80%	2 menit	16. Xylol	1 menit
7. Air	1 menit		
8. Mayer HE	7,5 menit		
9. Air	7,5 menit		
10. Eosin (0,5%)-Alkohol-Asam asetat	1 menit		

Pembacaan indeks apoptosis preparat histologi dilakukan oleh peneliti dan dokter spesialis patologi anatomi, dengan *clinical agreement* 95% . Pembacaan per kaca obyek dimulai dari kiri atas dilanjutkan ke bawah, ke kanan, atas, dst. Metode pembacaan berdasarkan metode Aihara et al dimana

badan apoptotik dihitung per 100 sel tumor dari area yang signifikan dengan pembesaran 400x, pada 10 lapangan pandang dari tiap preparat, dalam satu blok parafin. Kemudian diambil nilai rata-ratanya dalam skala variabel : rasio.

4.10. ALUR KERJA



4.11.ANALISIS DATA

Setelah data terkumpul, data hasil penelitian diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan boxplot. Untuk mengetahui normalitas data

dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk test*. Karena data berdistribusi normal maka dilakukan uji *One Way Anova* untuk melihat adanya perbedaan pada ketiga kelompok perlakuan. Besarnya perbedaan masing-masing kelompok perlakuan dianalisis lebih lanjut dengan *Post Hoc Test Bonferoni*. Semua analisis statistik tersebut dilakukan dengan menggunakan program komputer SPSS 10.05 for windows. Nilai signifikansi pada penelitian ini adalah apabila variabel yang dianalisis memiliki nilai $p < 0,05$.

4.12. PERSYARATAN ETIK

Implikasi etik pada hewan, pengelolaan binatang coba pada penelitian ini mengikuti *animal ethics*. Hal yang perlu dilaksanakan sesuai dengan etik antara lain perawatan dalam kandang, pemberian makan minum (*ad libitum*), aliran udara dalam ruang kandang, perlakuan saat penelitian, menghilangkan rasa sakit, pengambilan unit analisis penelitian, dan pemusnahannya. Dan sebelum penelitian dilaksanakan, proposal akan dimintakan persetujuan Komis Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran UNDIP. Seluruh hewan coba akan dirawat sesuai standar pemeliharaan binatang.

BAB 5

HASIL

5.1. Kadar IFN- γ

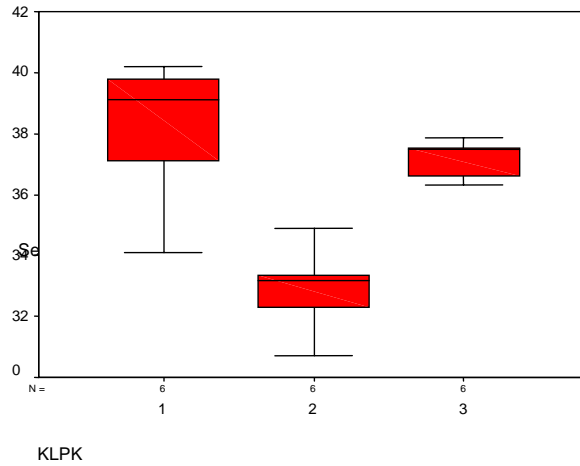
Kadar IFN- γ diukur dengan membaca absorbansinya pada gelombang 450 nm menggunakan *Elisa Microplate Reader* ELX 800. Hasil pengukuran kadar IFN- γ dapat dilihat pada tabel-2.

Tabel-2. Nilai rata-rata hasil pengukuran produksi IFN- γ

Produksi IFN- γ	Kontrol	Perlakuan 1	Perlakuan 2
Rerata (SD); median	38,249; (2,32); 39,133	32,931; (1,38); 33,183	37,217; (0,60); 37,471

Uji Bonferoni pada variabel kadar IFN- γ menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,001$) antara kelompok kontrol (K) ($38,249 \pm 2,32$) dan perlakuan 1 (P1) ($32,931 \pm 1,38$), dan terdapat perbedaan yang bermakna juga ($p = 0,001$) antara kelompok perlakuan 1 (P1) ($32,931 \pm 1,38$) dan perlakuan 2 (P2) ($37,217 \pm 0,61$). Sedangkan antara kelompok kontrol (K) dengan kelompok perlakuan 2 (P2) tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p = 0,843$).

Boxplot kadar IFN- γ dapat dilihat pada gambar 9 berikut :



Keterangan : 1 = Kontrol, 2 = P1, 3 = P2

Gambar-9 *Boxplot* kadar IFN- γ

5.2. Indeks Apoptosis

Indeks apoptosis dihitung dengan metode Aihara et al. Hasil pengukuran nilai

rata-rata indeks apoptosis dapat dilihat pada tabel-3.

Tabel-3. Nilai rata-rata hasil penghitungan indeks apoptosis pada tiap kelompok percobaan

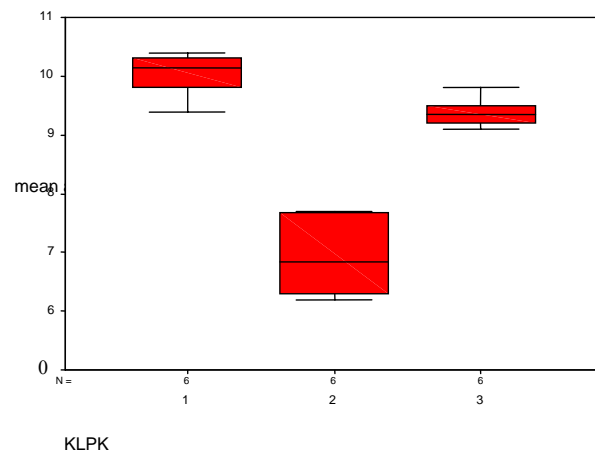
Indeks apoptosis	Kontrol	Perlakuan 1	Perlakuan 2
Rerata (SD); median	10,033; (0,37); 10,150	6,923; (0,65); 6,83	9,38; (0,25); 9,35

Uji Bonferoni pada variabel indeks apoptosis menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,001$) antara kelompok kontrol (K) ($10,033 \pm 0,37$) dan perlakuan 1 (P1) ($6,92 \pm 0,65$), dan terjadi perbedaan bermakna ($p < 0,001$) juga antara kelompok

perlakuan 1 (P1) ($6,92 \pm 0,65$) dan perlakuan 2 (P2) ($9,38 \pm 0,25$).

Sedangkan antara kelompok kontrol (K) dengan kelompok perlakuan 2 (P2) tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,08$).

Boxplot Indeks apoptosis dapat dilihat pada gambar 10 berikut :



Keterangan : 1 = Kontrol, 2 = P1, 3 = P2

Gambar-10. *Boxplot* Indeks apoptosis

5.3. Uji Statistik

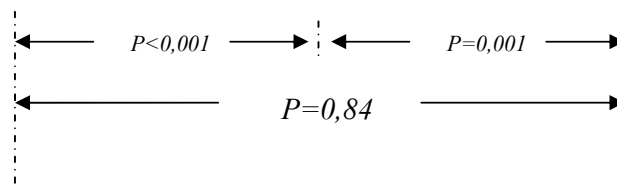
Penelitian ini dilakukan pada 18 sampel, dilakukan analisa statistik dengan uji *One way ANOVA* . Pada eksplorasi data, uji normalitas data masing-masing kelompok dilakukan dengan menggunakan uji *Shapiro Wilk*

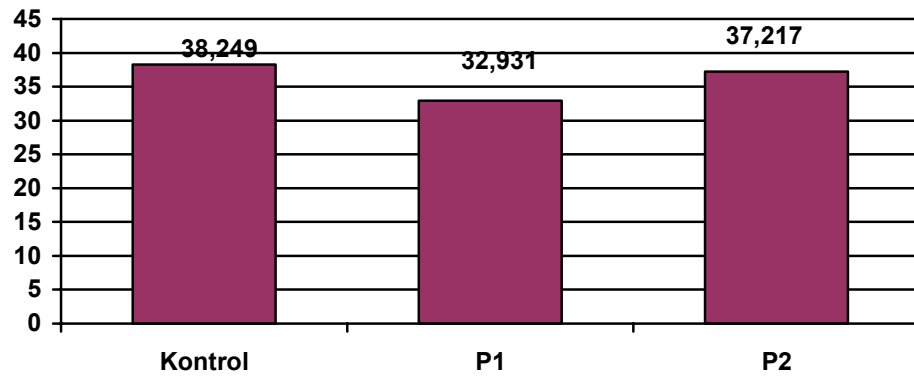
Dari uji normalitas *Shapiro Wilk* terlihat bahwa distribusi data tiap kelompok perlakuan adalah normal. Sedangkan uji homogenitas data tiap kelompok perlakuan dilakukan dengan *Levene's test* dan didapatkan bahwa data tiap kelompok perlakuan adalah homogen.

Analisis uji beda, dilakukan terhadap variabel kadar IFN- γ dan indeks apoptosis. Oleh karena skala variabel independen maupun dependennya numerik dan distribusi datanya normal, maka analisis statistik untuk uji beda semua kelompoknya menggunakan *One way ANOVA*. Uji beda untuk masing-masing kelompok menggunakan *Bonferoni test*.

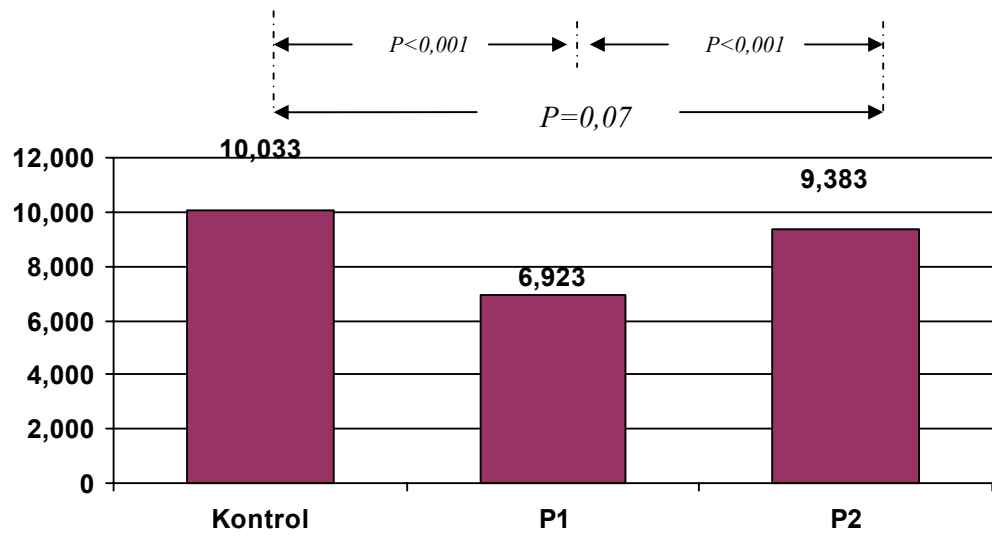
Dari tabel uji homogenitas diketahui bahwa data pada variabel kadar IFN- γ ($p=0,091$) dan indeks apoptosis ($p=0,085$) adalah homogen. Sehingga *post hoc test* untuk variabel-variabel tersebut adalah dengan menggunakan uji Bonferoni.

Hasil uji *ANOVA* didapatkan bahwa keseluruhan kelompok dari variabel kadar IFN- γ mempunyai perbedaan yang bermakna ($p<0,001$). Variabel indeks apoptosis pada uji tersebut juga menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna secara statistik ($p<0,001$).





Gambar-11. Hasil *Post Hoc test* kadar IFN- γ dengan uji *Bonferroni*



Gambar-12. Hasil *Post Hoc test* indeks apoptosis dengan uji *Bonferroni* .

BAB 6

PEMBAHASAN

Dari 18 ekor tikus dalam penelitian, ternyata tidak ada satu pun dari ketiga kelompok perlakuan yang mengalami drop out. Pada kelompok mencit dengan kanker payudara yang mengalami stress (P1), terdapat penurunan kadar IFN- γ . Penurunan kadar IFN- γ pada kelompok P1 ini disebabkan karena stres yang diberikan pada kelompok ini. Adanya stres ini akan berpengaruh terhadap imunitas tubuh melalui stimulasi sekresi *kortisol* dan *adrenalin* dari *korteks* dan *medula adrenal*. Juga berpengaruh terhadap pelepasan *noradrenalin* dari postganglion simpatik terminal saraf di pembuluh darah dan organ limfoid. Efek sistemik dari *glukokortikoid* dan *katekolamin* ini mempengaruhi pengaturan sitokin yang diproduksi monosit. Stres akan menurunkan produksi sitokin yang dibutuhkan dalam respon imunitas seluler⁹. Pada saat disekresikan kortisol dan adrenalin akan terjadi hambatan ekspresi IL-2, IFN- γ , dan IL-12, di mana IL-12 dan IFN- γ sangat penting untuk stimulasi sel-sel efektor sistem imun seluler seperti Makrofag, *Cytotoxic T-cell Lymphocyt (CTL)*, dan sel *Natural Killer (NK)*. Pada saat mendapatkan stres, makrofag mengalami anergi, sehingga kemampuan fagositosisnya menurun.

Pada kelompok perlakuan 2 (P2) di mana pada kelompok ini mendapatkan imunostimulator, terlihat bahwa kadar IFN- γ juga menurun tetapi tidak signifikan dibandingkan kelompok kontrol. Dibandingkan dengan kelompok P1 yang mendapatkan stres tetapi tidak mendapat imunostimulator, maka pada kelompok P2 yang mendapat imunostimulator, penurunan kadar IFN- γ berbeda bermakna. Penurunan kadar IFN- γ pada kelompok P2 dibandingkan dengan kelompok kontrol adalah tidak bermakna, hal ini membuktikan bahwa pemberian imunostimulator pada mencit kanker payudara dengan stres akan

memperbaiki kemampuan makrofag untuk menghasilkan IFN- γ . Hal ini terjadi karena imunostimulator *Echinacea sp* yang diberikan akan mengaktifasi makrofag sehingga makrofag yang ada, baik sebagai APC maupun sebagai efektor akan aktif dan menghasilkan sitokin-sitokin yang penting untuk aktifitas imunitas seluler terutama IFN- γ ⁴⁰⁻⁴⁵.

Pada kelompok perlakuan 1 (P1), dimana diberikan stres (renjatan listrik) pada mencit C3H dengan kanker payudara, didapat bahwa indeks apoptosis menurun secara bermakna bila dibandingkan dengan kontrol. Penurunan indeks apoptosis pada kelompok P1 disebabkan karena stres yang diberikan pada kelompok ini. Pada kelompok perlakuan 2 (P2) di mana pada kelompok ini selain diberi stres juga mendapatkan imunostimulator (*Echinacea sp*), terlihat juga penurunan indeks apoptosis namun tidak bermakna bila dibandingkan kelompok kontrol. Dibandingkan dengan kelompok P1 yang mendapatkan stres tetapi tidak mendapat imunostimulator, maka pada kelompok P2 yang mendapat imunostimulator, penurunan indeks apoptosis tersebut berbeda bermakna. Penurunan indeks apoptosis pada kelompok P2 dibandingkan dengan kelompok kontrol adalah tidak bermakna, hal ini membuktikan bahwa pemberian imunostimulator berupa *Echinacea sp* pada mencit kanker payudara dengan stres akan memperbaiki indeks apoptosis.

BAB 7

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

1. Terdapat perbedaan bermakna kadar IFN- γ mencit C3H dengan kanker payudara yang mendapat stres antara yang mendapat *Echinacea sp* dan yang tidak mendapat *Echinacea sp*
2. Terdapat perbedaan bermakna Indeks Apoptosis sel tumor mencit C3H dengan kanker payudara yang mendapat stres antara yang mendapat *Echinacea sp* dan yang tidak mendapat *Echinacea sp*

Saran

***Echinacea sp* mempunyai efek terhadap peningkatan kadar IFN- γ dan indeks apoptosis pada mencit C3H dengan adenokarsinoma dan stres, maka perlu dipikirkan pengembangan untuk kelanjutan uji klinik terhadap manusia.**

DAFTAR PUSTAKA

1. Deteksi dini kanker payudara. Republika online; 2 April 2006. Available from : URL http://www.republika.co.id/cetak_berita.asp

2. Smigal C, Siegel R. Breast cancer facts and figure 2005-2006. American cancer society; 2005:1-3
3. Kardinah. Kanker Payudara : Bagaimana Hindari Berbagai Ancaman. DEPKES-RI ; April 2007. Available from : URL <http://www.depkes.go.id/kanker.htm>
4. M. Farid Aziz. Masalah pada Kanker Serviks. Cermin Dunia Kedokteran. 2001;133:15-8. Available from : URL http://www.kalbefarma.com/files/cdk/files/cdk_133_obstetri_dan_ginekologi.pdf
5. Sugito H. Kanker di Indonesia Tahun 1994 Data Histopatologik. Badan Registrasi Kanker Ikatan Ahli Patologi Indonesia. Dirjen YanMed Dep. Kes RI ; 1994 : 3-6.
6. Profil Kesehatan Provinsi Jawa Tengah Tahun 2005. Pencapaian Program Kesehatan Menuju Jawa Tengah Sehat. Dinas kesehatan Pemerintah provinsi jawa tengah ; 2005. Available from : URL <http://www.dinkesjateng.org/profil2005/bab4.htm>
7. Shirley IM (MD). Epidemiologi kanker payudara dan pengendaliannya. Medika 2000;5:326-9
8. **Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT). Jakarta (INA): Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan RI dan Biro Pusat Statistik; 1992. p. 44.**
9. Elemkov IJ and Chrousos GP. Stress hormones, Th1/th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and susceptibility to disease. TEM. 1999;10(9):359-68.
10. Soini Y, Paakko P, Lehto V. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. Am J Pathol 1998, 153:1041-53. Available from : URL: <http://www.ajp.amjpathol.org/cgi/content/full/153/4/1041>
11. Burger R, Torres A, Warren R, Caldwell V, Hughes B. Echinacea-induced cytokine production by human macrophages. Int J Immunopharmacol. 1997; 19(7): 371-9.
12. Mishima S, Saito K, Maruyama H, Inoue M, Yamashita T, Ishida T, Gu Y. Antioxidant and immuno-enhancing effects of Echinacea purpurea. Biol Pharm Bull. 2004;27(7):1004-9.
13. See D, Broumand N, Sahl L, Tilles J. In vitro effects of echinacea and ginseng on natural killer and anti-body-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or acquired immunodeficiency syndrome patients. Immunopharmacology. Jan 1997; 35(3): 229-35.
14. Bratman S, Kroll D. Everything You Need to Know About Echinacea and Immunity. Natural Health Bible. Prima Publishing. 1999: 179-81.
15. Currier NL, Miller SC. Natural Killer cells from aging mice treated with extracts from echinacea purpurea are quantitatively and functionally rejuvenated. Exp Gerontol. 2000 Aug;35(5): 627-39.

16. Goel V, Chang C, Slama J, Barton R, Bauer R, Gahler R, Basu T. Echinacea stimulates macrophage function in lung and spleen of normal rats. *J Nutr Biochem.* 2002;13(8):487
17. 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
18. Dickson R B., Lippman M E. Cancer Of The Breast. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, Vincent T. DeVita, Jr. M.D., Samuel Hellman, M.D., Steven A. Rosenberg, M.D. Ph.D. Eds; 5th Ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1997, 36 : 1541-1616
19. Protokol Penatalaksanaan Kanker Payudara, Kumpulan Naskah Ilmiah. Perhimpunan Ahli Bedah Onkologi Indonesia (PERABOI). Mukhtar Nasional VI : 2003, hal 1-13.
20. Sobin LH, Wittekind CH ed. *Classification of Malignant Tumours TNM.* International Union Against Cancer UICC ; 6th ed. A John Wiley & Sons Inc.2002 : 131-41.

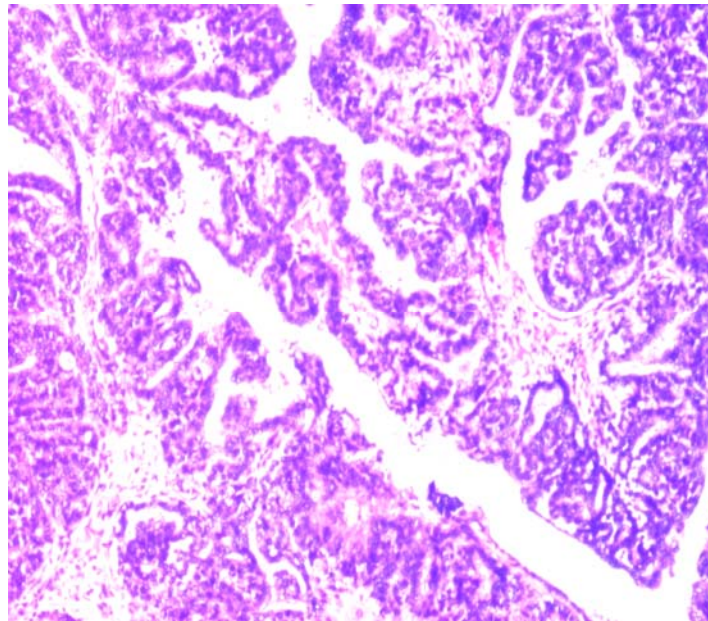
21.AJCC Cancer Staging Handbook 6th Ed. Chicago : Springer, 2002

21. Wunderlich J R., Restifo N P.. *Essentials Of Immunology . Cancer: Principles & Practice of Oncology*, Fifth Edition Vincent T. DeVita, Jr. M.D., Samuel Hellman, M.D., Steven A. Rosenberg, M.D. Ph.D. Philadelphia 1997, 3 : 47-75
22. Conran RS, Kumar V, Robbins SL. *Robin Pathologic basis of Disease.* 5th ed. Philadelphia : WB Saunders, 1994
23. Stites DP, Terr Abba I, Parslow TP, .*Medical Immunology*, 9th ed, Stamford Connecticut, USA: Appleton & Lange, 1997
24. **Abbas A, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. 5th ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders; 2005. p. 4-15,22-3,65-80,81-103,182-7,247-53,258-9,266,268-9,279-80,290-5.**
25. Roitt IM, 1988. *Essentials Immunology*, 6th ed. Blackwell sci. publ. London.
26. Goodman JW. *The Immune Response, in Basic and Clinical Immunologi.* 8th ed. Stites DP, Terr A I eds.,Prentice-Hall Int.Inc.,USA.
27. 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 – 77.
28. Constatinides P. *General Pathobiologi.* Connecticut: Appleton & Lange,1994 : 173 – 90.
29. Sarjadi. *Karsinoma epidermoid serviks uteri (Beberapa aspek epidemiologi serta peran histopatologi dan petanda tumor dalam penentuan prognosis).* Disertasi doktor Universitas Diponegoro. Semarang, 1985

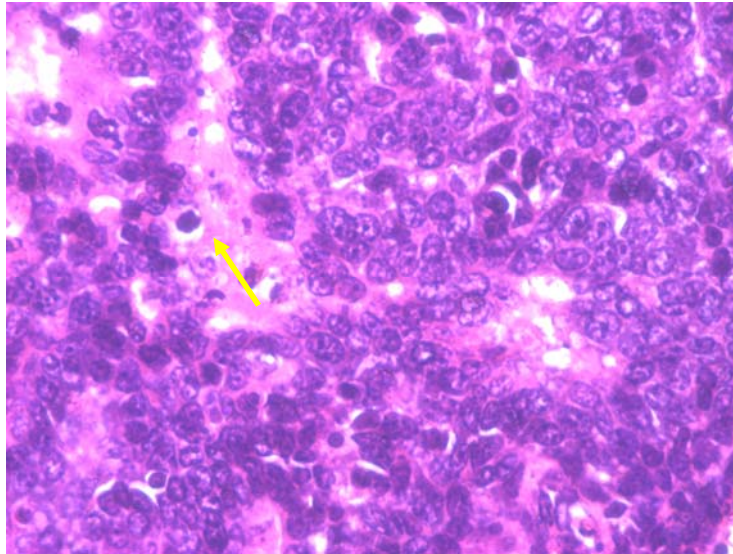
30. Giles JT, Palat CT, Chien Susan H, Chang ZG, Kennedy DT. Evaluation of Echinacea for Treatment of the Common Cold. *Pharmacotherapy*, 2000; 20(6):690-7
31. Sara G-Fiebert, Kathi J. Kamper, Echinacea (*E. angustifolia*, *E. pallida*, and *E. purpurea*), <http://www.mcp.edu/herbal/default.htm>. Diakses tanggal 28 Mei 2007
32. Evidence-based complementary and alternative medicine, <http://ecam.oxfordjournal.org/cgi/content/full>. Diakses tanggal 24 Mei 2007
33. Murray MT. Echinacea: pharmacology and clinical applications. *Am J Nat Med* 1995;2:18-24.
34. Bauer R, Jurcic K, Puhlmann J, Wagner H. Immunological in vivo and in vitro examinations of echinacea extracts. *Arzneimittelforschung* 1988;38(2):276-81.
35. Schumacher A, Friedberg KD. Analysis of the effect of Echinacea angustifolia on unspecified immunity of the mouse. *Arzneimittelforschung* 1991;41:141-7.
36. Blumenthal M, Riggins C. Popular herbs in the U.S. market: therapeutic monographs. Austin, TX: American Botanical Council 1997:1-68.
37. Bartram T. *Encyclopedia of Herbal Medicine*. Grace Publishers, Dorset, England. 1995; 161-2.
38. Pemberian Terapi Imunomodulator Herbal. HTA Indonesia,2004. Available from :URL : <http://www.yanmedikdepkes.net/hta/Hasil%2520Kajian%2520HTA/2004/>
39. Echinacea species as potential immunostimulatory drugs. *Econ Med Plant Res*. 1991; 5: 253-321.
40. Wagner V. Immunostimulating polysaccharides (heteroglycans) of higher plants. *Arzneimittelforschung*. 1985; 35: 1069-75
41. Stimpel M. Macrophage activation and induction of macrophage cytotoxicity by purified polysaccharide fractions from the plant Echinacea purpurea. *Infect Immun*. 1984; 46:845-49
42. Luettig B. Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of Echinacea purpurea. *J Natl Cancer Inst*. 1989; 81: 669-75
43. Mose J. Effect of echinacina on phagocytosis and natural killer cells. *Med Welt*. 1983; 34: 1463-7
44. Vomel V. Influence of a non-specific immune stimulant on phagocytosis of erythrocytes and ink by the reticuloendothelial system of isolated perfused rat livers of different ages. *Arzneimittelforschung*. 1984; 34: 691-95
45. Brichtope I, Fitzgerald P. *The AIDS Fighters*. Keats Publishing, New Canaan, Conn. 1987; 10: 134
46. Giles J, Palat C, Chien S, Chang Z, Kennedy D. Evaluation of echinacea for treatment of the common cold. *Pharmacotherapy*. 2000; 20(6): 690-7.

47. Henneicke-von Z, Hentschel C, Schnitker J, Kohnen R, Kohler G, Wustenberg P. Efficacy and safety of a fixed combination phytomedicine in the treatment of the common cold (acute viral respiratory tract infection): results of a randomised, double blind, placebo controlled, multicentre study. *Curr Med Res Opin.* 1999; 15(3): 214-27.
48. Trubus. Echinacea harapan baru pendamba kesehatan.PT. Trubus Swadaya. September 2007;454:102-4.
49. Gallo M, Sarkar M, Au W, Pietrzak K, Comas B, Smith M, Jaeger TV, Einarson A, Koren G. Pregnancy outcome following gestational exposure to echinacea: a prospective controlled study. *Arch Intern Med.* 2000;160(20):3141-3.
50. Tyler V. *Herbs of Choice.* Pharmaceutical Products Press, an imprint of The Haworth Press, Binghamton, NY. 1994; 12: 182-4.
51. Collins E, Berkoff N. *Everything You Need to Know About Echinacea and Immunity.* Roseville, CA:Prima Publishing;1999:85-6
52. World Health Organization. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. 1993: 44.
53. Lemeshow Stanley, *Metode Statistik untuk Penentuan Besar Sampel,* Cetakan pertama, Gadjah Mada University Press, 1997
54. Pratiknya AW. *Dasar-dasar Metodologi Penelitian kedokteran dan kesehatan.* Cetakan I. Jakarta: CV Rajawali, 1986: 147-65.
55. Elyana Asnar. Peran perubahan limfosit penghasil sitokin dan peptida motilitas usus terhadap modulasi respon imun mukosal tikus yang stress akibat stressor renjatan listrik. Suatu pendekatan psikoneuroimunologi.(Disertasi).Program Pasca Sarjana Unair.2001

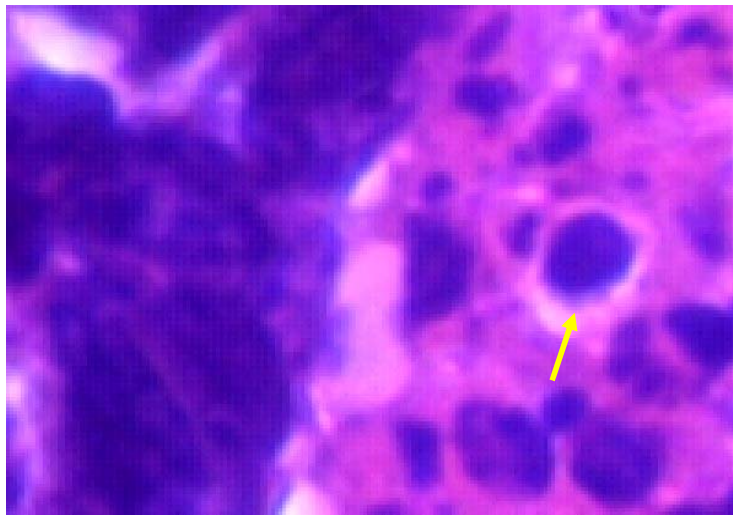
Lampiran



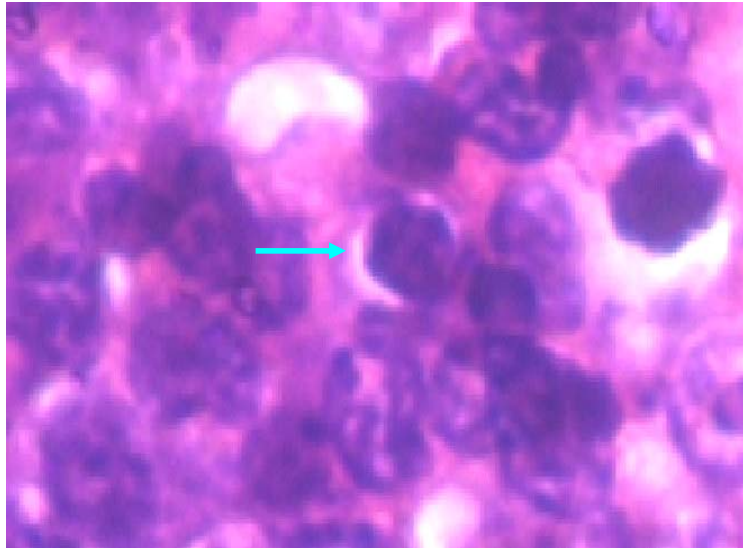
Pewarnaan HE sel tumor payudara dengan pembesaran 100X



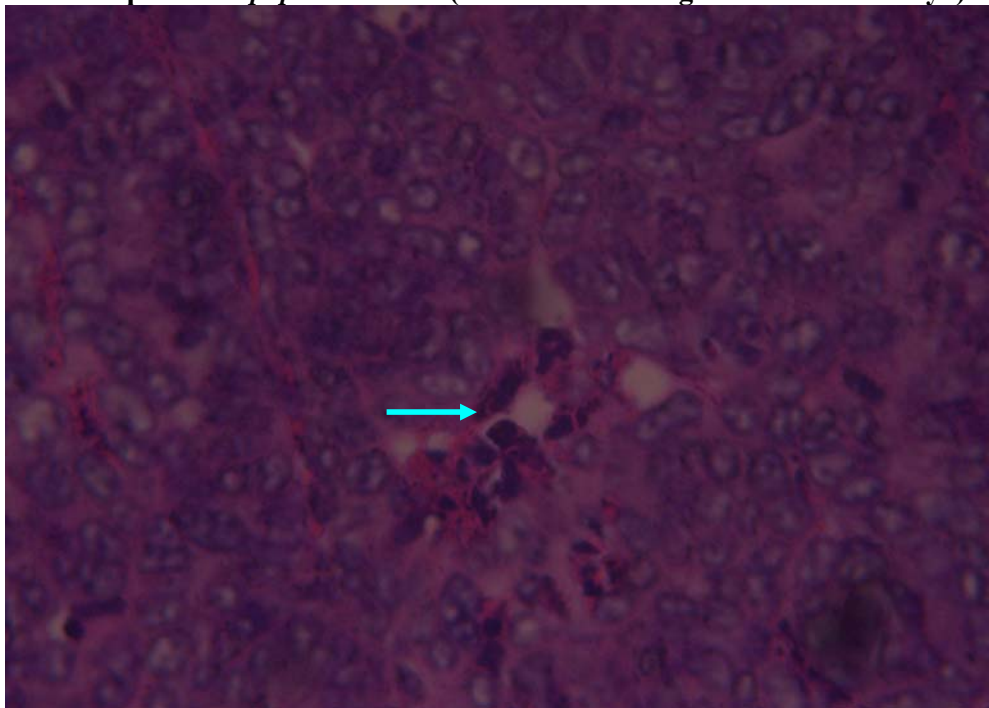
**Pewarnaan HE sel tumor payudara dengan pembesaran 100X
Tanda panah : Apoptotic Body (Halo dan inti basofilik)**



Tanda panah : *Apoptotic Bodies* (Inti basofilik dengan halo disekitarnya)



Tanda panah : *Apoptotic Bodies* (Inti basofilik dengan halo disekitarnya)



Tanda panah : Apoptotic body dengan inti yang fragmented



ELISA MICROPLATE READER untuk membaca absorbansi kadar IFN- γ



IFN- γ ELISA Kit untuk mencit

