

**PENGARUH *POLYPHENOLS* TEH HIJAU TERHADAP
KAPASITAS PRODUKSI IFN- γ
OLEH SEL MONONUKLEAR DARAH TEPI AKIBAT
RADIOTERAPI PADA PENDERITA KARSINOMA NASOFARING**

***THE EFFECT OF GREEN TEA POLYPHENOLS
TO THE IFN- γ PRODUCTION CAPACITY
BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS AS A RESULT OF
A RADIOTHERAPY TO THE NASOPHARYNGEAL CARCINOMA PATIENTS***



TESIS

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat sarjana S-2 dan
memperoleh keahlian dalam bidang Ilmu Kesehatan THT-KL**

JOHAN JOHANNES BERNARDUS

**PROGRAM PASCA SARJANA MAGISTER ILMU BIOMEDIK DAN
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS 1
ILMU KESEHATAN THT-KL
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2007**

Lembar pengesahan

TESIS

**PENGARUH *POLYPHENOLS* TEH HIJAU TERHADAP
KAPASITAS PRODUKSI IFN- γ OLEH SEL MONONUKLEAR DARAH TEPI AKIBAT
RADIOTERAPI PADA PENDERITA KARSINOMA NASOFARING**

*THE EFFECT OF GREEN TEA POLYPHENOLS TO THE IFN- γ PRODUCTION CAPACITY BY
PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS AS A RESULT OF A RADIOTHERAPY
TO THE NASOPHARYNGEAL CARCINOMA PATIENTS*

Disusun oleh:

Johan Johannes Bernardus

**Telah dipertahankan di depan tim penguji pada tanggal 2 Juli 2007 dan dinyatakan telah
memenuhi syarat untuk diterima**

Pembimbing Pertama

Pembimbing Kedua

dr. H. Wiratno, SpTHT-KL(K)

Nip. 130 350 523

Prof. dr. Noor Pramono, MMedSc, SpOG (K)

Nip. 130 345 800

Mengetahui

Ketua Program Studi
Ilmu Kesehatan THT-KL
Universitas Diponegoro

Ketua Program Studi Magister Ilmu
Biomedik Program Pasca Sarjana
Universitas Diponegoro

dr. Hj. Amriyatun, SpTHT-KL(K)

Nip. 130 539 456

Prof. dr. H. Soebowo, SpPA(K)

Nip. 130 352 249

PERNYATAAN

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

Johan J. Bernardus

RIWAYAT HIDUP SINGKAT

A. Identitas

Nama : Johan Johannes Bernardus
Tempat/tanggal lahir : Yogyakarta / 3 Februari 1963
NIM Magister Biomedik : G4A 002059
NIM PPDS I IK THT-KL : G3L 002085
Agama : Kristen
Jenis kelamin : Laki-laki

B. Riwayat pendidikan

1. SD Xaverius Ambon : Lulus tahun 1974
2. SMPN II Surabaya : Lulus tahun 1977
3. SMAN II Surabaya : Lulus tahun 1981
4. FK UNS Surakarta : Lulus tahun 1990
5. Spesialisasi IK THT-KL FK UNDIP : Lulus Juni 2007
6. Magister Ilmu Biomedik UNDIP : Lulus Juli 2007

C. Riwayat Pekerjaan

1. Dokter Lepas Pantai Pertamina-HudBay Oil : 1990
2. Dokter PNS Dinkes TK II Kota Ambon Provinsi Maluku : 1991-2002

D. Riwayat keluarga

1. Nama orang tua Ayah : Drg . A J J Bernardus (alm)
Ibu : Drg. J F M Bernardus-Pattinasarany
2. Nama Istri : Claudia Anastasia SIP
3. Nama Anak : 1. Jodya Blessella Bernardus
: 2. Jodine Gracelda Bernardus

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Kuasa, berkat karuniaNya penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Penelitian ini merupakan salah satu syarat dalam menyelesaikan PPDS I Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok – Bedah Kepala dan Leher dan Program Pendidikan Magister Ilmu Biomedik pada Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / Rumah Sakit Dr. Kariadi Semarang.

Karsinoma nasofaring merupakan salah satu penyakit tumor yang banyak dijumpai di bagian IK THT-KL. Penulis sangat tertarik untuk menilai status imun penderita KNF akibat radioterapi dan beberapa kali mencoba untuk mendapatkan masalah penelitian yang *feasible*, tapi terbentur dengan beberapa kendala. Kami mengucapkan terima kasih karena diizinkan oleh guru dan sekaligus pembimbing saya dr. Wiratno Sp THT-KL(K) untuk melakukan penelitian tentang pengaruh *polyphenols* teh hijau pada penderita KNF yang mendapat radioterapi.

Penyuluhan kepada pasien tentang waktu radiasi dan waktu minum obat yang tepat, komplikasi dan penanganan akibat radiasi yang akan terjadi serta motivasi agar dapat mengikuti seluruh program yang telah direncanakan mendapat perhatian dalam penelitian ini. Nasehat, bimbingan serta motivasi yang diberikan oleh pembimbing serta kerja sama yang baik antara teman-teman sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan baik.

Semarang, Juli 2007

Johan J. Bernardus

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN PENELITIAN	ii
PERNYATAAN	iii
RIWAYAT HIDUP SINGKAT	iv
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
ABSTRAK	xvii
DAFTAR SINGKATAN	xix
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan umum	3
1.3.2 Tujuan khusus	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.5 Keaslian Penelitian	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Karsinoma Nasofaring	6

2.2	Penatalaksanaan radioterapi karsinoma nasofaring	7
2.3	Radiobiologi	9
2.4	Efek samping radioterapi karsinoma nasofaring	10
2.4.1	Efek radioterapi pada sel imun	10
2.4.2	Efek radioterapi pada komponen seluler	11
	a. Efek radioterapi pada air	12
	b. Efek radioterapi pada DNA	14
2.5	Respon Imun terhadap Tumor	16
2.5.1	Peranan sel-sel imun terhadap tumor yang memproduksi IFN- γ	16
	1. Sel Monosit-Makrofag/Mn-Mf.....	16
	2. Sel limfosit T	17
	3. Sel NK	18
2.4.2	Peran sitokin-sitokin pada sistim imun seluler	19
	1. IL-1	19
	2. IL-2	19
	3. IL-8	19
	4. IL-10	20
	5. IL-12	20
	6. TNF- α	21
	7. IFN- γ	21
2.5	Sel Imun Darah Tepi Penderita Kanker	23
2.6	Radikal Bebas	24
2.6.1	Efek radikal bebas terhadap asam arakidonat	26
2.6.2	Efek radikal bebas terhadap faktor transkripsi NF- κ B.....	27

2.6.3	Efek radikal bebas terhadap IL-10 dan IL-12	27
2.7	Antioksidan	28
2.7.1	<i>Polyphenols</i> teh hijau	28
2.7.2	Struktur kimia <i>polyphenols</i> teh hijau	30
2.7.3	Efek biologi <i>polyphenols</i> teh hijau	33
1.	<i>Polyphenols</i> menginduksi apoptosis dan menghentikan siklus sel kanker	34
2.	<i>Polyphenols</i> mencegah kerusakan sel imunologis akibat stres oksidatif..	34
3.	<i>Polyphenols</i> mencegah penyebaran tumor.....	36
2.8	Bagan Patofisiologi	37
2.9	Patofisiologi	39
2.10	Kerangka teori	41
2.11	Kerangka konsep	42
2.12	Hipotesis	42
BAB 3 METODE PENELITIAN.....		43
3.1	Jenis penelitian	43
3.2	Tempat penelitian	43
3.3	Populasi dan sampel	43
3.3.1	Populasi target dan populasi terjangkau	43
3.3.2	Sampel	44
a.	Kriteria inklusi	44
b.	Kriteria eksklusi	45
3.4	Besar Sampel	45
3.5	Tehnik pengambilan sampel	46
3.6	Variabel penelitian	46

3.6.1	Klasifikasi variabel penelitian	46	
3.6.2	Definisi operasional variabel	47	
3.7	Bahan penelitian	49	
3.8	Instrumen penelitian	49	
3.9	Cara kerja	50	
3.10	Alur kerja penelitian	53	
3.11	Sampel tidak diikutkan dalam penelitian	53	3.12 Cara
	Analisis Data	54	
BAB 4 HASIL PENELITIAN		55	
4.1	Distribusi frekuensi subyek.....	56	
4.1.1	Distribusi kelompok umur	56	
4.1.2	Distribusi jenis kelamin	56	
4.1.3	Distribusi jenis patologi anatomi	56	
4.1.4	Distribusi stadium tumor	57	
4.2	Distribusi variabel subyek pada kelompok kontrol dan perlakuan	57	
4.3	Perbandingan komponen imun pra-pasca radioterapi dalam grafik <i>box plot</i>	59	
4.4	Analisis Inferensial	62	
4.4.1	Komparasi komponen respons imun antara kelompok kontrol dan perlakuan	63	
a.	Komparasi komponen respon imun antara kedua kelompok sebelum radioterapi	63	
b.	Komparasi komponen respon imun antara kedua kelompok sesudah		

radioterapi	63
4.4.2 Perubahan komponen respon imun pasca radioterapi	64
a. Perubahan komponen respon imun pasca radioterapi kelompok kontrol (radioterapi + plasebo)	64
b. Perubahan komponen respon imun pasca radioterapi kelompok perlakuan (radioterapi + <i>polyphenols</i>)	65
4.4.3 Selisih absolut rerata hitung limfosit, monosit dan kadar IFN- γ pra dan pasca radioterapi antara kelompok kontrol dan perlakuan.....	66
4.4.4 Selisih absolut limfosit, monosit dan IFN- γ pra dan pasca radioterapi antara kedua kelompok dalam prosentase	66
BAB 5 PEMBAHASAN	68
5.1 Metode penelitian	68
5.2 Deskripsi karakteristik subyek	70
5.2.1 Berdasarkan umur subyek	70
5.2.2 Berdasarkan jenis kelamin subyek	71
5.2.3 Berdasarkan jenis patologi anatomi subyek	72
5.2.4 Berdasarkan stadium tumor subyek	72
5.3 Perubahan respons imun pasca radioterapi pada kelompok kontrol ...	73
5.4 Perubahan respons imun pasca radioterapi pada kelompok perlakuan	77
5.5 Perbedaan hitung sel imun dan kadar IFN- γ pasca radioterapi antara kelompok kontrol dan perlakuan	78
5.6 Keterbatasan Dan Kendala Selama Penelitian	82
BAB 6 SIMPULAN DAN SARAN	83
6.1 SIMPULAN	83

6.2 SARAN	83
UCAPAN TERIMA KASIH	84
DAFTAR PUSTAKA	86

DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 3.1	: Komposisi unsur kimia dalam teh hijau	30
Tabel 4.1	: Distribusi frekuensi kelompok umur	56
Tabel 4.2	: Distribusi subyek menurut jenis kelamin dan stadium kanker antara kedua kelompok	57
Tabel 4.3	: Uji normalitas Kolmogorov-Smirnov variabel umur, status <i>Karnofsky</i> dan hemoglobin	58
Tabel 4.4	: Perbandingan rerata umur, status <i>Karnofsky</i> dan hemoglobin antara kelompok kontrol dan perlakuan	58
Tabel 4.5	: Uji normalitas variabel penelitian kelompok kontrol dan Perlakuan	62
Tabel 4.6	: Komparasi komponen respon imun antara kelompok kontrol dan perlakuan sebelum radioterapi	63
Tabel 4.7	: Komparasi komponen respons imun antara kelompok kontrol dan perlakuan sesudah radioterapi	64
Tabel 4.8	: Perubahan komponen respons imun pasca radioterapi kelompok kontrol (radioterapi + plasebo)	65
Tabel 4.9	: Komparasi komponen respon imun pra dan pasca radioterapi kelompok Perlakuan (radioterapi+ <i>polyphenols</i>)	65
Tabel 4.10	: Komparasi selisih hitung limfosit, monosit dan IFN- γ antara kelompok kontrol dan perlakuan	66

Tabel 4.11 : Selisih pra dan pasca radioterapi untuk variabel komponen respon imun pada kelompok kontrol dan perlakuan dalam persentase 67

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 3.1 : Struktur kimia <i>catechin</i> pada teh hijau	30
Gambar 3.2 : Struktur kimia derivat <i>catechins</i> dalam teh hijau	31
Gambar 4.1 : Grafik <i>box plot</i> hitung limfosit pra dan pasca radioterapi antara kelompok kontrol dan perlakuan.....	59
Gambar 4.2 : Grafik <i>box plot</i> hitung monosit pra dan pasca radioterapi antara kelompok kontrol dan perlakuan.....	60
Gambar 4.3 : Grafik <i>box plot</i> kadar IFN- γ pra dan pasca radioterapi antara kelompok kontrol dan perlakuan.	61
Gambar 4.4 : Perbandingan persentase penurunan hitung limfosit, monosit dan kadar IFN- γ pra-pasca radioterapi antara kelompok kontrol dan perlakuan	62

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Stadium klinik karsinoma nasofaring menurut UICC edisi V....	93
Lampiran 2 : Pemeriksaan IFN- γ	94
Lampiran 3 : <i>Ethical clearance</i>	97
Lampiran 4 : Informed consent	98
Lampiran 5 : Gambar perubahan kadar IFN- γ per pasien awal dan akhir pada kelompok kontrol	99
Lampiran 6 : Gambar perubahan kadar IFN- γ per pasien awal dan akhir pada kelompok perlakuan.....	100
Lampiran 7 : Farmako kinetik <i>catechin</i>	101

ABSTRAK

PENGARUH *POLYPHENOLS* TEH HIJAU TERHADAP KAPASITAS PRODUKSI IFN- γ OLEH SEL MONONUKLEAR DARAH TEPI AKIBAT RADIOTERAPI PADA PENDERITA KARSINOMA NASOFARING

Latar Belakang: *Polyphenols* teh hijau terbukti merupakan *scavenger* radikal bebas yang dapat mencegah penurunan produksi IL-2 dan IFN- γ , sebagai mediator yang dapat meningkatkan aktivitas imun seluler. Radioterapi pada karsinoma nasofaring bisa menurunkan produksi IFN- γ oleh sel-sel mononuklear.

Tujuan: Membuktikan pengaruh *polyphenols* teh hijau terhadap produksi IFN- γ oleh sel mononuklear akibat radioterapi pada penderita karsinoma nasofaring.

Metode: Studi *randomized pre-post test control group design* ini menggunakan penderita karsinoma nasofaring WHO tipe 2 dan 3 yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi di klinik dan bangsal THT-KL RSDK sebagai sampel, yang dibagi menjadi dua kelompok, 20 penderita kelompok kontrol (radioterapi + plasebo) dan 20 penderita kelompok perlakuan (radioterapi + *polyphenols* teh hijau). Dosis 1972 mg *epigallocatechin gallate polyphenols* teh hijau dibagi dua; dosis pertama diberikan 1,5-3 jam sebelum radioterapi dan kedua kedua pada 10 jam sesudah radioterapi. Pemeriksaan IFN- γ dengan metode ELISA, sedang untuk sel-sel imun dengan metode *autoanalyzer* dengan *Coulter HMX hematology analyzer*. Analisa statistik dengan uji beda *Independent t test* dan *Pair t test* serta non parametrik *Mann-Whitney U test* dan *Wilcoxon signed rank test*.

Hasil: Kadar IFN- γ antara dua kelompok sebelum radioterapi berbeda bermakna ($p=0,029$) (kontrol 197 pg, perlakuan 500pg), sedangkan hitung limfosit ($p=0,862$) (kontrol 1088/ μ L, perlakuan 1016/ μ L) dan monosit ($p=0,987$) (kontrol 668 μ L/, perlakuan 667/ μ L) tidak berbeda bermakna. Kadar IFN- γ antara kedua kelompok setelah radioterapi berbeda bermakna ($p=0,045$) (kontrol 127 pg, perlakuan 192 pg), sedangkan hitung limfosit ($p=0,120$) (kontrol 408/ μ L, perlakuan 652/ μ L) dan monosit ($p=0,216$) (kontrol 421/ μ L, perlakuan 524/ μ L) tidak berbeda bermakna. Kadar IFN- γ kelompok perlakuan sebelum radioterapi tidak berbeda bermakna ($p=0,084$), sedangkan hitung limfosit ($p=0,000$) dan monosit ($p=0,000$) berbeda bermakna. Kadar IFN- γ ($p=0,031$), hitung limfosit ($p=0,000$) dan monosit ($p=0,000$) pada kelompok kontrol sebelum dan sesudah radioterapi berbeda bermakna

Simpulan: *Polyphenols* teh hijau terbukti menghambat penurunan kadar IFN- γ pada penderita karsinoma nasofaring yang mendapat radioterapi.

Kata Kunci: Karsinoma nasofaring, *Polyphenols* teh hijau, Radioterapi, IFN- γ

ABSTRACT

THE EFFECT OF GREEN TEA POLYPHENOLS TO THE IFN- γ PRODUCTION CAPACITY BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS AS A RESULT OF A RADIOTHERAPY TO THE NASOPHARYNGEAL CARCINOMA PATIENTS

Background: The green tea polyphenols is proven to be a free radical scavenger that inhibits the decreasing-production of IL-2 and IFN- γ , which function as mediators in increasing the immunocellular activities. Radiotherapy of nasopharyngeal carcinoma may reduce mononuclear IFN- γ production.

Objective: The aim of this study is to prove the effect of green tea polyphenols to mononuclear's IFN- γ production in radiotherapy of nasopharyngeal carcinomas.

Methods: The randomized pre and post test control group designs used patients with nasopharyngeal carcinoma WHO type 2 and 3 to fulfill the inclusion and exclusion criteria at the clinic and ward of ear, nose, throath, head and neck surgery departement of Kariadi hospital as samples. There were 40 sample divided into control and treated groups. The control group was treated by radiotherapy plus placebo, while the treated group was exposed to radiotherapy added with 1972 mg epigallocatechin gallate divided into two doses. The first dose was given 1,5-3 hours before radiotherapy, and the second was 10 hours later. All blood samples were examined before and after treatment. The IFN- γ levels were measured using ELISA and the mononuclear cells were counted using *Coulter HMX hematology analyzer*. The statistical analysis was concluded using parametric *Independent t test* and *Pair t test* as well as non-parametric *Mann-Whitney U test* and *Wilcoxon signed rank test* for differentiation test.

Result: The IFN- γ levels between two groups before radiotherapy were significantly different ($p=0,029$) (control group 197 pg, treated group 500pg), while the lymphocyte ($p=0,862$) (control group 1088/ μ L, treated group 1016/ μ L) and monocyte ($p=0,987$) (control group 668/ μ L, treated group 667/ μ L), were not significantly different. The IFN- γ ($p=0,045$) (control group 127 pg, treated group 192 pg), level between two groups after radiotherapy was significantly different however the lymphocyte ($p=0,120$) (control group 408/ μ L, treated group 652/ μ L) and monocyte ($p=0,216$) (control group 421/ μ L, treated group 524/ μ L), were not significantly different. The IFN- γ levels in treated group before and after radiotherapy were not significantly different ($p=0,084$), while the lymphocyte ($p=0,000$) and monocyte ($p=0,000$), were significantly different. The IFN- γ ($p=0,031$), lymphocyte ($p=0,000$) and monocyte ($p=0,000$) levels in control group before and after radiotherapy were significantly different.

Conclusion: The study prove that green tea polyphenols significantly inhibit the decreasing of mononuclear's IFN- γ production in radiotherapy of nasopharyngeal carcinomas.

Key words: Nasopharyngeal carcinoma, Green tea polyphenols, Radiotherapy, IFN- γ .

DAFTAR SINGKATAN

APC	: <i>antigen presenting cell</i>
CMI	: <i>cell mediated immunity</i>
CSF	: <i>colony stimulating factor</i>
CTL / sel T CD 8/Tc	: <i>cytotoxic T lymphocyte / sel T cluster differentiation 8/ Sel T sitotoksik</i>
DNA	: <i>deoxyribo nucleic acid</i>
DSB	: <i>double strand breaks</i>
EC	: <i>epicatechin</i>

ECG	: <i>epicatechin gallate</i>
EGC	: <i>epigallocatechin</i>
EGCG	: <i>epigallocatechin gallate</i>
H•	: radikal bebas hidrogen
IFN- γ	: interferon gamma
IgG	: immunoglobulin G
IL-12	: interleukin 12
IL-2R	: interleukin 2 reseptor
INOS	: <i>inducible nitric oxide synthase</i>
KNF	: karsinoma nasofaring
LAK	: <i>lymphokine activated killer</i>
MAF	: <i>migration activation factor</i>
MCP-1	: <i>monocyte chemotactic protein -1</i>
MHC	: <i>major histocompatibility complex</i>
MIF	: <i>migration inhibition factor</i>
Mf	: makrofag
Mn	: monosit
NF- κ B	: <i>nucleus factor kappa beta</i>
O•	: radikal bebas superoksida
OH•	: radikal bebas hidroksil
OOH• :	: radikal bebas peroksil
PGE2	: prostaglandin E2
PHA	: <i>phytohaemagglutinin</i>
PLA2	: <i>phospholipase A2</i>
PUFA	: <i>polyunsaturated fatty acid</i>
ROS/SOR	: <i>reactive oxygen species/species oksigen reaktif</i>
Sel NK	: sel natural killer
SSB	: <i>single strand breaks</i>
T CD4	: sel T <i>cluster differentiation 4</i>
TCR	: <i>T cell receptor</i>
TNF- α	: <i>tumor necrotic factor alfa</i>
VEGF	: <i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Karsinoma Nasofaring (KNF) adalah keganasan yang berasal dari epitel permukaan nasofaring dan merupakan 60% dari seluruh keganasan kepala dan leher di Indonesia. Penyakit ini menempati urutan kelima diantara keganasan yang terdapat di seluruh tubuh. Di bagian Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok Bedah Kepala dan Leher (IK THT-KL) Rumah Sakit Dokter Kariadi Semarang didapatkan 127 kasus KNF dari tahun 2000–2002.^{1,2}

Pilihan utama pengelolaan KNF adalah radioterapi, tujuannya ialah iradikasi semua sel kanker di nasofaring dan penyebarannya di kelenjar getah bening leher.³ Sel normal yang terpapar sinar X dapat mengalami kerusakan biologis, disamping itu sel normal diluar area radioterapi juga mengalami efek negatif radioterapi.^{3,4} Kerusakan biologis pada sel normal merupakan bentuk efek samping yang dijumpai pada semua kasus radioterapi. Efek samping dini yang sangat merugikan penderita dalam hubungan dengan tujuan terapi kanker adalah menurunnya kuantitas dan kualitas sel-sel imun.^{5,6} Sel-sel imun yang berfungsi baik sangat diperlukan untuk memfagosit dan menghambat pertumbuhan kanker. Fakta di klinik menunjukkan bahwa penderita dengan sistem imun yang rendah menunjukkan respon terapi juga rendah dan prognosisnya jelek.^{7,8}

Sinar X yang mengenai molekul H₂O di area nasofaring dan kelenjar getah bening leher akan membentuk radikal bebas hidroksil (OH[•]) yang paling reaktif dalam merusak molekul DNA, lemak tidak jenuh, protein dan enzim. Untuk mencegah destruksi biologis lebih berat diupayakan menetralsir radikal bebas terutama radikal bebas hidroksil, sehingga didapatkan respons terapi KNF yang lebih baik.^{4,5}

Polyphenols teh hijau (*polyphenols*) termasuk antioksidan yang berperan sebagai *scavenger* radikal bebas terutama menetralsir radikal bebas hidroksil. Diantara senyawa *polyphenols* teh hijau

yang paling besar efektivitas antioksidannya dan paling tinggi konsentrasinya ialah *epigallocatechin gallate* (EGCG).⁹⁻¹¹ Hal ini karena EGCG memiliki trihidroksil pada karbon 3,4,5 di cincin B dan bentuk *gallate moiety esterified* di karbon cincin C. Gugus hidroksil dan *gallate moiety esterified* yang berperan sebagai donor elektron ke radikal bebas sehingga reaktivitas radikal bebas berhenti dan destruksi biologis tidak terjadi. EGCG paling besar peran antioksidan dan telah dibuktikan efektivitasnya sebagai anti kanker, anti inflamasi dan anti imunosupresi.^{9,11,12} Penelitian di Amerika Serikat menunjukkan *polyphenols* dapat menghambat penurunan kuantitas dan kualitas sel-sel imun limfosit T CD4 dan subsetnya, limfosit B, monosit/makrofag, sel NK dan sel *lymphokine activated killer* (LAK) yang disebabkan oleh radikal bebas sinar ultraviolet, bahan karsinogenik dan endotoksin.¹³⁻¹⁶

Paparan sinar ultraviolet menyebabkan efek imunosupresi pada tikus, efek ini dapat dicegah oleh *polyphenols* dengan terjadi peningkatan produksi sitokin IL-10 di kulit dan di limfonodi setempat, tetapi terjadi peningkatan produksi sitokin IL-12 di limfonodi. Penekanan produksi IL-10 yang berperan menghambat aktivitas sel dan ditingkatkannya produksi IL-12 yang berperan meningkatkan aktivitas sel, berakibat limfosit menjadi lebih aktif karena akan meningkatkan aktivitas sitokin IL-2 dan IFN- γ .¹⁴ IFN- γ adalah sitokin utama yang mengaktivasi fagositosis sel mononuklear terhadap tumor.¹⁷

Polyphenols dapat mengikat radikal bebas *in vitro* dan *in vivo*, maka dapat diasumsikan bahwa *polyphenols* yang diberikan pada penderita KNF yang mendapat radioterapi dapat menghambat efek radikal bebas dan meningkatkan produksi IFN- γ oleh sel mononuklear darah tepi.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah *polyphenols* teh hijau yang diberikan bersama radioterapi menghambat penurunan produksi IFN- γ oleh sel mononuklear darah tepi pada penderita KNF ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan menilai pengaruh *polyphenols* teh hijau terhadap kapasitas produksi IFN- γ oleh sel mononuklear darah tepi pada penderita KNF yang mendapat radioterapi.

1.3.2 Tujuan khusus

1.3.2.1 Mengukur perbedaan kapasitas produksi kadar IFN- γ sebelum dan sesudah radioterapi yang diproduksi oleh sel mononuklear darah tepi pada kelompok penderita KNF yang mendapat radioterapi dan plasebo.

1.3.2.2. Mengukur perbedaan kapasitas produksi kadar IFN- γ sebelum dan sesudah radioterapi yang diproduksi oleh sel mononuklear darah tepi pada kelompok penderita KNF yang mendapat radioterapi dan *polyphenols* teh hijau.

1.3.2.3. Membuktikan adanya perbedaan kapasitas produksi kadar IFN- γ yang diproduksi oleh sel mononuklear darah tepi antara kelompok penderita KNF yang mendapat radioterapi dan plasebo dengan kelompok penderita KNF yang mendapat radioterapi dan *polyphenols* teh hijau.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Penelitian tentang *polyphenols* teh hijau ini dapat digunakan sebagai pengembangan dasar ilmu dalam mengungkapkan alternatif terapi untuk meningkatkan kapasitas produksi IFN- γ oleh sel mononuklear akibat radioterapi pada penderita KNF.

1.4.2 Penelitian ini dapat sebagai dasar penelitian selanjutnya, misalnya tentang potensi *polyphenols* teh hijau dalam menghambat penurunan kapasitas produksi IFN- γ oleh sel mononuklear darah tepi akibat radioterapi pada penderita karsinoma lainnya

1.5 Keaslian Penelitian

Penelitian efek *polyphenols* dalam mencegah immunosupresi radikal bebas terhadap terhadap sel imun yang sedang mengalami stres oksidatif belum banyak dilakukan. Penelitian yang pernah dilakukan diantaranya:

- 1) Penelitian di Jakarta (1984) terhadap 30 penderita KNF yang mendapat radioterapi. Penurunan indeks transformasi dan jumlah relatif limfosit terendah setelah radioterapi minggu ke 4 dan mulai adanya perbaikan sampai minggu ke 6. Setelah 2 minggu pasca radioterapi terjadi perbaikan jumlah dan indeks transformasi limfosit seperti sebelum radioterapi.⁵
- 2) Penelitian in-vitro tentang efek biologis *polyphenols* terhadap adeno karsinoma paru dan kolon di Piscataway Amerika Serikat (1998). *Polyphenols* dapat memacu apoptosis kedua sel kanker tersebut.¹¹
- 3) Penelitian *post test only control group* di Yogyakarta (2004) menemukan pemberian *polyphenols* pada mencit yang terinfeksi *Salmonella typhimurium* menyebabkan peningkatan respon imun seluler, dimana makin tinggi kadar *polyphenols* makin tinggi pula kadar IFN- γ supernatan kultur splenosit dan makin tinggi pula aktivitas fagosit sel makrofag peritoneum.¹⁸
- 4). Penelitian *randomized pre-post test control group* di Claveland Amerika Serikat (1999) menemukan paparan sinar ultraviolet pada kulit tikus akan terbentuk radikal bebas. Radikal bebas menyebabkan peningkatan produksi IL-10 dan penurunan IL-12. *Polyphenols* dapat mencegah peningkatan produksi IL-10 dan penurunan produksi IL-12, sehingga terjadi peningkatan produksi IFN- γ oleh sel mononuklear.¹⁴

Penelitian *in vivo* tentang efek *polyphenols* terhadap kapasitas produksi IFN- γ pada penderita KNF yang mendapat radioterapi belum pernah dilakukan, dengan demikian penelitian yang dilakukan merupakan penelitian pertama.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karsinoma Nasofaring

KNF di Indonesia merupakan tumor ganas terbanyak di daerah THT Kepala dan Leher. Penelitian di klinik onkologi THT-KL RSUD Dr Soetomo Surabaya pada tahun 2000-2001 didapatkan 623 kasus baru KNF (67,72%) dari 1037 kasus keganasan.¹⁹ Di bagian IK THT-KL Rumah Sakit Dr Kariadi Semarang didapatkan 127 kasus KNF dari tahun 2000-2002.² Semua umur dapat terkena KNF, namun sangat jarang dijumpai penderita dibawah umur 20 tahun dan umur terbanyak di antara 45-54 tahun. Laki-laki lebih banyak dari wanita dengan perbandingan antara 2-3 : 1.^{2,20}

World Health Organization (WHO) pada tahun 1991 membagi KNF menjadi WHO tipe 1, WHO tipe 2 dan WHO tipe 3.²¹ Histopatologi KNF WHO tipe 1 adalah karsinoma sel skuamosa dengan keratinisasi, WHO tipe 2 karsinoma tidak berkeratin sedangkan KNF WHO tipe 3 karsinoma tidak berdiferensiasi. Jenis KNF yang banyak dijumpai adalah WHO tipe 2 dan WHO tipe 3.²¹⁻²⁴ Di bagian IK THT-KL Rumah Sakit Dr Kariadi Semarang didapatkan 112 kasus (88,2%) WHO tipe 2 dan WHO tipe 3, dari 127 kasus KNF.²

Penderita KNF umumnya datang berobat di klinik sudah dalam stadium lanjut (60-90%), tumor sudah meluas keluar dari nasofaring. Kebanyakan tumor primer di nasofaring sudah T3 atau T4, jarang masih T1 atau T2. Gejala klinik KNF meliputi gejala telinga, hidung, mata, gejala kranial dan gejala penyebaran tumor ke kelenjar limfe servikal.^{1,18}

Diagnosis KNF ditegakkan berdasarkan anamnesis, pemeriksaan klinis, radiologis dan histopatologis. Pemeriksaan nasofaring dapat dilakukan dengan menggunakan alat rinoskop kaku

maupun lentur. Dengan cara ini dapat diketahui berbagai kelainan makroskopis yang dapat dijumpai pada nasofaring seperti penonjolan mukosa, tumor eksofitik, infiltratif dan ulseratif. Disamping melihat secara langsung, tehnik ini dapat untuk melakukan biopsi guna menegakkan diagnosis pasti secara histopatologis. Pemeriksaan histopatologis dari spesimen nasofaring merupakan standard baku emas untuk diagnosis pasti. Tumor nasofaring yang kecil atau suatu residual tumor, tehnik endoskopi cukup akurat karena sensitivitasnya mencapai 95%.²² Pemeriksaan radiologis CT-skan dengan kontras dapat menunjukkan destruksi tulang, perluasan tumor kedalam intrakranial serta membedakan dengan jelas jaringan tumor dan jaringan sehat sekitarnya. Tanda keganasan nasofaring bila dijumpai asimetris fosa rosenmuler kanan dan kiri dan adanya pembengkakan pada otot-otot tensor dan levator veli palatini.^{1,21} Setelah diagnosis pasti ditegakkan, penentuan stadium perlu ditentukan berdasarkan klasifikasi TNM oleh UICC (*Union Internationale Contre Cancer*) edisi V.¹⁹ (lampiran 1)

2.2 Penatalaksanaan radioterapi karsinoma nasofaring

Pengobatan KNF menggunakan sinar pengion untuk membunuh atau menghilangkan (eradikasi) seluruh sel kanker yang ada di nasofaring dan metastase di kelenjar getah bening leher. Radioterapi sampai sekarang masih merupakan pilihan utama untuk penderita KNF.^{1,3,19,21} Pertimbangan pemilihan radioterapi sebagai pengobatan pilihan utama pada KNF terutama didasarkan fakta bahwa secara histopatologis kebanyakan terdiri dari WHO tipe 2 dan WHO tipe 3 yang tergolong radiosensitif, yang kedua karena KNF terletak di lokasi yang disekitarnya terdapat organ vital dengan pola penyebaran ke intrakranial sehingga pembedahan radikal untuk tujuan kuratif sangat sulit dikerjakan.^{19,21}

Pesawat cobalt 60 merupakan isotop buatan yang memancarkan sinar γ . Radioterapi sinar γ diberikan beberapa kali dengan dosis terbagi (fraksinasi), yaitu radioterapi dosis 200 cGy setiap fraksi pemberian 5 kali seminggu selama 6 - 7,5 minggu. Dosis yang dibutuhkan untuk eradikasi

tumor tergantung dari banyaknya sel kanker (besarnya tumor). Tumor yang masih dini (T1-T2) dapat diberikan dengan dosis 200-220 cGy per fraksi, 5 kali seminggu tanpa istirahat mencapai dosis total 6000-6600 cGy selama 7 minggu. Sedangkan untuk KNF dengan ukuran tumor yang lebih besar (T3 dan T4) dianjurkan diberikan dosis total radioterapi dengan tumor primer di nasofaring yang lebih tinggi yaitu 7000-7500 cGy.^{21,22}

Booster dapat diberikan dengan cara radioterapi interna bila masih didapatkan residu tumor di nasofaring. Area penyinaran diperkecil hanya pada tumor di nasofaring saja sebesar 1000 – 1500 cGy sehingga mencapai dosis total 7500-8000 cGy.^{21,23,24}

Tujuan utama radioterapi dengan sinar X pada pengobatan KNF adalah rusaknya DNA (*deoxyribonucleic acid*) di inti kromosom sel kanker yang berakibat nekrosis sel atau hilangnya kemampuan sel melakukan aktivitas proliferasi. Kerusakan sel dapat terjadi secara langsung maupun tidak langsung. Kematian sel kanker karena kerusakan DNA merupakan efek radioterapi sinar pengion secara langsung, sedangkan kerusakan struktur vital sel sebagai akibat ionisasi molekul air merupakan efek tidak langsung. Efek biologi yang terjadi sering disebabkan oleh efek tidak langsung. Efek biologi radioterapi bersifat non selektif dapat menimbulkan kerusakan pada sel tumor maupun sel normal yang terpapar sinar radiasi. Sel normal yang terkena radiasi akan menimbulkan efek samping akibat radioterapi.²⁴⁻²⁷

2.3 Radiobiologi

Radiobiologi adalah ilmu yang mempelajari berbagai aspek radioterapi dan efek biologis yang ditimbulkan. Radioterapi menimbulkan serangkaian proses yang dapat dibagi menjadi 3 fase:

a. Fase fisika. Fase ini terjadi dari interaksi antara partikel yang bermuatan (sinar X) dengan atom penyusun jaringan. Selama perjalanan sinar yang menuju DNA ini terjadi interaksi terutama dengan elektron di lintasan luar (*orbital electrons*), akibatnya satu atau lebih elektron dari atom terlepas (*ionisasi*) dan atom atau molekul tersebut mempunyai energi yang besar (*excitation*).

Apabila elektron yang lepas masih mempunyai cukup energi akan mengionisasi dan mengeksitasi atom lain yang ada di dekat lintasannya. Demikianlah rantai ionisasi berlangsung sampai energi elektron melemah dan berhenti berinteraksi.

b. Fase kimia. Pada fase ini terjadi reaksi antara atom atau molekul yang rusak dengan komponen seluler lainnya melalui reaksi kimia. Ionisasi dan eksitasi menimbulkan putusnya ikatan kimia dan menghasilkan molekul radikal bebas. Radikal bebas ini sangat reaktif menimbulkan reaksi berkelanjutan dan berhenti setelah terjadi keseimbangan elektronik. Radikal bebas yang terbentuk dapat terjadi 1 ms setelah paparan radioterapi.

c. Fase biologis. Fase ini merupakan kelanjutan dari fase sebelumnya yaitu terjadi perbaikan struktur yang rusak atau justru terjadi kematian sel. Proses perbaikan ditandai dengan reaksi enzimatik untuk memperbaiki kerusakan struktur kimia yang masih bisa diperbaiki. Misalnya reparasi kerusakan DNA.^{28,29}

2.4 Efek Samping Radioterapi Karsinoma Nasofaring

Pengaruh radioterapi KNF yang tidak diharapkan adalah efek samping biologik pada jaringan normal disekitarnya. Efek samping yang paling sering dijumpai adalah gangguan sistem hematopoetik, diikuti kelemahan umum, gangguan pencernaan berupa lesi mukosa, gangguan rongga mulut dan moniliasis.^{4,27} Efek samping radioterapi ini sebagian besar mulai terjadi setelah mendapat radioterapi dosis 4000 cGy. Efek samping yang terjadi akan meningkat bila dosis radioterapi dinaikkan, lokasi paparan radioterapi yang luas dan waktu paparan yang makin lama.⁴

2.4.1 Efek radioterapi pada sel imun

Efek sitotoksik sinar radioterapi dapat menimbulkan gangguan pada sistem hematopoetik yang dampaknya penurunan jumlah sel dan komplikasi yang ditimbulkan akibat penurunan tersebut. Sel leukosit yang paling radiosensitif dan jumlahnya paling cepat menurun pada sirkulasi perifer. Dari seluruh sel leukosit yang paling cepat menurun adalah limfosit diikuti granulosit.⁴

Radioterapi dapat menyebabkan penurunan jumlah CMI (*cell mediated immunity*) yang tampak dari penurunan total limfosit dari 1800 menjadi 900 pasca radioterapi atau secara persentase penurunan sel limfosit antara 50 – 60%.^{6,27} Disamping sel limfosit T, radioterapi juga menyebabkan turunnya jumlah sel limfosit B dan sel NK darah perifer. Sel-sel imun kembali normal setelah 13 minggu dan yang paling lambat sel limfosit T. Disimpulkan limfopenia yang lama pasca radioterapi kemungkinan besar karena kembalinya sel limfosit T secara pelan-pelan. Jumlah sel-sel imun seluler lokal (sel Tc, NK dan makrofag) di jaringan tumor KNF juga mengalami penurunan pasca radioterapi.²⁸⁻³⁰

Radioterapi juga menyebabkan fungsi imun seluler menurun, hal ini dibuktikan dengan tes respons transformasi sel limfosit terhadap *phytohemagglutinin (PHA)*, 9 dari 10 penderita didapati sel limfosit abnormal. Proses penurunan transformasi terjadi sejak radioterapi 0,5 Gy sampai titik optimal pada minggu ke 4. Indeks transformasi terendah pada minggu ke 4 penyinaran. Transformasi sel limfosit yang rendah masih terjadi sampai 4–6 minggu pasca radioterapi. Enam minggu pasca radioterapi ternyata tubuh penderita dapat mengadakan perbaikan, sehingga indeks transformasi dan jumlah limfosit mengalami kenaikan.^{5,6} Radioterapi juga mengakibatkan penurunan fungsi sistem imun lokal di jaringan tumor, ditandai dengan penurunan respons sel-sel imun seperti sel makrofag, NK, sel T CD8 yang memproduksi IFN- γ (respons Th1).³⁰

2.4.2 Efek radioterapi pada komponen seluler

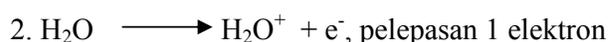
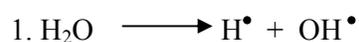
Radioterapi sekalipun dengan dosis kuratif dapat menimbulkan kerusakan dan kematian pada setiap komponen biologi yang dilaluinya. Kerusakan struktur biologis atau kematian dapat terjadi secara langsung maupun tidak langsung. Sinar X langsung menimbulkan ionisasi dan eksitasi atom atau molekul. Pada awal ionisasi sinar X hanya kehilangan sebagian dari energinya, sisa energi dapat menimbulkan eksitasi molekul lain. Demikianlah proses ionisasi berjalan berantai sampai energi partikel menjadi lemah dan tidak menimbulkan efek radiobiologik yang berarti lagi.

Sedangkan efek tidak langsung dengan melalui interaksi antara atom atau molekul dengan radikal bebas.⁴

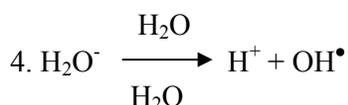
a. Efek radioterapi pada air

Air merupakan komponen terbesar penyusun sistem biologis, dengan demikian sebagian besar proses ionisasi terjadi di molekul air. Jalannya ionisasi, sinar X menyebabkan H₂O terionisasi atau disosiasi menjadi radikal bebas hidrogen (H[•]) dan radikal hidroksil (OH[•]).

Gambaran peristiwa disosiasi pada molekul H₂O sebagai berikut :

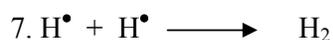
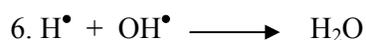


3. $\text{e}^- + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{H}_2\text{O}^-$, pengambilan 1 elektron oleh molekul H₂O yang lain. Dalam hal ini terbentuklah ion positif H₂O dan ion negatif H₂O. Selanjutnya ion positif dan negatif masing dapat bereaksi dengan H₂O membentuk radikal bebas H dan OH.



5. $\text{H}_2\text{O}^- \longrightarrow \text{OH}^- + \text{H}^\bullet$, baik ion H maupun ion OH yang tidak memiliki energi berlebih, akan bergabung kembali dan membentuk molekul H₂O dan radikal bebas OH dan H yang sangat reaktif.

Dalam larutan yang encer, banyak radikal bebas bereaksi satu sama lain membentuk H₂O, H₂ dan H₂O₂ sebagai berikut :



Hidrogen peroksida merupakan oksidan yang kuat dan dapat mengoksidasi berbagai senyawa yang terdapat dalam sel. Hidrogen peroksida ini akan mengawali terbentuknya radikal bebas yang merusak enzim seperti katalase dan peroksidase. Sebenarnya hidrogen peroksida

berperan efektif sebagai antimikroba dalam konsentrasi yang sesuai, tetapi bila kadarnya terlalu tinggi dapat menyebabkan kerusakan sel dan protein.³⁰

Rangkaian reaksi ini menunjukkan bahwa radioterapi sinar pengion yang melewati materi biologik akan menghasilkan berbagai macam radikal bebas yang kompleks terutama radikal hidrogen (H), hidroksil (OH) dan elektron, yang siap berinteraksi dengan biomolekul lain yang berdekatan. Oksigen yang terdapat dalam sel merupakan pereaksi radikal bebas yang selektif. Radioterapi yang mengenai O₂ dalam sel akan diubah menjadi *reactive oxygen species* (ROS). Sebagian diantaranya berbentuk radikal hidroksil (OH), radikal peroksil (OOH) dan ion superoksida(O₂⁻). Diantara senyawa senyawa ROS, radikal hidroksil merupakan senyawa yang paling berbahaya karena reaktivitasnya yang sangat tinggi. Radikal hidroksil mudah bereaksi dengan membran sel dan membentuk membran peroksida lipid.⁴

Hidrogen peroksida merupakan oksidan toksik yang menyebabkan peroksidasi *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) terutama di sel membran, akibatnya menimbulkan kerusakan dan kematian sel.^{4,24} Selain itu hidrogen peroksida dapat mengoksidasi berbagai senyawa yang terdapat dalam sel misalnya glutathion, merusak enzim seperti katalase dan peroksidase dan dapat menghasilkan radikal hidroksil.³¹

b. Efek radioterapi pada DNA

Radioterapi sinar pengion dapat langsung atau tidak langsung menimbulkan kerusakan pada rantai heliks molekul DNA. Kerusakan secara langsung dapat menyebabkan kerusakan antara lain hidroksilasi atau pecahnya basa timin dan sitosin, pembukaan inti purin dan pirimidin serta terlepas atau putusya gugus fosfat dari struktur sikliknya (rantai fosfodiester DNA) yang berakibat perubahan kimia DNA. Kerusakan pada DNA menyebabkan terjadi gangguan informasi genetik dan juga akan menimbulkan penyimpangan aktivitas seluler. Kerusakan secara tidak langsung pada struktur DNA disebabkan oleh radikal hidroksil yang terjadi akibat radioterapi molekul air.^{24,32}

Kerusakan yang sangat penting adalah putusnya atau pecahnya berkas ganda DNA (*single / double strand break*), *cross-linkage* dalam rantai DNA dan terjadi perubahan basa-basa pembentuk DNA. Bila kerusakan DNA tidak terlalu parah, misalnya hanya mengenai *single strand breaks* (SSB) maka masih bisa diperbaiki oleh sistem perbaikan DNA (*DNA repair system*) dan sel tersebut tetap hidup. Namun bila kerusakan DNA terlalu parah, misalnya mengenai *double strand breaks* (DSB) proses perbaikan tidak dapat dilakukan secara sempurna sehingga replikasi sel terganggu atau bahkan kematian sel. Rusaknya DNA secara aktif memicu kematian sel terprogram atau yang disebut apoptosis.^{24,32}

Untuk memahami kerusakan DNA karena radioterapi dan kaitannya dengan metode radioterapi pada kanker, perlu dipahami siklus proliferasi sel.

Ada 4 fase siklus proliferasi sel yaitu:

1. Fase G1 (fase pertumbuhan 1) antara mitosis (M) sampai ke sintesis (S), dalam fase ini terjadi persiapan sintesis sampai ke sintesis DNA.
2. Fase S (terutama di akhir fase G1 - S) paling radioresisten karena pada fase ini mempunyai kemampuan melakukan reparasi DNA.
3. Fase G2 (fase pertumbuhan 2) antara S dan M merupakan fase pasca sintesis DNA sampai fase mitosis (M).
4. Fase M (Fase mitosis) paling banyak didapatkan DNA sehingga paling besar kerusakan akibat radioterapi atau paling radiosensitif. Fase G2 - M adalah fase radiosensitif. Fase G0 merupakan fase dimana sel tidak dalam keadaan mitosis.³³

Kerusakan DNA tidak berat masih dapat diperbaiki dengan sistem perbaikan DNA. Proses perbaikan sel terjadi dalam beberapa mekanisme yaitu siklus sel berhenti pada fase G1, fase S menurun (sintesis DNA), menghentikan siklus sel pada fase G2/M dan pada beberapa kasus aktivitas proses perbaikan DNA meningkat.^{34,35} Menurunnya proses mitosis terjadi 2 jam setelah

radioterapi, berlangsung paling sedikit sampai 8 jam dan baru hilang setelah diatas 14,5 jam. Sel akan mengadakan perbaikan kerusakan akibat radioterapi ditandai dengan berhentinya proses mitosis.^{32,35}

2.5 Respon Imun Terhadap Tumor.

Sel kanker sebenarnya berasal dari tubuh sendiri yang mengalami perubahan ganas. Disamping perubahan fenotip sel normal, pada sel kanker dijumpai hilangnya komponen permukaan atau timbulnya beberapa antigen baru. Adanya perubahan antigenitas pada sel kanker yang bersifat *non self* akan memicu reaksi tubuh dalam bentuk respon imun. Respon imun yang timbul karena rangsangan antigen tumor ini pada dasarnya protektif karena dapat menghancurkan sel tumor.^{7,8}

2.5.1 Peranan sel-sel imun seluler terhadap tumor yang memproduksi IFN- γ

Efektor sistem imun seluler yang berperan penting dalam eradikasi sel tumor yang memproduksi IFN- γ adalah sel fagosit mononuklear (makrofag, limfosit-T dan sel NK).^{7,8}

1. Sel Monosit-Makrofag/Mn-Mf

Menurut fungsinya makrofag dapat dibagi menjadi 2 golongan: 1. Fagosit profesional dan 2. *Antigen Presenting Cell* (APC). Makrofag merupakan salah satu komponen sel pada respons imun alamiah yang bertindak sebagai fagosit profesional utama mampu menelan dan mencerna (memproses) patogen atau antigen. Sebagai APC, makrofag mempresentasikan antigen yang imunogenik kemudian berinteraksi dengan kompleks molekul *Major Histocompatibility Complex* (MHC) sehingga dapat dikenal oleh reseptor sel T. Peptida asal antigen ekstra seluler (mikroba) akan diikat molekul MHC kelas II, sedangkan peptida asal intraseluler (virus) atau sel tumor diikat molekul MHC kelas I. Reseptor sel limfosit TCD4 hanya akan mengikat antigen yang

dipresentasikan molekul MHC kelas II sedang sel limfosit TCD8 akan mengikat antigen yang dipresentasikan molekul MHC kelas I.^{7,8,17,37}

2. Sel limfosit T

Limfosit merupakan 20% sel leukosit dalam sirkulasi darah orang dewasa, dan kunci pengontrol sistem imun. Limfosit dapat mengenal antigen peptida rantai pendek yang dipresentasikan oleh APC. Kemampuan limfosit mengenal benda asing disebabkan oleh adanya reseptor pada permukaan sel (TCR), dan mengenal peptida antigen yang berhubungan dengan molekul MHC.^{7,38,39}

Sel limfosit T merupakan 65 – 80% dari semua limfosit dalam sirkulasi. Sel T naif (sel prekursor) bila terpajan antigen akan berdiferensiasi menjadi sel *T helper 0* CD4 (Th0), selanjutnya sel Th0 teraktivasi menjadi sel *T helper 1* (Th1) atau sel *T helper 2* (Th2). Dalam perkembangan ke arah Th1 atau Th2 tergantung kepada jenis sitokin yang menginduksi menjadi aktivitas seluler atau humoral. Sel T terdiri dari beberapa subset diantaranya adalah sel Th dan Tc. Sel Th CD4 dapat mengenal antigen yang dipresentasikan di permukaan sel APC yang berhubungan dengan molekul MHC kelas II sedangkan sel *T cytotoxic* (Tc) hanya dapat mengenal antigen yang berhubungan dengan MHC kelas I. Fungsi utama Th berperan menolong sel B dalam diferensiasi dan memproduksi antibodi. Sel Th CD4 pada umumnya tidak bersifat sitotoksik bagi tumor, tetapi sel ini berperan dalam respons anti tumor dengan memproduksi berbagai sitokin yang diperlukan untuk perkembangan sel CTL menjadi sel efektor. Sel Th yang diaktivasi oleh antigen tumor mensekresi sitokin TNF- α , INF- γ dan IL-2 yang mampu meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I dan sensitivitas sel target terhadap lisis oleh Tc. Th melepas limfokin untuk pengerahan dan aktivasi makrofag dan sel NK. Sel T juga mengeluarkan limfokin penting seperti *migration inhibition factor* (MIF), *macrophage activating factor* (MAF), *colony stimulating macrophage* (CFM), *leukotrine* yang meningkatkan aktivitas sel fagosit dalam membunuh sel tumor.^{7,8,40}

3. Sel NK

Sel *natural Killer* (NK) berasal dari sel induk di sumsum tulang yang diduga sama dengan sel induk dari sel-sel mieloid lainnya. Perkembangan sel NK setelah keluar dari sumsum tulang berbeda dengan dengan jalur yang dilalui oleh sel T dan B. Sel NK tidak mengalami pematangan di timus. Sel NK ditemukan di sirkulasi darah besar merupakan 5%-8% dari total limfosit yang beredar di darah tepi, tapi dapat juga ditemukan di jaringan limfoid terutama limfa.³⁸

Sel NK mengenal sel sasaran yang tidak antigen spesifik dan juga tidak MHC dependen dan diduga mempunyai fungsi terpenting sebagai anti kanker. Sel NK tanpa sensitisasi terlebih dahulu dapat mengenali sel tumor karena sel tumor mengekspresikan antigen berupa molekul glikoprotein (IgG) pada permukaannya. Selanjutnya terjadi ikatan antara IgG dengan molekul CD2 dan CD16 yang merupakan reseptor Fc untuk IgG yang ada di permukaan sel NK. Setelah terjadi adesi kemudian sel NK melepaskan faktor sitotoksik seperti perforin, granzim, sitolisin seperti TNF- α , serine, protease dan proteoglikan ke dalam sel tumor melalui pori membran sel tumor yang dibentuk oleh perforin. Akhirnya sel tumor mengalami kematian secara apoptosis.^{7,8,17}

2.4.2 Peranan sitokin-sitokin pada sistem imun seluler.

Sitokin adalah peptida yang diproduksi oleh sel sebagai respon terhadap adanya berbagai rangsangan yang mengenai sel tersebut. Sitokin terutama diproduksi oleh limfosit T dan B, namun sel makrofag, granulosit, keratinosit dan beberapa sel lain dapat menghasilkan sitokin. Fungsi utama sitokin sebagai sinyal interseluler.^{7,8}

Beberapa sitokin juga mempunyai efek anti-neoplastik dan efek terhadap hematopoisis. Peranan sitokin yang berkaitan dengan respon imunologi antara lain,

1. IL-1

Fungsi IL-1 menyerupai TNF yaitu sebagai mediator respon inflamasi dalam imunitas natural penjamu. IL-1 dihasilkan oleh sel fagosit mononuklear. Pada dosis rendah efek utamanya

sebagai imunoregulator dengan meningkatkan proliferasi sel T CD4. IL-1 menstimuli berbagai jenis sel yang berfungsi sebagai efektor pada respon imun dan respon inflamasi. Pada dosis tinggi IL-1 masuk kedalam aliran darah dan berefek endokrin antara lain dapat menginduksi demam, menginduksi protein fase akut.^{7,8,39}

2. IL-2

Merupakan *growth factor* untuk sel T yang bekerja secara otokrin maupun parakrin. Kerja utama IL-2 adalah pada limfosit. IL-2 yang disintesa oleh sel T akan mengaktifkan sel limfosit Tc, makrofag, sel NK dan sel LAK dalam membunuh sel tumor.^{7,8,38}

3. IL-8

IL-8 dihasilkan oleh beberapa sel seperti sel T yang teraktivasi oleh antigen, fagosit mononuklear yang teraktivasi oleh lipopolisakrida (LPS) atau sitokin, sel endotel, sel fibroblast, sel epitel dan platelet. IL-8 merupakan aktivator dan faktor kemotaktik untuk netrofil dan hanya sedikit pengaruhnya untuk eosinofil, basofil dan limfosit. IL-8 berfungsi *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1) untuk fagosit mononuklear. IL-8 juga berfungsi sebagai mediator sekunder pada reaksi inflamasi.^{7,8}

4. IL-10

Merupakan sitokin yang berfungsi sebagai regulasi negatif ekspresi molekul MHC kelas II. IL-10 menghambat sitokin yang diproduksi oleh makrofag, misalnya TNF, IL-1 dan IL-12. IL-10 juga menghambat fungsi makrofag dalam mengaktivasi sel T.^{7,8}

5. IL-12

IL-12 bekerja sinergis dengan IL-2. IL-12 merupakan satu-satunya sitokin yang secara fungsional tidak diproduksi oleh sel T. Produksi IL-12 oleh makrofag dihambat oleh IL-10 dan IL-4. Sitokin ini sebenarnya juga merupakan regulator respon imun seluler, karena efeknya pada sel sel NK dan sel T. IL-12 merupakan aktivator paling poten untuk sel NK. Efek IL-12 menginduksi

peningkatan produksi IFN- γ oleh limfosit Th1 dan sel NK. IL-12 menstimulasi diferensiasi sel Th naive menjadi sel Th1. IL-12 bersama IFN- γ cenderung mengarahkan sel Th untuk berdeferensiasi menjadi Th1. IL-12 juga menstimulasi diferensiasi sel T CD8 menjadi matur dan berfungsi secara aktif sebagai Tc. IL-12 juga merupakan regulator untuk fase efektor respon imun seluler, karena IL-12 secara langsung mengaktifkan dan mengatur sel efektor.^{7,8,37,38}

6. TNF- α

TNF merupakan mediator prinsip untuk respon hospes terhadap gram negatif dan infeksi mikroba yang lain. Sumber utama TNF dari sel fagosit mononuklear yang diaktivasi oleh lipopolisakarida. Efek biologis dari TNF: 1. stimulasi netrofil dan monosit ke tempat infeksi dan mengaktifasi sel-sel tersebut untuk mengeradikasi mikroba. 2. TNF menstimulasi sel endotel dan makrofag untuk memproduksi sitokin yang disebut *khemokine*. 3. TNF menstimulasi fagosit mononuklear untuk memproduksi sitokin IL-1, IL-6 dan TNF. 4. TNF berperan sebagai kostimulator pada aktivasi sel T dan menstimulasi sel B untuk memproduksi antibodi. 5. TNF mempunyai efek protektif terhadap infeksi virus dan meningkatkan ekspresi MHC kelas I. Pada konsentrasi tinggi TNF merupakan pirogen endogen yang dapat meningkatkan suhu, menstimulasi fagosit mononuclear untuk selanjutnya mensekresi IL-1 dan IL-6 kedalam sirkulasi.^{7,8,39}

7 IFN- γ

Interferon dibagi atas 2 tipe: 1. Interferon tipe I terdiri dari interferon α dan β dan 2. Interferon tipe II atau interferon gamma (IFN- γ). IFN- γ dihasilkan oleh sel-sel limfosit T yang distimulasi oleh antigen atau mitogen, bersifat tidak tahan asam. Sekresi IFN- γ merupakan *hallmark* limfosit Th1, sitokin ini juga dihasilkan sebagian besar oleh sel T CD8 / Tc dan sebagian kecil oleh Th0 dan sel NK. IFN- γ juga dihasilkan oleh sel makrofag. Aktivitas sel-sel tersebut merupakan bagian dari respon imun khususnya terhadap IL-2 dan IL-12. Produksi IFN- γ dapat dihambat oleh IL-4, IL-10, TGF- β , glucocorticoid, cyclosporin A.^{8,17,38,39}

Antigen endogen dipresentasikan oleh *antigen presenting cell* (APC) ke sel Tc melalui MHC kelas I tetapi dapat juga dipresentasikan melalui MHC kelas II. Antigen dipresentasikan melalui aktivasi Th0-CD4 yang akan mengaktifkan Th1-CD4 Th1-CD4 akan memproduksi IFN- γ dan juga mempengaruhi sel NK menghasilkan IFN- γ . Meningkatkan sitolisis dari sel Tc dan sel NK, inhibisi replikasi virus, meningkatkan ekspresi reseptor IL-2.^{7,39}

IFN- γ juga merupakan aktivator poten terhadap makrofag. Sekresi IFN- γ yang tinggi akan memperbesar kemampuan aktivitas mikrobisidal dari makrofag dan memacu terbentuknya nitrik-oksida dan monokin-monokin seperti IL-1, IL-6, IL-8 dan TNF- α . IFN- γ mengaktifkan netrofil, sel NK, sel vaskuler endotelial, memperbesar efek sitotoksik dari TNF- α . Juga memacu diferensiasi sel B dan sel Tc sebagai efektor aktif terhadap kanker. Tetapi IFN- γ tidak memacu proliferasi limfosit tetapi memperbesar aktivasi sel Th1 dan menghambat produksi Th2. IFN- γ menurunkan produksi IL-4 oleh sel Th2 juga berpotensi memblok efek IL-4 pada sel B yang memacu IgG1 dan produksi IgE.³⁹

Beberapa penelitian menunjukkan IFN- γ dapat digunakan dalam pengobatan kanker. Penelitian *in vitro* di Edinburgh, Inggris pada penderita kanker ovarium diterapi dengan IFN- γ didapatkan bahwa IFN- γ dapat sebagai anti proliferasi sel kanker dan menginduksi apoptosis.⁴⁰ Penelitian di Jepang menunjukkan IFN- γ dapat diinduksi dengan pemberian enzim indoleamine 2,3-dioxygenase yang terdapat dalam plasenta manusia. IFN- γ tersebut dapat menghambat pertumbuhan sel kanker osteosarkoma, karsinoma epidermoid.⁴¹

2.5 Sel Imun Darah Tepi Penderita Kanker.

Perubahan fungsi imun sering kali dijumpai pada penderita tumor ganas termasuk tumor ganas kepala leher. Bahan mitogen dan sitokin akan menyebabkan perubahan aktivitas. Penderita tumor ganas dengan metastase, respons imun seluler (limfosit dan monosit) dalam sirkulasi darah menurun.³¹ Terjadi peningkatan progresif angka rerata ratio sel T *helper* / *cytotoxic* (TCD4/TCD8)

dengan meningkatnya stadium tumor. Rerata ratio sel TCD4/TCD8 yang tinggi dijumpai pada penderita dengan kanker stadium lanjut (stadium III dan IV) dan menunjukkan perbedaan yang signifikan bila dibandingkan dengan orang normal. Penderita dengan ratio sel TCD4/TCD8 yang tinggi menunjukkan jumlah sel limfosit TCD8 makin rendah, maka makin jelek hasil terapi dan prognosis. Tc dapat dipakai sebagai prediksi survival. Etiologi perubahan Tc masih belum jelas tetapi salah satu faktor penyebabnya adalah progresivitas penyakit.^{28,42}

Mekanisme terjadinya penurunan fungsi imunitas sel mononuklear pada penderita kanker karena terjadi gangguan pada mekanisme maturasi dan proliferasi. Sel mononuklear mengalami gangguan maturasi dan proliferasi karena monosit memproduksi PGE2 berlebihan, akibatnya PGE2 menghambat produksi IL-2 dan ekspresi IL-2R pada sel efektor NK/CD56, dan terjadilah penurunan aktivitas sel NK dan LAK.⁴³

2.6 Radikal Bebas

Radikal bebas selalu terbentuk di dalam tubuh ketika pembakaran atau reaksi oksidasi dengan oksigen, namun selalu diikuti dengan detoksikasi oleh antioksidan, sehingga oksidan dan antioksidan dalam keadaan homeostasis. Radikal bebas dapat meningkat di dalam tubuh apabila produksinya berlebihan atau antioksidan yang menurun. Kelebihan radikal bebas dapat menimbulkan bermacam-macam penyakit seperti rematik arthritis, jantung koroner, immunosupresi, penuaan dini. Akhir-akhir ini terus diupayakan menanggulangi radikal bebas dengan antioksidan yang berasal dari tumbuh-tumbuhan.⁴⁴⁻⁴⁵

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan, sehingga bersifat sangat reaktif. Elektron yang tidak berpasangan tersebut berusaha menarik elektron dari atom atau molekul lainnya. Selain itu radikal bebas mampu mengubah suatu molekul menjadi radikal bebas baru, dan jika menjumpai molekul lain, akan membentuk radikal

bebas baru kembali sehingga terjadilah reaksi berantai. Reaksi rantai tersebut baru berhenti jika radikal bebas diredam dengan kehadiran antioksidan. Jadi radikal bebas adalah suatu oksidan karena mampu menerima elektron ("*electron acceptor*") dari suatu reduktan ("*electron donor*") melalui reaksi oksidasi-reduksi. Dalam pengertian ilmu kimia, oksidan merupakan senyawa yang mempunyai kemampuan menarik elektron dari berbagai molekul, mengakibatkan terjadinya oksidasi molekul tersebut.^{44,45}

Radikal bebas endogen terbentuk pada proses respirasi seluler (metabolisme alamiah sel tubuh). Radikal bebas eksogen terbentuk pada saat detoksikasi bahan-bahan kimia seperti : obat, bahan pengawet zat pewarna buatan. Radikal bebas ini juga terbentuk dari peptisida, dan lain-lain zat toksik di lingkungan seperti asap rokok, polutan industri, sinar ultraviolet dan sinar X. Sintesis prostaglandin dan leukotrien dari asam lemak tak jenuh juga menghasilkan radikal bebas yang disebut radikal bebas sekunder.⁴⁴⁻⁴⁵

Radikal bebas yang dihasilkan oleh organisme dapat dibagi atas 2 golongan utama yaitu:

1. Spesies oksigen reaktif (SOR), beberapa radikal bebas SOR yang merugikan tubuh diantaranya derivat oksigen yaitu anion superoksida ($O^{\bullet-}$), radikal hidroksil (OH^{\bullet}), radikal peroksil (ROO^{\bullet}), alkosil (RO^{\bullet}). Radikal hidroksil merupakan radikal bebas yang paling reaktif.
2. Spesies nitrogen reaktif (SNR), beberapa radikal nitrit diantaranya: radikal nitrit oksida (NO^{\bullet}), peroksinitrit ($ONOO^{\bullet}$) dan radikal nitrat lainnya.⁴⁶

Terbentuknya oksigen-reaktif didalam tubuh berlangsung melalui rangkaian reaksi yang berantai dan berlangsung terus menerus, sama seperti radikal bebas lainnya.⁴⁶ Atom oksigen mempunyai 4 pasang elektron. Metabolisme yang terjadi pada proses respirasi seluler merampas elektron dari sebuah atom oksigen sehingga atom tersebut berubah menjadi radikal bebas yaitu atom yang mempunyai sebuah elektron tunggal. Atom ini akan berusaha mengisi elektron yang hilang dengan mengambil sebuah elektron dari atom pada dinding sel, sebuah radikal bebas baru

diciptakan yang akan menimbulkan reaksi ikatan baru. Dengan demikian terus menerus tercipta radikal bebas baru. Ikatan elektron ini merusak membran sel, dan juga mampu mengoksidasi berbagai senyawa biokimia dalam sel, seperti: lipoprotein, karbohidrat, protein enzim dan memecah asam nukleat (DNA).^{30,46}

Pengaruh radioterapi yang tidak diharapkan adalah efek biologik pada sistem imun, termasuk sistem imun terhadap tumor. Radikal bebas yang terbentuk akibat radioterapi akan memacu apoptosis pada sel kanker tetapi juga terjadi efek samping berupa apoptosis pada sel normal.¹⁴

2.6.1 Efek Radikal Bebas Terhadap Asam Arakidonat

Lipid pada membran sel terdiri dari fosfolipid, glikosfingolipid dan kolesterol. Fosfolipid merupakan unsur utama pada membran sel. Asam arakidonat terdapat dalam membran sel dan membentuk 5-15% asam lemak dalam fosfolipid.⁴⁷

Radioterapi menyebabkan terbentuknya radikal bebas oksidatif di intra maupun ekstra seluler. Radikal bebas meningkatkan konsentrasi enzim *phospholipase A2* (PLA2). Aktivitas PLA2 melalui jalur siklooksigenase akan membentuk prostaglandin E2 (PGE2) dari asam arakidonat sel kanker maupun sel makrofag. PGE2 sudah dibuktikan menghambat multifungsi sistem imun, diantaranya pada aktivitas dan proliferasi limfosit-T serta sitotoksik sel NK juga produksi IFN- γ .¹⁴ Aktivitas limfosit dihambat oleh PGE2 karena PGE2 meningkatkan *3'5' cyclic adenosine monophosphate* (cAMP), yang efeknya menghambat produksi IL-2. Disamping itu, produk gen MHC kelas II dalam sel mononuklear dan reseptor IL-2 (IL-2R) pada sel NK (CD56+) juga dihambat oleh PGE2.^{43,48,49} Konsentrasi PGE2 yang tinggi akan memacu terbentuknya TNF- α .⁴⁸

2.6.2 Efek radikal bebas terhadap Faktor transkripsi NF- κ B

Radioterapi sinar γ pada penderita KNF akan menghasilkan radikal bebas.

Radikal hidrogen peroksida sebagai radikal bebas utama akan mengaktivasi gen NF- κ B, yang merupakan suatu *oxidative stress sensitive transcription factor*. Aktivasi gen ini juga dijumpai pada pengobatan dengan *chemotherapeutic agent*, perokok dan proses inflamasi kronik pada taktus respiratorius bagian atas.⁴⁹

Transkripsi faktor NF- κ B dapat mengaktivasi sekresi IL-8 yang merupakan suatu sitokin pro-inflamasi, juga sebagai sebagai aktivator yang kuat untuk produksi sitokin IL-1 dan TNF- α . Aktivasi IL-1, IL-8 dan TNF- α akan menghambat aktivasi Th0CD4 sehingga ekspresi sel Th1CD4 menurun. Berkurangnya produksi sitokin IL-2 dan IFN- γ (sitokin profil Th1) akan mengurangi rangsangan terhadap sel TcCD8, sel NK dan makrofag sehingga respon Th1 menurun. Inhibisi transkripsi faktor NF- κ B oleh *inhibitor I kappa B-alpha (I κ B- α)* dapat meningkatkan sitokin IL-1, IL-8 dan GM-CSF. Inhibisi transkripsi faktor NF- κ B akan menghambat pertumbuhan tumor, sehingga inhibisi terhadap transkripsi faktor NF- κ B dapat digunakan untuk pengobatan kanker.⁴⁹

2.6.3 Efek radikal bebas terhadap IL-10 dan IL-12

Sel kanker yang terkena radioterapi selain memproduksi PGE2 juga menghasilkan sitokin IL-10. Radikal bebas juga akan menurunkan kadar IL-12 yang diproduksi oleh makrofag, Kadar IL-10 yang meningkat dan IL-12 yang menurun akan menghambat aktivasi Th0 CD4.¹⁴

Radioterapi yang menghasilkan radikal bebas akan menekan komponen sistem pertahanan seluler (set NK, Tc dan makrofag), akibatnya sistem pertahanan tubuh terutama jalur Th1 untuk iradikasi sel tumor menurun. Efek biologi radikal bebas dapat dihambat oleh antioksidan dengan cara menetralkan atom atau elektron tunggal yang reaktif.

2.7 Antioksidan

Antioksidan merupakan substansi yang dapat menghambat radikal bebas. Secara ilmu kimia adalah senyawa-senyawa pemberi elektron (*electron donor*) namun dalam arti biologis pengertian antioksidan yaitu semua senyawa yang dapat meredam dampak negatif oksidan.

Antioksidan menghambat kerja radikal bebas dengan cara menyerahkan elektron dari atomnya kepada radikal bebas untuk berikatan dengan elektron yang tidak berpasangan (tunggal) dari radikal bebas tanpa menjadi radikal bebas baru.^{44,45}

Antioksidan berdasarkan zat pembentuk dapat digolongkan atas antioksidan enzimatik dan non enzimatik. Yang termasuk dalam golongan enzimatik adalah Superoxidedismutase (SOD), glutathione dismutase, sedangkan yang termasuk non enzimatik adalah β -karoten, askorbat, α tokoferol dan *polyphenols*.⁴⁴ Dari penelitian-penelitian dikatakan *polyphenols* merupakan suatu antioksidan 25 – 100 kali lebih poten dibanding dengan vitamin C dan vitamin E.⁹

2.7.1 *Polyphenols* teh hijau

Senyawa *polyphenols* dapat dijumpai di daun teh (*Camellia sinensis*) dan sayuran seperti brokoli, anggur dan kole. Tanaman teh dipelihara sebagai semak-semak yang dipanen kuncup dan dua daun pertama. Ada beberapa macam teh diantaranya yaitu teh hijau dan teh hitam. Masing-masing teh ini mempunyai ciri tersendiri seperti warna, rasa, aroma dan manfaat untuk kesehatan. Hal ini disebabkan karena adanya perbedaan komposisi unsur kimia yang terbentuk ketika pengolahan. Teh hijau mengandung beberapa unsur kimia yang mudah larut di air.^{12,13}

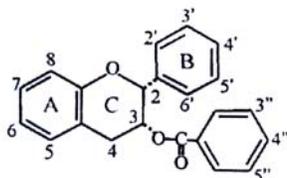
Teh hijau mengandung senyawa *polyphenols* yang terdiri dari flavonol, flavandioli, flavanoida dan asam fenolat yang diperkirakan 30% dari berat kering daun teh. Umumnya senyawa *polyphenols* di dalam teh hijau adalah kelompok flavonol yang dikenal sebagai *catechins*. Senyawa *polyphenols* (*polyphenolic-based compounds*) teh hijau terdiri dari *catechins* sekitar 30 – 42% dan unsur-unsur lain. (tabel 3.1). *Catechins* berdasarkan ikatan hidroksil dan gugus ester gallate mempunyai derivat dengan konsentrasi yang berbeda yaitu *epicatechin* (EC) 8,01%, *epigallocatechin* (EGC) 27,65%, *epicatechin gallate* (ECG) 12,48%, dan *epigallocatechin gallate* (EGCG) 51,86%.^{45,50}

Tabel 3.1 Komposisi unsur kimia dalam teh hijau⁵⁰

No.	Senyawa	Teh hijau
1	<i>Catechins</i>	30-42%
2	<i>Phenolic acids and depsides</i>	2%
3	<i>Flavanols</i>	2%
4	<i>Other polyphenols</i>	6%
5	<i>Methyl xanthines</i>	3-6%
6	<i>Amino acids</i>	6%
7	<i>Peptides/protein</i>	6%
8	<i>Organic acids</i>	2%
9	<i>Carbohydrate</i>	11%
10	<i>Minerals/ash</i>	10-13%

2.7.2 Struktur kimia *polyphenols* teh hijau

Struktur kimia *catechins* mempunyai struktur dasar 3 cincin karbon masing-masing disebut cincin A, B dan C. Pada cincin B terdapat ikatan hidroksil yang dapat terdiri dari *ortho-dihydroxy catechol* (3,4 -OH) atau *ortho-trihydroxypheyl catechol* (3,4,5 -OH) sedangkan pada karbon C dapat terdapat ikatan gugus *gallate moiety esterified*.

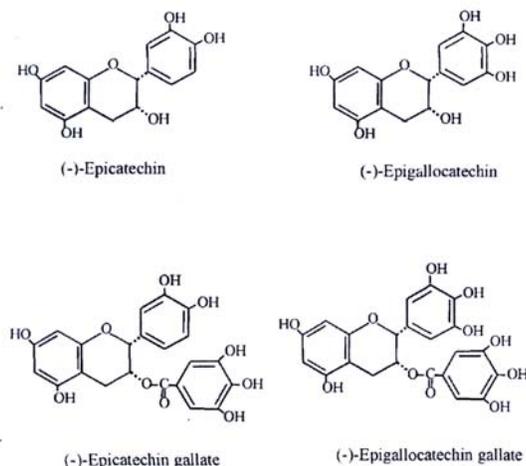


Gambar 3.1 Struktur kimia *catechin* pada teh hijau

Pada masing-masing cincin ikatan karbon diberi nomor sesuai urutannya, misalnya pada cincin B diberi nomer 1 sampai 6, dan cincin A dan C 1 sampai 8. (gambar 3.1) ⁹

Struktur kimia EC, terdapat *ortho-dihydroxy* di cincin B pada karbon 3' dan 4' juga terdapat gugus hidroksil pada karbon 3' pada cincin C. Struktur kimia EGC mempunyai *ortho-trihydroxyl* di cincin B pada karbon 3', 4' dan 5' dan gugus hidroksil pada karbon 3' pada cincin C. Struktur kimia ECG mempunyai *ortho-dihydroxy* di cincin B pada karbon 3' dan 4' serta gugus ester *gallate* pada karbon nomor 3 di cincin C. Struktur kimia EGCG mempunyai *ortho-trihydroxyl* di cincin B

pada karbon 3',4' dan 5' sedangkan pada cincin C terdapat gugus ester *gallate* pada karbon 3'.
(gambar 3.2)⁹



Gambar 3.2 Struktur kimia derivat *catechins* dalam teh hijau.

Efek antioksidan ditentukan oleh kemampuan *polyphenols* mendonorkan elektron dari struktur ortho-dihidroxy dan trihidroxy pada cincin B serta gugus ester gallate pada cincin C.⁹

Kekuatan antioksidan EGCG terhadap PUFA yang paling kuat dibandingkan derivat *catechins* lainnya.^{50,51} EGCG dapat mewakili derivat *catechins* dalam *polyphenols* berdasarkan perbedaan kekuatan antioksidan, kemampuan menghambat karsinogenesis, efektivitas sebagai kemopreventif dan anti-imunosupresi.⁹

Respons dari masing-masing derivat *catechin* pada macam-macam sistem biologi berbeda, hal ini ada dihubungkan dengan *bioavailability* dari masing-masing derivat tersebut. Farmakokinetik *polyphenols* menunjukkan setelah diserap oleh usus *catechin* didalam plasma dalam bentuk konjugat dengan *glucuronide sulfate* (>80%). Bentuk konjugat umumnya lebih hidrofilik dan distribusinya dalam tubuh lebih terbatas dari pada catechin aslinya. Walaupun aktivitas antioksidan dari bentuk konjugat *glucuronide sulfate* belum diketahui tetapi kapasitas antioksidan masih seperti aslinya.⁹

Setelah mengkonsumsi ekstrak murni 1,5 mmol EGCG, EGC dan ECG, konsentrasi

masing-masing *catechin* berbeda didalam darah. ECG paling lambat (4 jam) mencapai kadar puncak, EGCG mencapai kadar puncak setelah 2,9 jam sedangkan EGC paling cepat mencapai kadar puncak setelah 1,4 jam. Waktu paruh ($t_{1/2}$) dari masing-masing jenis *catechins* juga berbeda, ECG hampir 7 jam, EGCG hampir 4 jam dan EGC 1,7 jam. Disimpulkan konsentrasi puncak *catechins* didalam plasma antara 1½ – 3 jam pasca konsumsi *catechins* dan dalam 24 jam tidak dijumpai semua derivat *catechins* didalam plasma darah.^{9,50-52}

Individu yang mengkonsumsi teh hijau berulang dapat meningkatkan konsentrasi dan mempertahankan *polyphenols* di jaringan tetap tinggi. Minum teh hijau di atas 1 L (5 *cups*/hari) dapat melindungi tubuh dari timbulnya kanker. Diperkirakan minum teh hijau tiga *cups* (300 ml) tiap hari, sama dengan mengkonsumsi antara 240 – 320 mg *polyphenols*. Dalam 100 ml teh hijau mengandung antara 50 – 100 mg *polyphenols*. Mengkonsumsi satu tablet EGCG (400 mg) dapat menaikkan konsentrasi EGCG plasma darah sebesar 2 $\mu\text{mol/L}$.⁵³⁻⁵⁶

Penelitian di Milan Italia menilai efek pencegahan *oxidative damage* oleh EGCG pada *Jurkat cells* yang mendapat suplemen EGCG. Dengan konsentrasi EGCG 15 $\mu\text{mol/L}$ secara signifikan meningkatkan pertahanan sel terhadap peroksidasi lemak dan kerusakan DNA. Penelitian tersebut mendukung efek *catechins* ekstrak teh hijau 10 $\mu\text{mol/L}$ dapat mencegah kerusakan oksidatif sel limfosit. Derivat *catechin* lainnya (EGC dan EC) dapat meningkatkan efek EGCG.^{11,55}

Saat ini belum dijumpai literatur yang melaporkan efek samping karena minum teh hijau, ekstrak teh hijau atau salah satu derivatnya seperti EGCG. Dengan mengkonsumsi kapsul *polyphenols* ekstrak teh hijau 800 mg dan EGCG 800 mg per hari selama seminggu pada orang sehat, tidak dijumpai efek samping.⁵⁰

2.7.3 Efek biologi *polyphenols* teh hijau

Penelitian yang dilakukan pada manusia maupun hewan dengan metode kohort dan kasus-kontrol maupun penelitian laboratoris *in vitro* dan *in vivo* membuktikan bahwa *polyphenols*

mempunyai manfaat yang signifikan sebagai kemopreventif terhadap kanker, anti-imunosupresi dan anti-inflamasi.^{16,53} Hal ini karena *polyphenols* mempunyai kapasitas sebagai: (1) mencegah mutagenositas dan genotoksisitas, (2) menghambat perubahan biokimia di tingkat permulaan dan perkembangan tumor, (3) efek pada enzim detoksikasi, (4) menangkap bahan metabolik aktif karsinogen dan (5) aktivitas antioksidan dan pengais radikal bebas.^{16,52,53}

Polyphenols digolongkan sebagai suatu kemopreventif yang ideal dengan beberapa alasan antara lain: (1) Tidak mempunyai efek samping, (2) Mempunyai efikasi yang tinggi melalui *multiple sites*, (3) Efektif pada dosis terapi, (4) Dapat diberikan melalui pemberian oral, (5) *Mechanism of action* yang jelas, (6) Murah, (7) Mempunyai riwayat digunakan secara masal dan dapat diterima oleh masyarakat.⁵³

Mekanisme molekuler efek *polyphenols* dijelaskan seperti dibawah ini:

1. *Polyphenols* menginduksi apoptosis dan menghentikan siklus sel kanker

Apoptosis adalah suatu proses fisiologi untuk mempertahankan sistem kehidupan tetap dalam keadaan homeostasis. Apoptosis dapat diartikan sebagai kematian sel terprogram. Penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa *polyphenols* atau derivatnya EGCG, EGC dan ECG menginduksi apoptosis dan menghentikan siklus sel.^{54,55} Efek menginduksi apoptosis hanya terjadi pada sel kanker sedangkan pada sel normal tidak. Hal ini telah dibuktikan pada beberapa jenis sel kanker manusia yang tumbuh di berbagai macam organ, di antaranya sel karsinoma keratinosit HaCaT, sel DU145 karsinoma prostat, sel H661 dan H1299 kanker paru, kanker kolon, sel LY-R limfoma tikus dan juga pada sel normal epidermis berkeratin.^{11,54} Respons apoptosis makin besar dengan meningkatnya dosis *polyphenols* atau derivat-derivatny (EGCG, EGC dan ECG). Perbedaan mekanisme respons apoptosis antara sel terinfeksi virus dengan sel normal adalah *polyphenols*

meningkatkan ekspresi gen c-fos dan c-myc di sel yang mengalami transformasi oleh virus dan memacu untuk apoptosis, sedangkan hal ini tidak terjadi pada sel normal.

Polyphenols mencegah pertumbuhan sel kanker, menghentikan siklus sel pada fase GO/G1.¹¹ Efek tersebut terjadi karena *polyphenols* menghambat aktivitas beberapa enzim seperti protein kinase C, urokinase, induksi terbentuknya H2O2 dan gen TNF- α dan makin tinggi dosis *polyphenols* makin kuat efeknya.^{54,55}

2. *Polyphenols* mencegah kerusakan sel imunologis akibat stres oksidatif

Sel limfosit dan makrofag yang mengalami stres oksidatif, terjadi peningkatan produksi spesies oksigen reaktif (SOR). Sel mempunyai sistem perlindungan terhadap SOR yang terdiri dari antioksidan enzimatik dan non enzimatik, tetapi karena SOR berlebihan, akan menimbulkan kerusakan. *Polyphenols* adalah antioksidan yang mengikat SOR.⁹

Dampaknya dari SOR adalah menimbulkan perubahan pada molekul seluler, morfologi dan ketahanan hidup sel, perubahan tersebut terjadi pada DNA. *Polyphenols* mencegah kerusakan DNA yang disebabkan oleh SOR dengan cara peroksidasi PUFA dari fosfolipid sel membran dengan mekanisme mengikat radikal bebas hidroksil. Radikal bebas hidroksil meningkatkan aktivitas enzim *phospolipase A2* (PLA2), efeknya pemecahan PUFA menjadi asam arakidonat meningkat. Selanjutnya asam arakidonat dimetabolisme di jalur siklooksigenase menghasilkan PGE2 dan di jalur lipoksigenase menghasilkan leukotrien. PGE2 adalah hormon lokal yang menimbulkan inflamasi dan leukotrien sebagai kemotaktik sel radang.⁵⁰

PGE2 dan kemotaktik faktor menyebabkan inflamasi di tempat lesi. Peroksidasi LDL dapat menyebabkan sel lisis. *Polyphenols* mencegah peroksidasi LDL, menurunkan produksi PGE2 dan kemotaktik faktor, sehingga kerusakan sel tidak terjadi.^{9,51,56} SOR menyebabkan produksi sitokin yang berperan dalam proses inflamasi pada sel limfosit dan monosit meningkat. *Polyphenols* menurunkan produksi sitokin inflamasi sebab melemahkan aktivitas *nuclear factor kappa B* (NF-

κ B). Peran NF- κ B menstimuli gen-gen yang memproduksi mediator inflamasi. Mediator tersebut adalah sitokin (misalnya IL-1, TNF- α , IL-8), enzim *inducible nitric oxide syntahse* (iNOS), molekul adesi dan protein fase akut.¹¹ Pada infeksi akut atau kronik produksi IL-1, TNF- α , IL-6 dan IL-8 meningkat. Di antara mediator tersebut di atas, TNF- α adalah sitokin yang memegang peran sangat penting pada proses inflamasi, misalnya pada patofisiologi syok dan kerusakan jaringan karena infeksi bakteri.¹⁴ Sel makrofag/ monosit penghasil utama TNF- α in vivo. Produksi TNF- α dikendalikan oleh aktivitas gen TNF- α di bawah kontrol NF- κ B. *Polyphenols* dapat mengikat radikal bebas yang menstimulasi aktivitas NF- κ B, akibatnya tidak ada faktor yang menstimuli gen TNF- α sehingga produksi TNF- α dan sitokin lainnya menurun.⁴⁹

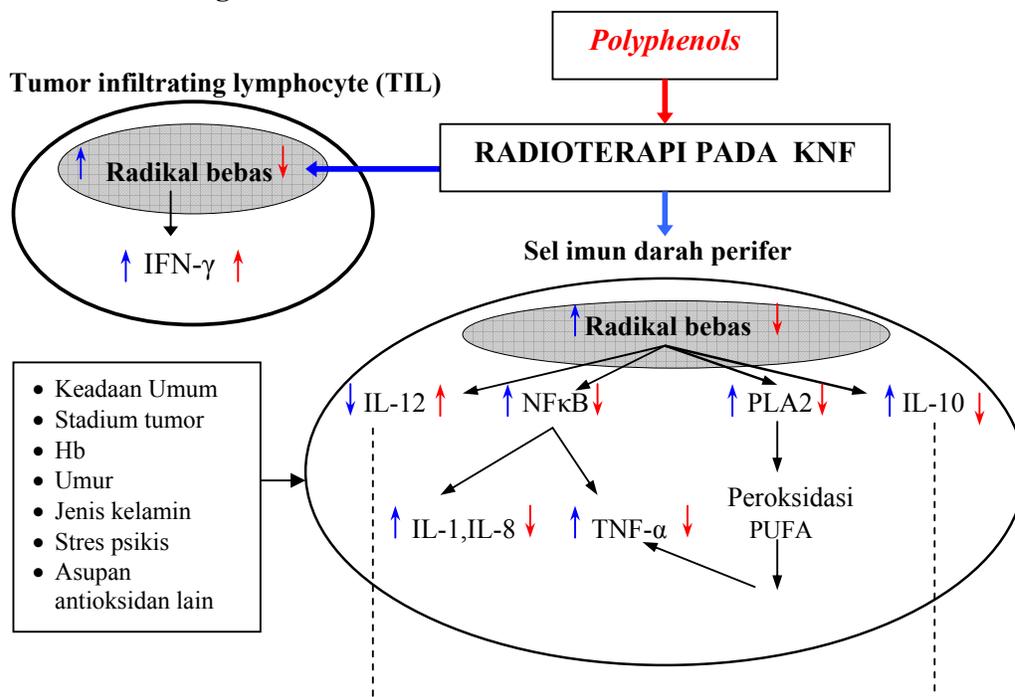
3. *Polyphenols* mencegah penyebaran tumor

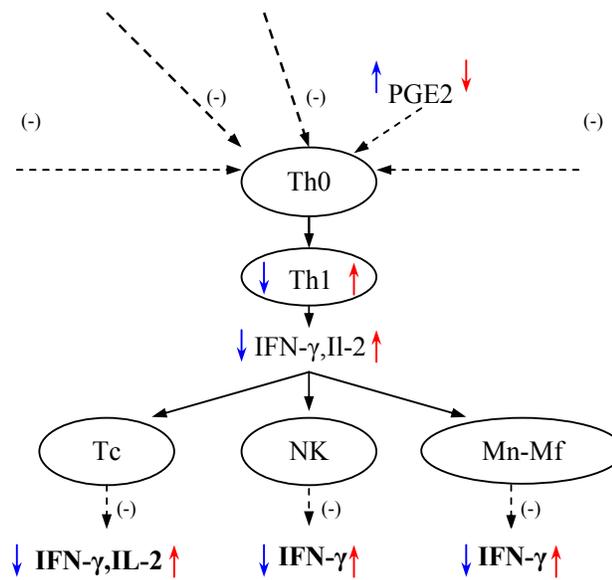
Polyphenols selain dapat mencegah radikal bebas yang menimbulkan immunosupresi, juga mampu mencegah perkembangan tumor dengan mekanisme mencegah angiogenesis. Perkembangan semua tipe tumor ditentukan angiogenesis, penyebaran dan metastasis akan mengalami gangguan apabila angiogenesis dirusak atau disupresi.¹⁶

Vascular endothelial growth facctor (VEGF) adalah sitokin yang berikatan dengan *vascular endothelial growth factor receptors* (VEGFRs), memainkan peranan penting dalam angiogenesis tumor. Penelitian in vitro pada hewan juga pada sel karsinoma kolon manusia bahwa VEGF dicegah oleh EGCG dalam menimbulkan angiogenesis, sehingga tidak terjadi perkembangan sel endotel kapiler. Hal ini karena fungsi VEGF yang menyebabkan fosforilasi tirosin pada VEGFR-2, dicegah oleh *polyphenols*. Pencegahan ini khusus dilakukan oleh ECG, CG dan EGCG, karena tes dengan *catechins* lain tidak ada efek. Dilaporkan *catechins* teh hijau merupakan penghambat yang baik sekali aktivita fosforilasi tirosin VEGFR-2. Konsentrasi antara 0,01 – 1 μ M dari *epigallocatechin -3 gallate*, *catechin-3 gallate* dan *epicatechin-3 gallate* merupakan inhibitor yang poten aktivitas VEGFR-2.⁵⁵

sel mononuklear akan membentuk radikal bebas. Radikal bebas akan mensupresi gen yang akan memproduksi IFN- γ sehingga kadar IFN- γ yang diproduksi oleh sel mononuklear akan menurun. IFN- γ yang terdapat didalam serum darah tepi dan TIL juga akan terjadi penurunan akibat kadar radikal bebas yang meningkat karena radioterapi. *Polyphenols* yang diberikan bersama radioterapi akan menetralkan radikal bebas baik di sel mononuklear darah tepi maupun TIL sehingga penurunan produksi kadar IFN- γ akibat radioterapi dapat dihambat.

2.9 Patofisiologi





- : Memacu
- /(-) : Menghambat
- (red) : *Polyphenols* teh hijau
- Tc : Sel T sitotoksik
- Mn-Mf : Sel monosit-Makrofag
- NK : Sel *Natural killer*
- ↑ ↓ (blue) : Kadar sitokin dan radikal bebas akibat pengaruh radioterapi
- ↑ ↓ (red) : Kadar sitokin dan radikal bebas akibat pengaruh *polyphenols* teh hijau
- ← (blue) : Sinar radioterapi
- (grey) : Nukleus sel

Penjelasan Bagan Patofisiologi:

Radiasi sinar X atau sinar pengion bertujuan mengeradikasi sel tumor tetapi dapat mengenai sel normal. Ionisasi H₂O didalam nukleus dan sitoplasma menghasilkan radikal bebas OH[•] yang merusak gen pengatur produksi IFN-γ. Radiasi yang merupakan stresor imunogenik menyebabkan sel imun mengalami stres. Radikal bebas meningkatkan aktivitas gen NF-κB dan memacu gen-gen yang memproduksi sitokin proinflamasi, diantaranya IL-1, IL-6, TNF-α. Konsentrasi sitokin tersebut meningkat maka sel tersebut mengalami inflamasi.

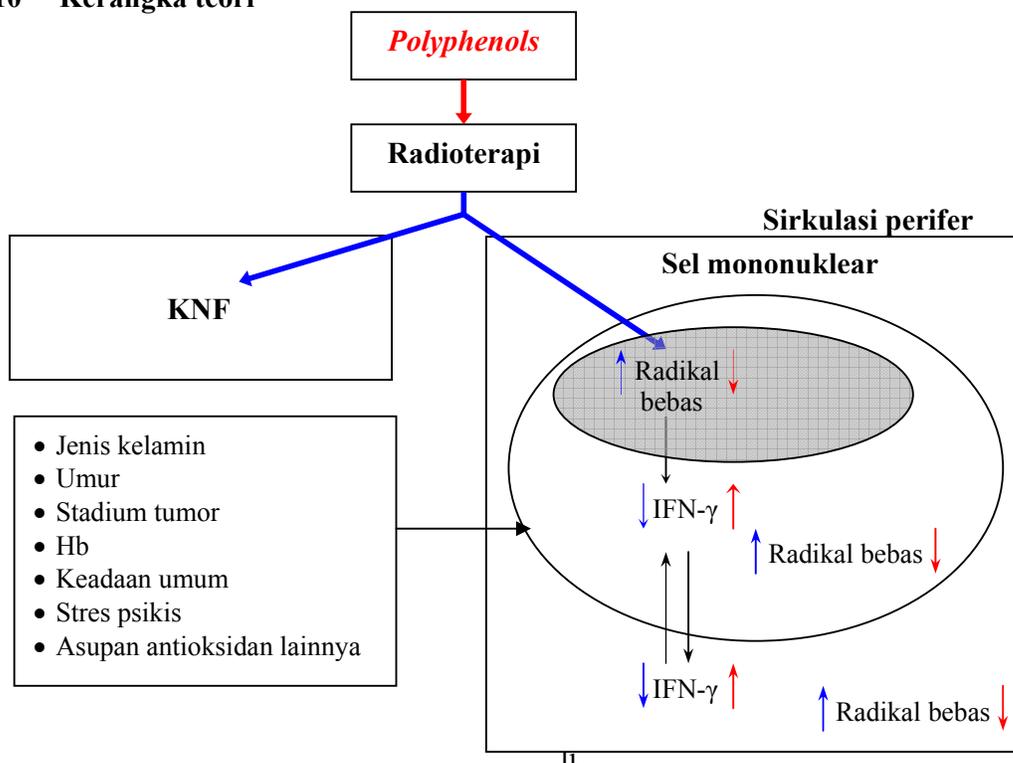
Makrofag yang stres akibat radikal bebas akan memacu memacu meningkatkan aktivitas PLA2. Peran PLA2 sebagai mediator metabolisme PUFA akan ditingkatkan oleh radikal bebas dan menghasilkan PGE2. PGE2 meningkatkan aktivitas TNF-α yang akan menghambat aktivasi sel Th1. Radikal bebas memacu meningkatkan produksi IL-10, tapi menghambat produksi IL-12. Kadar sitokin IL-12 yang menurun dan IL-10 yang meningkat akan menekan aktivitas proliferasi

limfosit Th0 menjadi Th1 yang juga menekan produksi IFN- γ dan IL-2 oleh Th1. IL-2 mempunyai pengaruh parakrin terhadap sel Tc, NK dan makrofag tetapi juga autokrin. Dengan menurunnya IFN- γ dan IL-2 maka aktivitas sel Tc, sel NK dan makrofag-monosit juga menurun. Sel mononuklear, limfosit serta makrofag yang memproduksi sitokin IFN- γ tersebut juga menurun.

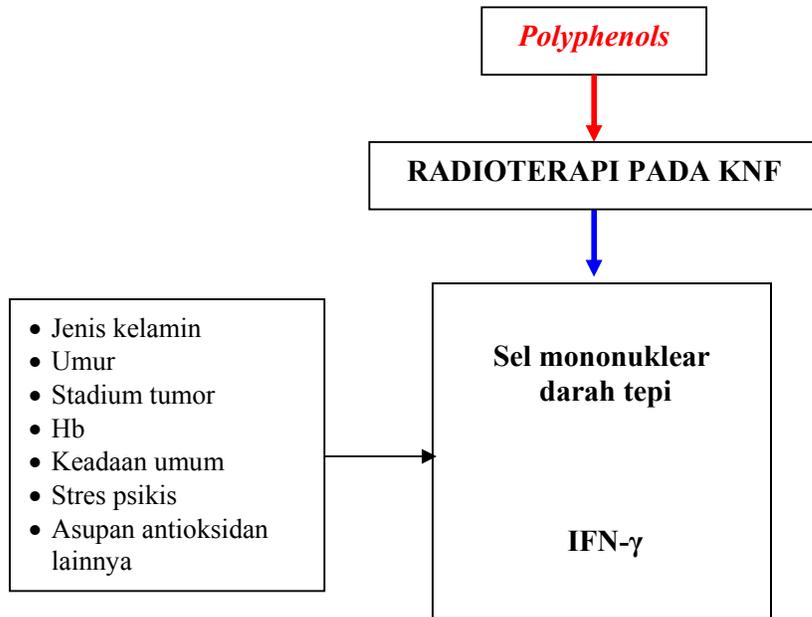
Polyphenols merupakan imun-modulator dengan cara *scavenger* radikal bebas OH sehingga diharapkan dengan pemberian *polyphenols* akan menurunkan NF- κ B yang akan menyebabkan penurunan kadar IL-1, IL-8 dan TNF- α . *Polyphenols* akan menghambat enzim PLA2 yang akan menyebabkan pembentukan PGE2 dari PUFA akan menurun. PGE2 yang menurun akan menghambat produksi TNF- α . *Polyphenols* akan meningkatkan kadar IL-12 tapi akan menurunkan kadar IL-10.

Polyphenols akan meningkatkan aktivasi dan proliferasi sel Th0 ke Th1, sitokin IFN- γ dan IL-2 akan meningkatkan aktivitas sel Tc, NK dan makrofag dalam memproduksi IFN- γ . Variabel pengganggu yang dapat mempengaruhi produksi IFN- γ oleh sel mononuklear adalah stadium tumor, umur, stres psikis, kadar Hb dan asupan antioksidan lain.

2.10 Kerangka teori



- : Radioterapi
 - : Nukleus sel
 - ↕ : Kadar sitokin dan radikal bebas akibat radioterapi
 - ↕ : Kadar sitokin dan radikal bebas akibat *polyphenols*
- 2.11 ~~Kerangka konsep~~ : *Polyphenols* teh hijau



2.12 Hipotesis

Sebagai jawaban sementara dari masalah penelitian maka dirumuskan hipotesis kerja sebagai berikut:

Pemberian *polyphenols* teh hijau bersama radioterapi menghambat penurunan produksi IFN- γ oleh sel mononuklear darah tepi pada penderita KNF.

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini bertujuan mempelajari pengaruh *polyphenols* terhadap produksi IFN- γ oleh sel mononuklear pada penderita KNF yang mendapat radioterapi. Jenis penelitian adalah eksperimental *randomized pre-post test control group design*. Dengan rancangan seperti ini akan dapat diketahui perubahan yang terjadi akibat perlakuan. Pemberian obat dilakukan dengan tehnik buta ganda. Kemudian diamati perubahan yang terjadi pada kelompok perlakuan (radioterapi + *polyphenols*), dibanding dengan kelompok kontrol (radioterapi + plasebo). Penelitian yang akan dilakukan adalah mengukur kemampuan *polyphenols* dalam meningkatkan produksi IFN- γ oleh sel mononuklear akibat radioterapi pada KNF.

3.2 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di klinik dan bangsal Ilmu Kesehatan THT-KL, klinik dan bangsal Radioterapi, Laboratorium Patologi Klinik dan Laboratorium Bioteknologi RS dr. Kariadi Semarang.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi target dan populasi terjangkau.

Populasi target dari penelitian ini adalah semua penderita KNF, sedangkan populasi terjangkau adalah semua penderita KNF yang datang berobat di klinik (IRJ) THT-KL RS dr. Kariadi Semarang.

3.3.2 Sampel

Sampel penelitian ini merupakan populasi terjangkau yang datang berobat di klinik (IRJ) THT-KL RS dr. Kariadi Semarang.

a. Kriteria inklusi:

Kriteria penerimaan sampel merupakan persyaratan umum yang harus dipenuhi agar dapat diikuti sertakan dalam penelitian yaitu:

1. Penderita KNF stadium II-IV, karena pada umumnya penderita berobat sudah stadium lanjut.
2. Pada foto torak dan USG abdomen tidak ditemukan metastasis.
3. Jenis histopatologi (PA) berupa karsinoma WHO tipe 2 dan WHO tipe 3, disebabkan karena tipe ini paling sering ditemukan dan mempunyai kepekaan terhadap radioterapi yang relatif sama
4. Usia 15 – 60 tahun. Dipilih rentang umur ini karena frekuensi KNF terbanyak 80%, dan sistem imun sudah melewati masa perkembangan sehingga relatif stabil.
5. Kadar Hb \geq 10 gr %, hitung leukosit 4.000 – 11.000sel/mmk, sedangkan kadar albumin serum masih dalam batas normal ($>$ 3,0 gr %) dengan metoda elektroforesis.
6. *Karnofsky performance status scale (status Karnofsky) \geq 60%.*
7. Bersedia ikut dalam penelitian sampai selesai dengan menanda tangani *informed consent*.
8. Tidak pernah mendapat radioterapi atau tidak sedang mendapat terapi obat yang dapat mempengaruhi fungsi imunitas seluler, misalnya hormon, sitostatika dan kortikosteroid.
9. Tidak menderita penyakit atau kelainan yang dapat mempengaruhi respons ketahanan tubuh, misalnya penyakit pada sistem imunologi infark jantung dan otak, TBC paru, DM, sepsis dan infeksi atau kelainan berat lainnya.

b. Kriteria eksklusi

Kriteria dikeluarkannya pasien dari sampel penelitian apabila selama penelitian sedang berlangsung ditemukan:

1. Penderita meninggal dunia
2. Penderita mengundurkan diri dari penelitian

3. Penderita *drop-out* akibat komplikasi pengobatan.
4. Keadaan umum penderita memburuk selama mengikuti radioterapi (status *Karnofsky* < 60, albumin < 3,0 mg%, hb < 10 gr%).
5. Mendapat terapi lain selama terapi radiasi.
6. Mendapat transfusi darah selama menjalani radioterapi.

3.4 Besar Sampel

Penentuan besar sampel penelitian ini menggunakan rumus terhadap 2 kelompok independen sebagai berikut:

$$n_1 = n_2 = 2 \left(\frac{(Z\alpha + Z\beta) \cdot S}{(X_1 - X_2)} \right)^2$$

Keterangan:

n	=	besar sampel.
α	=	tingkat kemaknaan = 0,05.
$Z\alpha$	=	1.960. $Z\beta = 0.842$
S	=	simpang baku respon terapi.
$x_1 - x_2$	=	beda respon terapi.

Berdasarkan studi pendahuluan diperoleh simpang baku 537,97, perbedaan kadar IFN- γ = 500 pg/ml dianggap berarti, maka dengan $\alpha = 0,05$ dan *power* = 80% didapat $Z\alpha = 1.960$, $Z\beta = 0.842$, $S = 537,97$, $x_1 - x_2 = 500$. Didapatkan jumlah sampel satu kelompok (n) sebesar 18,17 dibulatkan sebesar 18. Dengan perhitungan *drop out* 10%, maka jumlah sampel masing-masing kelompok kurang lebih 20.

3.5 Tehnik Pengambilan sampel

Penderita KNF yang telah memenuhi kriteria penelitian, baik inklusi maupun

eksklusi akan diikuti sebagai sampel penelitian. Selanjutnya dibagi secara randomisasi blok menjadi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

3.6 Variabel Penelitian

Untuk memecahkan permasalahan berdasarkan konsep yang diajukan diperlukan penjabaran konsep dalam bentuk variabel dengan besaran terukur.

3.6.1 Klasifikasi variabel penelitian

a. Variabel bebas

yaitu radioterapi dan *polyphenols* teh hijau.

b. Variabel pengganggu

yaitu: Jenis kelamin, stadium tumor, umur, keadaan umum, kadar hemoglobin, stres psikis dan asupan antioksidan lainnya.

c. Variabel tergantung

yaitu: kadar IFN- γ yang diproduksi oleh sel mononuklear darah tepi.

3.6.2 Definisi operasional variabel

Batasan operasional dari variabel penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Radioterapi adalah pengobatan dengan sinar elektromagnetik yang menimbulkan ionisasi pada sel atau jaringan yang dilaluinya. Pada penelitian ini digunakan sinar γ berasal dari pesawat Cobalt 60. Radioterapi diberikan dengan dosis 200 cGy per fraksi/hari selama 5 hari per minggu, pada hari Sabtu dan Minggu libur, dilanjutkan sampai mencapai dosis total sekitar 6600 cGy dalam 6-7 minggu.
2. *Polyphenols* teh hijau adalah senyawa kimia termasuk flavan-3-ol yang berasal dari tumbuh teh hijau mempunyai efek anti oksidan.
3. Kelompok perlakuan adalah kelompok yang mendapat perlakuan dengan kapsul *polyphenols* dan radioterapi. Kapsul *polyphenols* teh hijau diberikan tiap pagi dan sore. Kapsul ”

Decaffeinated” MEGA GREEN TEA EXTRACT 95% Polyphenols Green Tea Supplement

diproduksi oleh *Life Extension Foundation Bayers Club Inc. Ft Lauderdale, Florida.*

Dalam tiap kapsul berisi green tea decaffeinated extract powdered (leaf) 725 mg yang terdiri dari:

- *epigallocatechin gallate* 246,5 mg
- *others polyphenols* 427,75 mg
- *waters and gelatins*

Dosis yang diberikan pada kelompok perlakuan adalah 4 kapsul pagi dan 4 kapsul sore. Jadi setiap kali minum 4 kapsul teh hijau sama dengan mengonsumsi *epigallocatechin gallate* 986 mg dan *others polyphenols* 1711 mg. Total EGCG yang dikonsumsi dalam sehari 1972 mg.

Dalam penelitian ini digunakan bentuk kapsul *Green Tea Extract 95% polyphenol dan decaffeinated*, dengan pertimbangan:

- a. Ekstrak teh hijau seperti yang dikonsumsi oleh setiap orang.
 - b. *Decaffeinated* dengan tujuan menghindari efek samping *cafein*.
 - c. Diantara senyawa *polyphenols* yang mempunyai efek antioksidan utama adalah *Epigallocatechin gallate (EGCG)*, sedangkan derivat catechin EC, EGC, EGC dan senyawa *polyphenols* lainnya yang ada dalam teh hijau hanya kecil dan belum diteliti efektivitasnya. Dengan demikian, dalam penelitian ini yang digunakan sebagai dasar untuk menentukan antioksidan adalah EGCG.
4. Kelompok kontrol adalah kelompok yang mendapat plasebo dengan radioterapi. Kapsul plasebo berisi glukosa diminum 4 kapsul pagi dan 4 kapsul sore hari. Kapsul plasebo diberikan sejak hari pertama radioterapi sampai dengan hari terakhir radioterapi 6-7 minggu.
 5. Umur dalam penelitian ini adalah umur 15 sampai 60 tahun.
 6. Kadar albumin dalam penelitian ini > 3 gr%.

7. Jenis patologi anatomi yang digunakan dalam penelitian ini adalah WHO 2 dan WHO 3
8. Kadar IFN- γ adalah konsentrasi yang timbul karena menurunnya aktivitas sel mononuklear akibat radioterapi dan dapat dihambat penurunannya oleh *polyphenols*.

3.7 Bahan Penelitian

Bahan yang akan diteliti diambil darah dari vena cubiti sebanyak 5 ml pada saat:

- a. Sebelum minum kapsul *polyphenols* atau plasebo dan radioterapi
- b. Hari terakhir pasca radioterapi.

Bahan penelitian diambil dari *vena cubiti* dengan pertimbangan:

- Sel mononuklear darah tepi yang menerima paparan radioterapi, mengalami penurunan aktivitas imunologis tetapi masih dapat kembali normal.
- *Polyphenols* ekstrak teh hijau mudah sekali diabsorpsi oleh mukosa usus.
- Pemberian per oral *polyphenols* dalam 1½–3 jam sudah dicapai kadar tinggi *polyphenols* dalam darah, dengan waktu paruh EGCG 4 jam, kemudian menurun terus, sesudah 24 jam sudah tidak ditemukan didalam darah.
- *Polyphenols* ekstrak teh hijau dalam satu jam sudah menimbulkan efek pada sel limfosit.

3.8 Instrumen penelitian

Penelitian membutuhkan alat pemeriksaan sebagai berikut:

1. Alat-alat untuk mengambil darah. Semprit yang sebelumnya diisi heparin 50 unit/ml dan sentrifugasi.
2. CO₂ inkubator, 37C, 5% CO₂, kelembaban 100%, dengan panci gelas untuk air dengan 0,1% SDS atau detergent lain didasarnya untuk meminimalkan kontaminasi.
3. Pipet dari ukuran 10 -100 ml dan 100 – 1000ml
4. *Laminar flow hood* atau *clean work bench*
5. Freezer -70C

6. LPS (*E. Coli* 026:b6): Sigma, *catalog number* L 2654
7. Medium (RPMI 1640 medium)
8. Pen/Strep/L-glutamine solution
9. *Human IFN- γ ELISA Kit*, dibeli dari ANOGEN, 2355 Derry Road East, Unit 23 Mississauga, Ontario Canada L5S 1V6

3.9 Cara Kerja

Untuk memperoleh data yang diperlukan maka setiap penderita KNF yang menjadi sampel akan menjalani pemeriksaan:

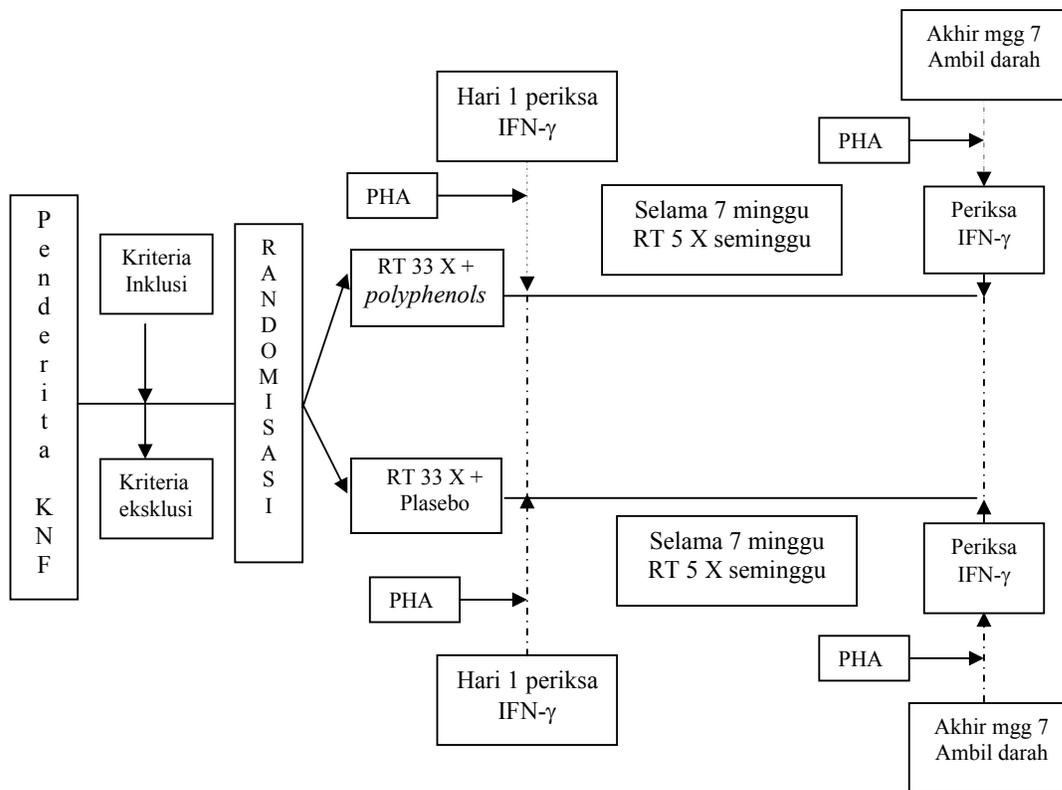
1. Pemeriksaan rutin THT-KL, pemeriksaan nasofaring dengan endoskopi, biopsi untuk menentukan jenis KNF.
2. Pemeriksaan CT scan nasofaring dengan atau tanpa kontras untuk menentukan lokasi, luas untuk menentukan pemberian dosis radioterapi.
3. Pemeriksaan Hb, leukosit, trombosit, albumin sebelum radioterapi.
4. Untuk menentukan adanya metastase jauh dilakukan pemeriksaan pemeriksaan X-foto torax dan USG abdomen bila ada keluhan nyeri tulang perlu dilakukan *bone survey*.
5. Konsul bagian mata, gigi dan neurologi untuk memastikan adakah kontra indikasi pemberian radioterapi dan mengurangi efek samping akibat radiasi.
6. Pasien dikonsulkan ke bagian radioterapi untuk untuk dilakukan terapi radioterapi
7. Pasien yang memenuhi kriteria inklusi dilakukan random blok untuk menentukan kelompok perlakuan dengan *polyphenols* atau kontrol.
8. Setiap penderita diambil 5 CC darah dari vena kubiti dengan semprit steril. Sebagian untuk pemeriksaan jumlah lekosit, hitung jenis dan sebagian untuk pemeriksaan sitokin IFN- γ . Darah dibiarkan membeku pada suhu kamar (tidak lebih dari 24 jam), kemudian diputar (*centrifuge*) dengan kecepatan 1500 –2000 rpm selam 5 menit. selanjutnya supernatan (serum) yang

diperoleh dipindahkan kedalam tabung steril yang lain dan dibekukan dalam lemari pendingin dengan temperatur -80° C sampai pemeriksaan dilakukan. (tidak lebih dari 5 bulan).

9. Kelompok perlakuan mendapat kapsul *polyphenols* tiap pagi dan sore. Dosis pagi 4 tablet diminum $1\frac{1}{2}$ sampai 3 jam sebelum radioterapi dan sebelum makan. Dosis sore 4 tablet diminum 10 jam setelah radio terapi dan sebelum makan. Kapsul *polyphenols* diberikan setiap hari sebelum penderita diradiasi, sejak hari pertama radioterapi sampai dengan hari terakhir radioterapi (6600 cGy).
10. Kelompok kontrol mendapat 4 tablet plasebo (glukosa) pagi dan sore hari. Prosedur sama seperti kelompok perlakuan.
11. Setiap minggu (setelah 5 kali radiasi) dilakukan pemeriksaan Hb, lekosit, eritrosit, trombosit dan albumin. Kadar hemoglobin >10 gr% dan albumin > 3 gr% merupakan persyaratan radioterapi (protab bagian radioterapi). Semua penderita selama menjalani terapi radioterapi mendapat vitamin B kompleks. Disamping itu untuk penderita yang mengalami mukositis oral diterapi dengan amoxicillin 3 X 500 mg/ hari, mycostatin 3X2 tablet, analgetik serta vitamin B komplek 3 X 1 tablet/ hari.
12. Mengevaluasi efek samping radiasi di klinik setiap minggu atau setiap ada keluhan hebat atau gejala yang mengganggu.
13. Penderita diambil darah dari vena cubiti sebanyak 5 ml pada beberapa jam setelah akhir penyinaran 6600 cGy.
14. Perhitungan jumlah sel-sel lekosit, limfosit dan monosit dilakukan secara *autoanalyzer* menggunakan alat *Coulter HMX hematology analyzer* dan albumin menggunakan alat *Dimension RXL* di laboratorium patologi klinik RS dr. Kariadi-Semarang.
15. Setelah jumlah sampel sudah terkumpul maka dilakukan pemeriksaan kadar IFN- γ dengan metoda *human enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) menggunakan ELISA kit dari

Anogen, *catalogue number* EL 10024. Pemeriksaan dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro-Semarang oleh dr. Neni Susilaningih. (lampiran 2)

3.10 Alur kerja penelitian



3.11 Sampel yang tidak diikutkan dalam Analisis

1. Keadaan umum yang makin memburuk (status *Karnofsky* < 60)

2. Didapatkan komplikasi berat akibat radioterapi. Tidak menjalani radioterapi sesuai jadwal, 5 kali tidak datang berturut-turut, 7 kali secara tidak berturutan atau dosis radioterapi total kurang dari 6000 cGy
3. Tidak patuh minum kapsul *polyphenols* sampai 7 hari berturut –turut.

3.12 Cara Analisis Data

Data hasil penelitian dilakukan uji statistik dengan bantuan komputer dan program SPSS 11,5. Taraf kemaknaan (α) untuk uji hipotesis adalah 0,05.

Tahapan rancangan analisis statistik yang dilakukan dalam penelitian ini:

1. Untuk mengetahui apakah data berdistribusi normal dilakukan dengan uji Kolmogorov-Smirnov. Apabila nilai $p < 0,05$, maka data berdistribusi tidak normal, sehingga uji statistik dilakukan dengan nonparametris.
2. Untuk mengetahui apakah data jenis kelamin, patologi anatomi, stadium tumor, status *Karnofsky*, kadar albumin dan hemoglobin sama diantara kedua kelompok digunakan uji *chi square* jika skala data nominal dan t test jika skala data rasional atau interval.
3. Uji statistik yang digunakan adalah uji beda, rerata dan frekuensi. Pengujian ini diperlukan untuk membuktikan ada atau tidaknya pengaruh perlakuan terhadap perubahan variabel tergantung.
 - a. Uji statistik pra-pasca radioterapi pada masing-masing kelompok, bila kedua pasangan berdistribusi normal dilakukan uji *Pair t test*, bila salah satu atau kedua pasangan berdistribusi tak normal dilakukan uji *Wilcoxon signed rank test*.
 - b. Uji statistik pra-pasca radioterapi antara kedua kelompok, bila kedua pasangan berdistribusi normal dilakukan uji *Independent t test* sedangkan bila salah satu atau kedua pasangan berdistribusi tak normal dilakukan uji *Mann Whitney U test*.

BAB 4

HASIL PENELITIAN

Selama penelitian didapatkan 64 subyek yang terdiri dari 9 subyek (14,1%) dengan kriteria WHO tipe 1, 30 subyek (46,88%) kriteria WHO tipe 2 dan 25 subyek (39,06%) kriteria WHO tipe 3, tetapi yang memenuhi kriteria penelitian hanya 47 subyek (73,44%). Dari 47 subyek KNF (WHO tipe 2 dan WHO tipe 3) dibagi secara randomisasi blok menjadi kelompok radioterapi plus plasebo atau kelompok kontrol dan kelompok radioterapi plus *polyphenols* atau kelompok perlakuan. Tidak semua subyek dapat mengikuti penelitian sampai akhir tetapi sebagian dari mereka dikeluarkan dari penelitian ini (*drop-out*).

Terdapat 4 subyek (11,7%) dari kelompok kontrol yang dikeluarkan dari penelitian. Alasan keluarnya karena 2 subyek mengalami rasa sakit di mulut sampai tenggorok, tidak dapat makan dan dehidrasi. Radioterapi dihentikan sementara untuk perbaikan gizi. Sedangkan 2 subyek lainnya tidak datang lagi untuk radioterapi. Sementara itu terdapat 3 subyek dari kelompok perlakuan yang dikeluarkan dari penelitian. Seorang subyek dikeluarkan karena tidak suka minum obat, sedangkan 2 subyek lainnya tidak pernah datang lagi. (13,0%). Dengan demikian penderita KNF yang dapat mengikuti penelitian sampai selesai di kelompok kontrol didapatkan 20 subyek (83,33%) dan dikelompok perlakuan didapatkan 20 subyek (86,96%). Tidak semua subyek berhasil diperiksa kadar IFN- γ nya. Dari 40 subyek, hanya 17 subyek pada masing-masing kelompok yang berhasil diperiksa IFN- γ nya. Hal ini dapat disebabkan karena proses transportasi sampel darah subyek ke laboratorium bioteknologi atau pada saat proses penyimpanan di lemari pendingin bioteknologi secara tidak disengaja terjadi kerusakan pada sel-sel tersebut.

Distribusi Frekuensi subyek

4.1.1 Distribusi kelompok umur

Distribusi frekuensi subyek menurut kelompok umur termuat dalam tabel 4.1. Frekuensi terbanyak pada kelompok umur 50-60 tahun yaitu 15 subyek (37,5%). Dari tabel tersebut juga memperlihatkan pada kelompok 10-19 tahun terdapat 3 subyek (7,5%).

Tabel 4.1 Distribusi frekuensi kelompok umur

Umur (Tahun)	Kelompok kontrol		Kelompok Perlakuan		Total	
	n	%	n	%	n	%
10-19	1	5	2	10	3	7,5
20-29	3	15	3	15	6	15,0
30-39	4	20	2	10	6	15,0
40-49	6	30	4	20	10	20,0
50-60	6	30	9	45	15	37,5
Total	20	100	20	100	40	100

4.1.2 Distribusi jenis kelamin

Pada penelitian ini didapat 27 subyek laki-laki (67,5%) dan 13 wanita (32,5%) atau rasio laki-laki-wanita 2,1:1.(tabel 4.2)

4.1.3 Distribusi jenis patologi anatomi

Pada penelitian ini hasil pemeriksaan histopatologi menunjukkan karsinoma nasofaring WHO tipe 2 sebanyak 26 subyek (65,0%) dan WHO tipe 3 sebanyak 14 subyek (35,0%) (tabel 4.2).

4.1.4 Distribusi stadium tumor

Pada penelitian ini stadium yang paling sering ditemukan adalah stadium 4 sebesar 24 subyek (60%) penderita sedangkan stadium 3 dan stadium 2 sebesar 14 subyek (35%) dan 2 subyek (5%) penderita (tabel 4.2).

4.2 Distribusi Variabel Subyek Pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan

Untuk mengetahui keseimbangan distribusi data jenis kelamin dan stadium kanker pada kedua kelompok dilakukan uji *Chi-Square*.

Tabel 4.2 menunjukkan nilai *p* hasil *chi-square* diatas 0,05 sehingga variabel jenis kelamin dan stadium kanker sebelum radioterapi diantara kedua kelompok tidak berbeda bermakna..

Variabel	Uji
Umur	1
Status	2
<i>Karnofsky</i>	2
Hemoglobin	2

¹*Independent t test*

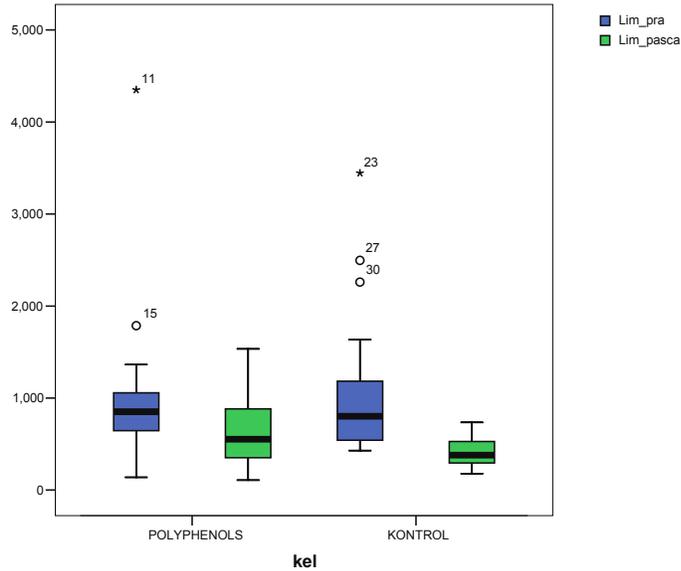
²*Mann-Whitney U test*

Disimpulkan distribusi variabel jenis kelamin, stadium tumor, umur, status *Karnofsky* dan rerata hemoglobin sebelum radioterapi antara kedua kelompok sama.

4.3 Perbandingan komponen imun pra-pasca radioterapi dalam grafik *box plot*

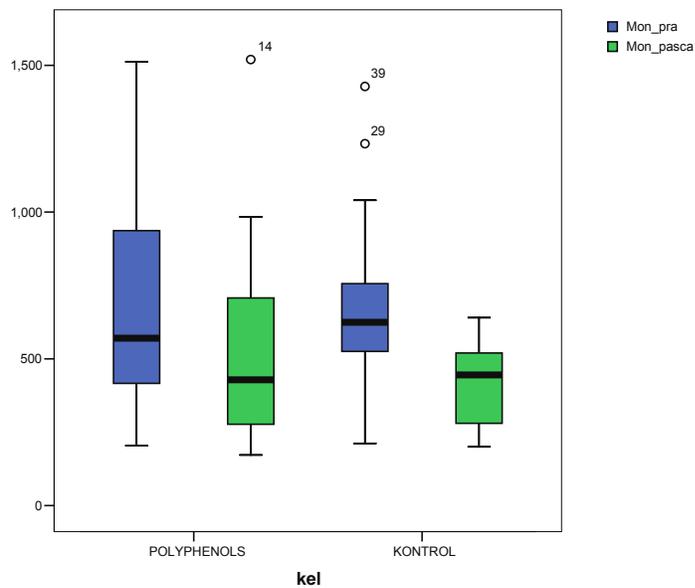
Grafik *box plot* rerata hitung jenis limfosit, monosit dan kadar IFN- γ pra dan pasca radioterapi antara kedua kelompok sebagai berikut:

Gambar 4.1 menunjukkan grafik *box plot* hitung limfosit pra dan pasca radioterapi antara kedua kelompok. Kelompok perlakuan pada saat pra radioterapi terdapat 2 subyek yang *outlier* sedangkan pada kelompok kontrol ada 3 subyek.



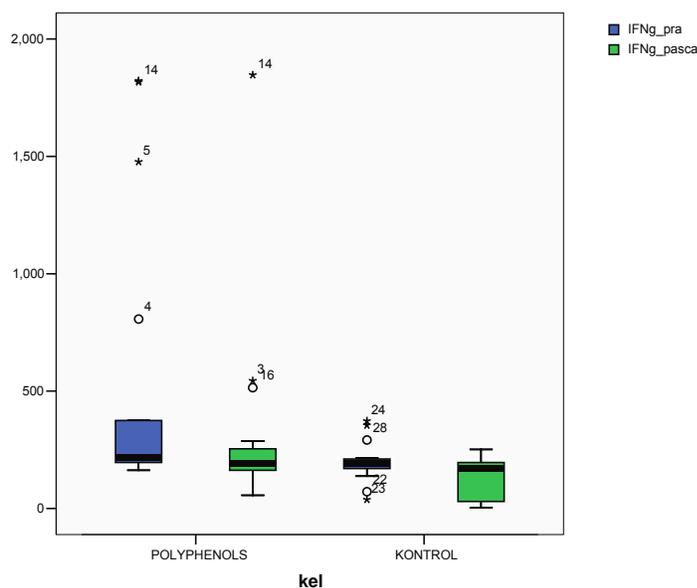
Gambar 4.1 Grafik *box plot* hitung limfosit pra dan pasca radioterapi antara kelompok kontrol dan perlakuan.

Gambar 4.2 menunjukkan grafik *box plot* hitung monosit pra dan pasca radioterapi antara kedua kelompok. Kelompok kontrol pra radioterapi terdapat 2 subyek *outlier* sedangkan pada kelompok perlakuan pasca radioterapi terdapat 1 subyek *outlier*.



Gambar 4.2 Grafik *box plot* hitung monosit pra dan pasca radioterapi antara kelompok kontrol dan perlakuan.

Gambar 4.3 menunjukkan grafik *box plot* kadar IFN- γ pra dan pasca radioterapi antara kelompok kontrol dan perlakuan. Kelompok perlakuan pra radioterapi terdapat 3 subyek *outlier* sedangkan kelompok kontrol terdapat 4 subyek. Kelompok perlakuan pasca radioterapi terdapat 3 subyek *outlier*. Perubahan kadar IFN- γ pasca radioterapi per pasien dapat dilihat di lampiran 5 dan 6.



Gambar 4.3: Grafik *box plot* kadar IFN- γ pra dan pasca radioterapi antara kelompok kontrol dan perlakuan.

Gambar 6 menunjukkan diagram batang persentase selisih limfosit kelompok kontrol 47,9% dan kelompok perlakuan 30%. Diagram batang persentase selisih rerata monosit pra-pasca radioterapi kelompok kontrol 33% dan kelompok perlakuan 23,3 % dan serta rerata selisih kadar IFN- γ kelompok kontrol 28,8% dan kelompok perlakuan 17,6%.

Tabel 4.6 menunjukkan hasil uji statistik variabel IFN- γ $p=0,029$, berarti kadar IFN- γ sebelum radioterapi antara kedua kelompok berbeda bermakna, sedangkan variabel limfosit $p=0,862$, monosit $p=0,987$ menunjukkan tidak berbeda bermakna.

Tabel 4.6 Komparasi komponen respons imun antara kelompok kontrol dan perlakuan sebelum radioterapi.

	Kelompok Kontrol				Kelompok Perlakuan				<i>p</i>
	n	Mean	SD	Median	n	Mean	SD	Median	
Limfosit	20	1088,7	801,7	803,0	20	1016,7	862,7	850,5	0,862 ²
Monosit	20	668,9	95,4	624,5	20	667,2	343,0	570,0	0,987 ¹
IFN- γ	17	197,5	84,4	192,1	17	519,0	590,3	216,4	0,029 ²

¹Independent t test

²Mann Whitney U test

Disimpulkan sebelum radioterapi rerata kadar IFN- γ kelompok kontrol lebih rendah dari kelompok perlakuan sedangkan hitung limfosit dan monosit sama.

b. Komparasi komponen respons imun antara kedua kelompok sesudah radioterapi.

Tabel 8 menunjukkan uji statistik untuk variabel IFN- γ $p=0,045$, berarti kedua kelompok berbeda bermakna. Untuk variabel limfosit $p=0,120$ dan monosit $p=0,216$ menunjukkan kedua kelompok tidak berbeda bermakna.

Tabel 4.7 Komparasi komponen respons imun antara kelompok kontrol dan perlakuan sesudah radioterapi

	Kelompok Kontrol				Kelompok Perlakuan				<i>p</i>
	n	Mean	SD	Median	n	Mean	SD	Median	
Limfosit	20	408,3	147,6	381,0	20	652,3	374,9	553,5	0,120 ²
Monosit	20	421,1	145,0	445,0	20	524,9	336,4	428,0	0,216 ¹
IFN- γ	17	127,2	91,7	169,9	17	310,3	418,6	192,1	0,045 ²

¹Independent t test

²Mann Whitney U test

Disimpulkan sesudah radioterapi rerata kadar IFN- γ kelompok kontrol lebih rendah dari kelompok perlakuan, sedangkan rerata hitung limfosit dan monosit antara kedua kelompok sama.

4.4.2 Perubahan komponen respons imun pasca radioterapi.

Untuk mengetahui perubahan respons imun pasca radioterapi, dilakukan pengujian terhadap data komponen respons imun pra dan pasca radioterapi pada masing-masing kelompok penelitian. Analisa dari perubahan komponen respons imun masing-masing kelompok sebagai berikut:

a. Perubahan komponen respons imun pasca radioterapi kelompok kontrol (radioterapi + plasebo)

Hasil uji statistik pra-pasca radioterapi kelompok kontrol pada tabel 4.8 menunjukkan variabel limfosit $p=0,000$, monosit $p=0,000$ dan IFN- γ $p=0,031$. menunjukkan pra-pasca radioterapi ketiga variabel tersebut berbeda bermakna.

Tabel 4.8 Komparasi komponen respons imun pra dan pasca radioterapi kelompok kontrol (radioterapi + plasebo)

	n	Mean Pra RT	SD	Median	Mean Pasca RT	SD	Median	<i>p</i>
Limfosit	20	1088,7	801,7	803,0	408,3	147,6	381,0	0,000 ²
Monosit	20	668,9	295,4	624,5	421,1	145,0	445,0	0,000 ¹
IFN- γ	17	197,5	84,4	192,1	127,2	91,7	169,9	0,031 ²

¹ *Pair t test* ² *Wilcoxon signed rank test*

Disimpulkan pada kelompok kontrol sesudah radioterapi rerata hitung limfosit, monosit dan kadar IFN- γ lebih rendah dibandingkan sebelum radioterapi.

b. Perubahan komponen respons imun pasca radioterapi kelompok perlakuan (radioterapi + polyphenols)

Hasil uji statistik pra-pasca radioterapi kelompok perlakuan pada tabel 4.9 menunjukkan variabel limfosit $p=0,000$, monosit $p=0,000$ dan IFN- γ $p=0,084$. Ini menunjukkan variabel limfosit dan monosit pasca radioterapi berbeda bermakna sedangkan kadar IFN- γ tidak berbeda bermakna.

Tabel 4.9 Komparasi komponen respons imun pra dan pasca radioterapi kelompok perlakuan (radioterapi + polyphenols)

Tabel 4.11 menunjukkan persentase selisih sel-sel imun dan sitokin IFN- γ pra-pasca radioterapi antara kelompok kontrol dan perlakuan. Penurunan selisih rerata limfosit dan monosit dalam persentase secara absolut menunjukkan kelompok kontrol lebih besari penurunan dalam persentase. Persentase selisih kadar IFN- γ menunjukkan kelompok kontrol penurunan lebih besar dari kelompok perlakuan.

Tabel 4.11 Selisih pra dan pasca radioterapi untuk variabel komponen respon imun pada kelompok kontrol dan perlakuan dalam persentase.

Variabel	n	Kelompok	Rerata
% selisih Limfosit	20	Kontrol	47,8878
	20	Perlakuan	29,5058
% selisih Monosit	20	Kontrol	32,9752
	20	Perlakuan	23,3497
% selisih IFN- γ	17	Kontrol	28,8199
	17	Perlakuan	17,6099

Disimpulkan penurunan limfosit, monosit dan IFN- γ kelompok kontrol lebih besar dari kelompok perlakuan.

BAB 5

PEMBAHASAN

5.1 Metode Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengungkapkan pengaruh *polyphenols* dalam menghambat penurunan produksi IFN- γ oleh sel mononuklear darah tepi akibat radioterapi pada KNF. Untuk mencapai tujuan tersebut dilakukan penelitian eksperimental. Intervensi berupa pemberian kapsul *polyphenols* teh hijau merupakan rekayasa peneliti. Penelitian eksperimental menggunakan obat dengan obyek manusia yang dikerjakan di klinik dapat digolongkan sebagai *clinical trial*. Pemilihan rancangan *randomized pre-post test control group design* mempunyai konsekuensi derajat kesulitan yang lebih tinggi dibandingkan dengan rancangan jenis lainnya, terutama aspek etika dan feasibilitas penelitian. Namun rancangan ini sangat baik untuk melihat efek perlakuan.

Penelitian eksperimental yang dikerjakan di klinik umumnya studi prospektif khusus yang dianggap sebagai suatu studi epidemiologi yang paling tinggi reliabilitasnya. Hal ini karena adanya randomisasi dan kesempatan untuk melakukan pengendalian faktor yang diperkirakan dapat mempengaruhi maupun faktor yang tidak mempengaruhi hasil penelitian. Randomisasi yang dilakukan pada penelitian ini adalah randomisasi blok. Keuntungan dari randomisasi dengan teknik ini terutama pada jumlah sampel di tiap kelompok yang selalu dalam keadaan sebanding atau hampir sama. Randomisasi yang dikerjakan akan membagi sama rata beberapa variabel yang tidak diteliti tetapi dapat mempengaruhi atau mengganggu proses penilaian pada waktu membuat perhitungan dan analisis data. Dengan telah dilakukannya randomisasi secara baik dan benar akan dikurangi semaksimal mungkin bias seleksi dan perancu.

Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan sebaran jenis kelamin (laki-laki, perempuan) dan stadium kanker antara kedua kelompok dilakukan uji *chi square*, dan apakah terdapat perbedaan sebaran variabel umur, status *Karnofsky* dan hemoglobin dilakukan uji *independent t test*. Disimpulkan variabel-variabel tersebut diatas sebelum radioterapi antara kedua kelompok sama. Uji normalitas variabel menunjukkan monosit pra-pasca radioterapi serta limfosit pasca radioterapi kedua kelompok berdistribusi normal sedangkan variabel limfosit pra radioterapi dan IFN- γ pra-pasca radioterapi kedua kelompok berdistribusi tidak normal. Uji beda antara kedua kelompok menggunakan *Independent t test* bila kedua variabel berdistribusi normal dan *Mann Whitney U test* bila salah satu atau kedua variabel berdistribusi tidak normal. Uji beda pra-pasca radioterapi pada kelompok masing-masing menggunakan *Pair t test* bila kedua variabel berdistribusi normal dan *Wilcoxon sign rank test* bila salah satu atau kedua variabel berdistribusi tidak normal.

Hitung jenis, limfosit dan monosit dilakukan secara *autoanalyzer* menggunakan alat *Coulter HMX hematology analyzer* sedangkan albumin menggunakan alat *Dimension RXL* di laboratorium patologi klinik RS Dr Kariadi-Semarang. Dengan tehnik pemeriksaan ini didapat hasil yang obyektif karena darah dianalisa dengan sistem komputer.

Darah yang diambil untuk pemeriksaan IFN- γ dilakukan dengan tehnik *venipuncture* dan plasma dipisahkan dari sel darah secepat mungkin. Kemudian plasma darah disimpan pada suhu – 80⁰ C. Setelah jumlah sampel terkumpul maka dilakukan pemeriksaan kadar IFN- γ dengan metoda human *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Pemeriksaan dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro-Semarang menggunakan ELISA kit dari Anogen dengan *catalogue number* EL 10024. Pemeriksaan dengan tehnik ELISA ini merupakan pemeriksaan standart dan banyak dilakukan untuk mengukur kadar sitokin.

5.2 Deskriptif Karakteristik Subyek

5.2.1 Berdasarkan umur subyek

Distribusi umur pada penelitian ini berkisar antara 16 sampai 60 tahun dengan frekuensi tersering ditemukan terutama pada usia 51-60 tahun sebanyak 15 subyek (37,5%) (tabel 4.1), rerata umur 40,8 tahun. Hasil ini hampir sama dengan penelitian di Surabaya, Jakarta, Taiwan dan Alaska. Ini menunjukkan terjadi KNF adalah multi faktor. Paparan zat-zat karsinogenik dan infeksi virus Epstein-Barr dapat menyebabkan akumulasi kelainan beberapa gen yang berinteraksi satu dengan lainnya yang akhirnya menghasilkan transformasi ke arah sel kanker. Proses ini membutuhkan waktu berpuluh tahun antara paparan pertama terhadap bahan karsinogenik dengan timbulnya sel kanker dan frekuensi terbanyak mengenai kelompok usia 40-60 tahun.

Penelitian di Surabaya didapatkan 623 penderita KNF, subyek dengan rentang usia tersering 41-50 tahun sebanyak 26,0%.¹⁹ Penelitian di Jakarta terhadap 659 penderita KNF, rentang usia tersering ditemukan pada kelompok 40-49 tahun sebanyak 176 subyek (25,92%) dan nomor 2 tersering kelompok 50-59 tahun atau 145 subyek (22,00%).⁵⁷ Penelitian di Taiwan didapatkan 497 penderita KNF dengan rentang usia 17 sampai 77 tahun dan rerata 45,7 tahun.⁵⁸ Penelitian di Alaska didapatkan 31 penderita KNF dengan rentang usia 32 sampai 80 tahun, yang tersering pada kelompok usia 45-54 tahun dengan rerata 54 tahun untuk laki-laki dan 56 tahun untuk wanita.⁵⁹

5.2.2 Berdasarkan jenis kelamin subyek

Subyek laki-laki pada penelitian ini adalah 27 subyek (67,5%) sedangkan wanita 13 subyek (32,5%).(tabel 4.2) Rasio laki-laki-wanita 2,1:1. Penelitian di Surabaya mendapatkan 623 penderita KNF terdiri dari 433 subyek laki-laki (69,5%) dan 190 subyek wanita (30,5%) dengan rasio 2,26:1.¹⁹ Penelitian di Jakarta mendapatkan 181 subyek, penderita KNF terdiri dari 152 subyek laki-laki (64,2%) dan 29 subyek wanita (35,8%) dengan rasio laki:wanita 1,79:1.⁵⁷ Penelitian di Taiwan mendapatkan 494 penderita KNF terdiri dari 367 subyek laki-laki (74,3%) dan 127 subyek

wanita (25,7%), rasio laki-laki:wanita 2,9:1.⁵⁸ Penelitian di Alaska mendapatkan 31 penderita KNF terdiri dari 25 subyek laki-laki (80,6%) dan 6 subyek wanita (19,4%), dengan rasio 4,1:1.⁵⁹

Hasil penelitian ini tidak jauh berbeda dengan penelitian di Jakarta, Surabaya, Taiwan dan Alaska. Dapat disimpulkan bahwa penderita KNF lebih banyak pada laki-laki karena mereka pada umumnya bekerja diluar dan berada pada lingkungan kerja yang potensial terpapar bahan karsinogenik.

5.2.3 Berdasarkan jenis patologi anatomi subyek

Pemeriksaan patologi anatomi pada penelitian ini menunjukkan KNF WHO tipe 2 sebanyak 26 subyek (65,0%) dan WHO tipe 3 sebanyak 14 subyek (35,0%) (tabel 4.2). Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian di Surabaya dan Jakarta. Baik di Surabaya dan Jakarta, tipe KNF yang sering dijumpai adalah WHO tipe 3. Namun bila dibandingkan dengan penelitian sebelumnya juga di Semarang hasil penelitian ini sama, yaitu WHO tipe 3 sebanyak 202 subyek (43,78%) dari 462 penderita KNF. WHO tipe 2 dan 1 sebesar 124 subyek (26,84%) dan 136 subyek (29,48%).⁶¹

Penelitian di Surabaya menemukan angka terbanyak pada jenis WHO tipe 3 sebesar 101 subyek (78,2%).¹⁹ Penelitian di Jakarta mendapat subyek 559 penderita KNF dan ditemukan WHO tipe 3 sebesar 501 subyek (89,63%), WHO tipe 2 sebanyak 14 subyek (2,50%) dan WHO tipe 3 sebesar 44 subyek (7,87%).⁶⁰ Angka persentase dari kota-kota di Indonesia yang bervariasi ini menunjukkan frekuensi patologi anatomi dapat dipengaruhi oleh lingkungan, kebiasaan / budaya terhadap proporsi tipe WHO KNF.

5.2.4 Berdasarkan stadium tumor subyek

Pada penelitian ini stadium yang paling sering ditemukan adalah stadium 4 sebesar 24 subyek (60%) sedangkan stadium 3 dan stadium 2 sebesar 14 subyek (35%) dan 2 subyek (5%) (tabel 4.2). Penelitian di Bandung mendapatkan 623 penderita KNF sebagian besar penderita

datang sudah pada stadium lanjut, yaitu stadium IV sebanyak 238 subyek (78%) dan stadium III sebanyak 63 subyek (20,7%). Penderita yang datang pada stadium dini terdiri dari stadium II sebesar 2 subyek (0,7%) dan stadium I hanya 1 subyek (0,3%).⁶² Penelitian di Jakarta mendapatkan 81 penderita KNF terdiri dari stadium II sebanyak 2,47%, stadium III sebesar 17,28% dan stadium IV 80,25%.⁶⁰

Dari data tersebut disimpulkan penderita yang datang berobat sebagian besar sudah datang pada stadium lanjut, dengan tumor sudah meluas ke jaringan sekitar atau ke kelenjar leher. Hal ini dapat disebabkan karena kurangnya pengetahuan masyarakat terhadap penyakit ini terutama mengenai gejala dini, keadaan sosial ekonomi yang rendah, sehingga pasien baru datang berobat setelah betul-betul terpaksa. Penyakit ini sendiri pada stadium awal tidak menimbulkan keluhan yang mengganggu sehingga pasien tidak segera datang berobat.

5.3 Perubahan respons imun pasca radioterapi pada kelompok kontrol

Hasil pengujian terhadap data komponen respon imun sebelum dan sesudah radioterapi kelompok kontrol menunjukkan rerata hitung limfosit, monosit dan IFN- γ pasca radioterapi lebih rendah dari pra radioterapi (tabel 4.8). Pada penelitian ini limfosit merupakan sel imun yang mengalami penurunan paling banyak pada akhir radioterapi sebesar 47,88%. Penurunan juga tampak pada monosit 32,97% dan IFN- γ 28,8% (tabel 4.13 dan gambar 4.4).

Limfosit merupakan sel yang paling radiosensitif dari seluruh sel darah tepi. Pada dosis terapi 0,5 Gy sudah terjadi penurunan limfosit. Derajat penurunan sangat tergantung dari dosis radiasi yang diterima. Monosit juga merupakan sel yang radiosensitif seperti limfosit tapi penurunan jumlah selnya lebih lambat dan setelah radioterapi jumlahnya lebih cepat kembali ke normal.⁴

Radiasi dapat menyebabkan penurunan kuantitas dan kualitas sel-sel imun. Penelitian di Jakarta menunjukkan terjadi penurunan respons imun seluler (CMI) akibat radiasi pada penderita

KNF. Secara *in vitro* ditunjukkan indeks transformasi limfosit yang menurun dengan titik terendah pada minggu ke 4 sejak dimulainya penyinaran. Selain menyebabkan kerusakan limfosit, radiasi juga menimbulkan hambatan pembentukan (produksi) dan perkembangan sel darah.⁴ Radiasi menyebabkan penurunan aktivitas makrofag dan kemampuan memproduksi sitokin. Terjadi penurunan makrofag dan limfosit T CD4 yang berdampak lumpuhnya respon imun seluler.¹¹⁻¹³ Hal ini karena makrofag maupun limfosit T CD4 mempunyai peran penting sebagai motor penggerak respons imun. Pada penelitian di klinik pasca radioterapi seringkali dijumpai gangguan hematologi berupa anemia, leukopeni dan trombositopeni.⁶³

Berbagai cara sebenarnya telah dilakukan untuk mencegah atau mengurangi pengaruh radioterapi misalnya dengan modifikasi teknik radioterapi, seperti pemberian radiosensitizer dan penggunaan pesawat berenergi tinggi serta pembuatan foto CT Scan dalam perencanaan lapangan radiasi, namun sampai sekarang komplikasi radioterapi terhadap sistem imun tetap saja terjadi.³² Radioterapi pada penderita kanker dengan pesawat Cobalt dilaporkan akan terjadi penurunan respons imun seluler pasca radioterapi. Timbulnya komplikasi terhadap sistem imun pada radioterapi KNF diperkirakan disebabkan karena luasnya area radiasi sehingga dapat mengenai jaringan dan organ limfoid di daerah hidung/nasofaring dan tenggorok (*ring waldeyer*) yang termasuk dalam sistem imun mukosal. Dengan demikian selain membunuh sel kanker di nasofaring, radioterapi KNF dapat menimbulkan kerusakan sel efektor imunologis yang terdapat lokal di daerah tenggorok termasuk sel di jaringan tumor nasofaring.^{4,5}

Chromosomal aberrations merupakan parameter biologi untuk menilai radiosensitivitas sel terhadap radioterapi. Sel limfosit yang terpapar sinar- γ akan terjadi *aberration* pada kromosomnya. *Chromosomal aberrations* yang terjadi dapat pada sel induk di sumsum tulang maupun sel limfosit matur di nodus limfatikus dan pembuluh darah tepi. Sel-sel prekursor di sumsum tulang lebih radiosensitiv dibandingkan sel limfosit matur.⁶⁴⁻⁶⁶

Chromosomal aberrations ini menyebabkan fungsi limfosit terganggu, tetapi sel limfosit mempunyai kemampuan untuk memperbaiki kerusakan yang terjadi melalui *repair DNA*

system. Apabila sistem ini gagal maka akan terjadi penurunan imunitas seluler dalam melawan kanker itu sendiri maupun akan timbul efek samping akibat radioterapi.⁶⁶

Mekanisme kerusakan sel imunologis yang berdampak penurunan imunitas seluler khususnya respons Th1 akibat radiasi kebanyakan disebabkan oleh radikal bebas yang terbentuk melalui proses ionisasi. Tumbukan sinar ion dengan molekul air yang terdapat di intra dan ekstra sel menyebabkan terbentuknya ion hidrogen dan ion hidroksil.²⁸ Radikal bebas terutama radikal hidroksil yang dihasilkan bersifat sangat reaktif menimbulkan stres metabolik dan rusaknya berbagai struktur vital sel.^{26,32} Radikal bebas hidroksil dapat menyebabkan: a. Peningkatan konsentrasi enzim *phospholipase A2* (PLA2). Aktivitas PLA2 akan membentuk PGE2 dari asam arakidonat sel kanker maupun sel makrofag. PGE2 yang terbentuk akan menghambat aktivitas dan proliferasi limfosit T dan sitotoksik sel NK,^{48,67} b. Terjadi peningkatan sitokin IL-10 dan penurunan sitokin IL-12 oleh sel makrofag.¹⁴ c. Aktivasi gen NF- κ B akan menyebabkan sekresi IL-1, IL-8 dan TNF- α .⁴⁹ Aktivasi sitokin-sitokin tersebut akan menghambat aktivasi Th 0 CD4 menjadi Th1 CD4.

Efek radikal bebas terhadap sel imunokompeten terutama makrofag dan limfosit T CD4 menyebabkan sel mengalami penurunan aktivitas dan produksi sitokin. Menurunnya aktivitas makrofag dalam memproduksi IL-1 dan IL-12 akan menghambat proliferasi dan diferensiasi sel T CD4 menjadi subset Th1. Penurunan aktivitas sel Th1 dalam memproduksi sitokin IL-2 dan IFN- γ mengakibatkan penurunan aktivitas sel T CD 8 (CTL) dan sel makrofag aktif memproduksi IL-1, IL-12 yang mempunyai peran penting pada respon imun kanker. Penurunan respons imun khususnya respons imun Th1 pada penderita KNF pasca radioterapi akan meningkatkan risiko terkena infeksi mikroba. Penurunan respons Th1 sebagai cerminan kualitas *immune surveillance* yang rendah dapat mengakibatkan pertumbuhan kanker nasofaring yang makin progresif, residif tumor dan metastasis.^{14,30}

Pada penderita KNF yang mendapat radioterapi terjadi penekanan pada sistem imun yang terlihat dari penurunan jumlah sel-sel imun. Pada penelitian ini seluruh pasien mendapat terapi 6600 cGy, 200 cGy per fraksi dengan 6 Me V selama 7 minggu, penurunan limfosit 47,88%, leukosit 35,91% dan monosit 32,97%. Penelitian di Hawaii dengan sampel penderita KNF mendapat radioterapi 6500-7000 cGy, 180 per fraksi dengan 4 Me V dari linear accelerator selama 8 minggu, terjadi penurunan limfosit 60%.²⁶ Penelitian di Jerman dengan sampel penderita karsinoma payudara yang mendapat radioterapi 5000-5040 cGy, per fraksi 180 atau 200 cGy, selama 6 minggu dengan 6-10 MeV dari linear accelerator terjadi penurunan hitung limfosit 50%, monosit 20%.⁶ Dengan mencegah penurunan sel-sel imun selama radioterapi berlangsung maka diharapkan kualitas *immune surveillance* penderita menjadi lebih baik.

5.4 Perubahan respons imun pasca radioterapi pada kelompok perlakuan

Hasil pengujian terhadap data komponen respon imun pra dan pasca radioterapi kelompok perlakuan menunjukkan rerata hitung limfosit, monosit pasca radioterapi lebih rendah dari pra radioterapi. Rerata kadar IFN- γ pasca radioterapi sama dengan pra radioterapi (tabel 4.9). Pasca radioterapi limfosit mengalami penurunan sebesar 30%, monosit 23,3% dan IFN- γ sebesar 17,6%.

Terapi utama KNF adalah radioterapi dengan sinar pengion. Gelombang elektromagnetik menimbulkan proses ionisasi bila melewati materi organik. Bila sinar pengion mengenai molekul air didalam sel akan terbentuk radikal bebas. Radikal bebas dari molekul air yang sangat reaktif adalah radikal bebas hidroksil.

Polyphenols yang diberikan bersama radioterapi pada kelompok perlakuan bertujuan untuk dapat menetralkan efek radikal bebas (*scavenging ROS*) yang merusak sel imun. EGCG yang merupakan *catechins* utama *polyphenols* mempunyai *ortho-tryhidroxyl* di cincin B pada karbon 3',4' dan 5' dan pada cincin C terdapat gugus *gallate moiety esterified* pada karbon 3'. Gugus *ortho-tryhidroxyl* dan *gallate moiety esterified* dapat menetralkan radikal bebas dari SOR dengan

cara mentransfer elektron (transfer atom H) sehingga radikal hidroksil menjadi tidak reaktif.⁹ Radikal bebas SOR dapat merusak rantai DNA, sehingga bila radikal bebas dinetralkan reaktivitasnya oleh *polyphenols* maka kerusakan akibat radikal bebas SOR dapat dikurangi.¹⁰

Penurunan rerata sel-sel imun pasca radioterapi pada kelompok perlakuan lebih rendah dibandingkan pra radioterapi, sedangkan rerata kadar IFN- γ pra-pasca radioterapi sama (tabel 4.9). Di sini belum tampak peran dari *polyphenols* dalam menghambat penurunan sel-sel imun tapi tampak dalam menghambat penurunan kadar IFN- γ .

Beberapa faktor-faktor yang mempengaruhi respon limfosit terhadap radioterapi:

a. Luasnya area radiasi sehingga dapat mengenai jaringan dan organ limfoid di daerah hidung/nasofaring dan tenggorok (*ring waldeyer*) yang termasuk dalam sistem imun mukosal, b. Dosis total radioterapi penderita KNF, c. Respon subtipe limfosit terhadap radioterapi berbeda-beda, hal ini dipengaruhi oleh faktor intrinsik limfosit. Limfosit B lebih sensitif dibanding dengan limfosit T CD8 sedangkan limfosit T CD4 yang paling radioresisten. Faktor intrinsik limfosit ini dipengaruhi secara genetik,^{65,68} d. Umur sampel yang mendapat radioterapi mempengaruhi sensitifitas terhadap radioterapi,⁶⁴ e. Pasien dengan status stress psikis yang berbeda respon radiasi juga berbeda.^{30,69}

5.5 Perbedaan hitung sel imun dan kadar IFN- γ pasca radioterapi antara kelompok kontrol dan perlakuan.

Uji beda antara kedua kelompok dilakukan untuk menguji ada tidaknya pengaruh radioterapi + *polyphenols* (perlakuan) terhadap perubahan respon imun. Hasil pengujian yang dilakukan terhadap data sel imun pra dan pasca radioterapi antara kelompok yang mendapat radioterapi + plasebo dengan kombinasi radioterapi + *polyphenols* didapatkan hitung limfosit dan monosit pra radioterapi antara kedua kelompok sama (tabel 4.6). Pasca radioterapi hitung limfosit dan monosit antara kedua kedua kelompok sama.(tabel 4.7). Selisih rerata absolut monosit dan limfosit pasca radioterapi kelompok kontrol lebih besar dari kelompok perlakuan (tabel 4.10).

Secara persentase penurunan limfosit dan monosit kelompok perlakuan lebih kecil dari kelompok kontrol (tabel 4.11). Rasio penurunan sel limfosit dan monosit pasca radioterapi dan persentase didapatkan penurunan limfosit dan monosit pada kelompok kontrol lebih besar 1,59 dan 1,41 kali dibandingkan kelompok perlakuan.

Dapat disimpulkan sesudah radioterapi *polyphenols* tidak dapat menghambat penurunan sel limfosit dan monosit pada penderita KNF yang mendapat radioterapi 6000-6600 cGy, walaupun secara persentase penurunan absolut sel limfosit dan monosit kelompok kontrol lebih besar dari kelompok perlakuan.

Distribusi variabel pengganggu jenis kelamin, stadium tumor, umur, status *Karnofsky* dan hemoglobin pra radioterapi antara kedua kelompok seimbang (tabel 4.2 dan 4.4). Sel limfosit dan monosit pra radioterapi antara kedua kelompok sama (tabel 4.6), tetapi vitalitas sel mononuklear yang dinilai oleh produksi kadar IFN- γ kelompok kontrol sebelum radioterapi lebih rendah dari kelompok perlakuan (tabel 4.6). Ini dapat disebabkan karena *Intrinsic susceptibility of human lymphocyte*. Kemampuan menghasilkan IFN- γ oleh sel limfosit berbeda antara individu satu dengan lainnya.^{65,68} Pada pasien kanker akan mengalami rasa takut dan cemas atau stres psikologi yang cukup besar. Stres akan menyebabkan sistem saraf pusat (SSP) mengirim sinyal imunoregulatori ke sistem imun dan mempengaruhi pelepasan ACTH dari hipofise yang menyebabkan terlepasnya glukokortikoid yang bekerja immunosupresif.^{20,69} Infeksi pada penderita kanker akan memberikan sinyal ke sistem saraf. Sistem saraf akan memberikan respon terhadap rangsangan seperti bahan kimiawi saraf, sitokin, rangsangan fisik dan emosi akan mengirim sinyal ke sistem imun sehingga terjadi penekanan sistem imun.⁶⁹

Sebelum radioterapi rerata kadar IFN- γ kelompok kontrol lebih rendah dari kelompok perlakuan (tabel 4.6). IFN- γ kelompok perlakuan pasca radioterapi mempunyai kadar yang sama dengan pra radioterapi (tabel 4.9), sebaliknya pada kelompok kontrol pasca radioterapi mempunyai

kadar yang lebih rendah dari pra radioterapi (tabel 4.8). Rerata penurunan kadar IFN- γ antara kedua kelompok menggunakan persentase didapatkan sama (tabel 4.11). Secara persentase penurunan kadar IFN- γ pada kelompok kontrol 28,8% sedangkan kelompok perlakuan 17,6% atau penurunan kadar IFN- γ kelompok kontrol 1,63 lebih banyak pada kelompok perlakuan. Dapat disimpulkan *polyphenols* mampu mempertahankan vitalitas sel-sel imun tetap baik sehingga produksi IFN- γ tetap tinggi pada kelompok perlakuan.

Hitung limfosit dan monosit pasca radioterapi kelompok perlakuan sama dengan kelompok kontrol (tabel 4.7) tapi produksi sitokin IFN- γ kelompok kontrol lebih rendah dari kelompok perlakuan. Ini dapat disebabkan oleh:

a. *Intrinsic susceptibility of human lymphocyte*. Kemampuan menghasilkan IFN- γ oleh sel limfosit berbeda antara individu satu dengan lainnya.^{65,68}

b. Sensitivitas sub tipe limfosit TCD8, TCD4 dan limfosit B terhadap radioterapi berbeda. Limfosit B lebih sensitif dibanding dengan limfosit TCD8 sedangkan limfosit TCD4 yang paling radioresisten. Pada tumor stadium lanjut menunjukkan jumlah limfosit TCD4 lebih banyak dari TCD8.⁴²

Polyphenols mampu mempertahankan vitalitas sel-sel imun tetap baik sehingga produksi IFN- γ tetap tinggi pada kelompok perlakuan. Pemberian *polyphenols* pada saat radioterapi penderita KNF menyebabkan peningkatan respon Th1. Hal ini menguntungkan karena kemampuan perlawanan terhadap sel kanker meningkat. Radikal hidroksil dan hidrogen yang terbentuk akibat radioterapi penderita KNF akan dinetralkan oleh *polyphenols* sehingga kerusakan terhadap sel-sel imun dapat dihambat. Meningkatnya produksi IL-2 dan IFN- γ oleh Th1 akan memicu peningkatan aktivitas sitotoksik sel NK dan limfosit T sitotoksik. Respon seluler Th1 jauh lebih efektif dalam membunuh sel kanker, maka dapat diasumsikan *polyphenols* dapat mempertahankan fungsi sel-sel sistem imun dari kerusakan karena radikal bebas. *Polyphenols* juga mampu mencegah kerusakan vitalitas sel limfosit yang tampak dari kadar IFN- γ yang tetap sama pasca radioterapi pada kelompok perlakuan sedangkan pada kelompok kontrol terjadi lebih rendah dari sebelum radioterapi.

Pada penelitian-penelitian sebelumnya dosis *polyphenols* bervariasi antara 1-100 µmol/L. Pada dosis 30 µmol dapat menginduksi apoptosis, 100 µmol merupakan dosis sitotoksik pada sel. Minum teh hijau diatas 1 L (>5 cups/hari) dapat melindungi tubuh dari timbulnya kanker. Dalam 100 ml teh hijau mengandung antara 50-100 mg *polyphenols*.⁵³⁻⁵⁶

Polyphenols yang diberikan pada penelitian ini sebesar 4 kapsul pagi hari dan 4 kapsul sore hari, mempunyai kadar EGCG 1972 mg. Kadar EGCG akan mencapai puncak didalam darah 1½ jam sampai 3 jam setelah diminum bertujuan menetralkan radikal bebas yang akan terbentuk akibat radiasi. Pemberian kedua dimaksudkan untuk menetralkan radikal bebas yang masih terdapat didalam darah penderita karena 10 jam pasca radiasi kadar EGCG telah turun kurang dari 20% dosis awal. (lampiran 7)

Menurut Erba satu tablet EGCG 400 mg mampu mencapai kadar EGCG plasma sebesar 2µ mol/L.⁵⁵ Pada penelitian ini kadar IFN-γ sesudah radioterapi pada kelompok perlakuan sama dengan sebelum radioterapi. Ini menunjukkan kapsul *polyphenols* dengan kandungan EGCG 1972 mg mampu mencegah penurunan kadar IFN-γ selama proses radioterapi berlangsung.

5.6 Keterbatasan Dan Kendala Selama Penelitian

1. Pengukuran kadar IFN-γ pada penelitian ini hanya pada awal radioterapi dan akhir radioterapi perlu diketahui pengaruh *polyphenols* pada dosis 2000 cGy dan 4000 cGy.
2. Stres psikologis karena penderita menderita kanker dan akibat radioterapi yang tidak dapat dikontrol selama penelitian.
3. Asupan antioksidan lainnya yang tidak dapat dikontrol selama penelitian.
4. Perbedaan variasi sikap tanggap terhadap edukasi yang diberikan tentang pentingnya mengkonsumsi *polyphenols* sehingga terjadi *drop out*.

BAB 6

SIMPULAN DAN SARAN

SIMPULAN

Berdasarkan hasil dan analisis penelitian dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Kelompok KNF yang mendapat radioterapi terjadi penurunan kadar IFN- γ .
2. *Polyphenols* teh hijau yang diberikan pada penderita KNF menghambat penurunan kadar IFN- γ sesudah radioterapi.
3. Terdapat perbedaan penurunan kadar IFN- γ antara kelompok penderita KNF yang mendapat radioterapi dan *polyphenols* dengan kelompok radioterapi dan plasebo.

6.2 SARAN

1. Perlu sosialisasi penggunaan *polyphenols* pada penderita-penderita karsinoma nasofaring yang akan mendapat radioterapi.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menilai respon pemberian *polyphenols* pada penderita kanker lainnya yang mendapat radioterapi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini kami ingin mengucapkan terima kasih dan penghargaan atas kesempatan, fasilitas, bimbingan, bantuan, dorongan, dukungan, kerjasama, partisipasi dan atau pengorbanan yang telah diberikan kepada kami, baik dalam pendidikan maupun dalam pembuatan tesis ini, kepada:

1. Yth. Rektor Universitas Diponegoro Semarang,

2. Yth. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang,
3. Yth. Direktur Utama RS Dr Kariadi Semarang,
4. Yth. Ketua Bagian IK THT-KL Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ SMF K THT-KL RS Dr Kariadi Semarang,
5. Yth. Ketua TKP PPDS 1 Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang,
6. Yth. Ketua Program Studi IK THT-KL PPDS 1 Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang,
7. Yth. Bapak dr Wiratno Sp THT-KL(K),
8. Yth. Bapak Prof. Dr Noor Pramono, MmedSc, SPOG (K),
9. Yth. Para guru besar dan seluruh staf pengajar yang lain di bagian IK THT-KL PPDS 1 Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro maupun Program Magister Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Diponegoro Semarang,
10. Sejawat residen dan paramedis Bagian IK THT-KL Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ SMF THT K RS Dr Kariadi Semarang,
11. Karyawan Bagian IK THT-KL Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ SMF K THT K RS Dr Kariadi Semarang, dan karyawan Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Diponegoro Semarang,
12. Kepala Laboratorium Bioteknologi RS Dr Kariadi Semarang
13. Yth. Ketua SMF/ Kepala Instalasi Radiologi RS Dr Kariadi Semarang,
14. Yth, Kepala Laboratorium Patologi Klinik RS Dr Kariadi Semarang,
15. Karyawan Bagian Instalasi Radiologi, Bagian Laboratorium Klinik dan Laboratorium Bioteknologi RS Dr Kariadi Semarang,
16. Seluruh penderita yang telah bersedia menjadi subyek dalam penelitian ini,
17. Yth. Alm Bapak, Ibu, Ytc Istri dan kedua putri,

18. Semua yang lain yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu disini

Penulis menyadari banyak kekurangan yang terdapat dalam penulisan tesis ini. Oleh karena itu, berbagai masukan dari semua pihak sangat penulis harapkan untuk tercapainya sebuah tulisan ilmiah yang cukup memadai.

Semarang, Juli 2007

Johan J. Bernardus

DAFTAR PUSTAKA

1. Roezin A, Anida S. Karsinoma Nasofaring In: Efiaty AS, Nurbaiti I editors, Buku ajar Ilmu penyakit THT; 5th ed, Jakarta, Balai penerbit FKUI 2001:p.146-55.
2. Adinolodewo, Samsudin, Respon klinik pasca radioterapi pada karsinoma nasofaring WHO 3. KONAS PERHATI DI BALI 2003:p.132-135
3. Fu KK, Treatment of tumors of the nasopharynx. Radiation therapy. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG editors, Basic and Clinical Immunology; New Jersey: A Lange Medical Book 1991: p.649-61.
4. Early PJ, Sodee DB, Biologic effect of ionizing. In: Kasper R editors, Principles and practice of nuclear medicine. St Louis,The C.V. Mosby Company;1985: p.179-89.
5. Syahrums MH, Suhana N, Sudarmo S, Tjokronegoro A, Hendricus H. Pengaruh radioterapi terhadap sistem pertahanan tubuh seluler pada penderita kanker nasofaring MKI 1984. p.751-60.
6. Geinitz H, Zimmermann FB, Stoll P et al. Fatigue, serum cytokine levels and blood cell counts during radiotherapy of patients with breast cancer. Int J. Radiation Oncology Biol. Phys 2001;51(3):p.691-8.
7. Abbas AK, Lichtman AH, Immunity to Tumors. In: Celluler and Molecular Immunology: 5nd edition. Philadelphia;WB Saunders Co;2003:p.391-410.
8. Roitt IM. Tumor Immunology. In: Roitt's Essential Immunology. 10th ed. Massachusetts;Blackwell science;2001:p.374-94.

9. Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: Health effects, metabolism and antioxidant functions. In: *Critical reviews in food science and nutrition*; Corvalis; CRC Press LLC; 2003: 43;(1); p.89-143.
10. Anderson RF, Fisher LJ, Hara Y et al. Green tea catechins partially protect DNA from OH radical-induced strand breaks and base damage through fast chemical repair of DNA radicals. *Carcinogenesis* 2001; 22(80);p.1189-93
11. Yang G, Liao J, Kim K, Yurkow EJ, Yang CS. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols *Carcinogenesis* 1998; 19;(4); p.611-16.
12. Mukthar H, Wang ZY, Katiyar SK, Agarwal R. Tea components: antimutagenic and anticarcinogenic effect. *Prev. Med* 1992;21:p.351-60.
13. Kawai K, Tsuno NH, Kitayama J et al. Epigallocatechin gallate, the main component of tea polyphenols, bind to CD4 and interferes with gp 120 binding. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:p.951-7.
14. Katiyar SK, Chala A, McCormics TS, Cooper KD, Muchtar H. Prevention of UVB-induced immuno-suppression in mice by the green tea polyphenol-epigallocatechin-3-gallate may be associated with alterations in IL-10 and IL-12 production. *Carcinogenesis* 1999; 20(11);p.2117-24.
15. Lu YP, Lou YR, Li XH et al. Conney AH. Stimulatory effect of oral administration of green tea or caffeine on ultraviolet light-induced increases in epidermal wild-type p-53, p21 (WAF1/CIP1), and apoptotic sunburn cells in SKH-1 mice. *Cancer research* 2000;60:p.4785-91.
16. Ahmad N, Feyes D K, Nieminen AL, Agarwal R, Mukthar H, Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst.*1997;89: p.1881-6.
17. Cruse JM, Lewis RE. Cytokines. In: *Atlas of immunology*. Boca Raton. CRC Press;1999:p.198-200.
18. Ratnaningsih T, Asmara W, Sismindari. Polyphenols extracted from the green tea (*Camellia sinensis*) augments the protective immune responses in mice challenged with *Salmonella typhimurium*. *Med J. Indones* 2004;113(1);p.1-7
19. Mulyarjo. Diagnosis dan penatalaksanaan KNF. In: Mulyarjo, Soedjak S, Wisnubroto, Harmadji S, Hasanusi R, Ariono editors. *Naskah lengkap Pendidikan Kedokteran Berkelanjutan III Ilmu Penyakit THT-KL: Perkembangan terkini diagnosis dan penatalaksanaan Tumor ganas THT-KL*; SMF IP THT FK Unair;Surabaya 2002;p.38-48.
20. Kentjono WA. Perkembangan terkini penatalaksanaan karsinoma nasofaring. Makalah lengkap simposium bedah kepala leher. Sub bagian onkologi bagian THT FKUI; Hotel Sahid Jakarta;1-2 Mei 2003.

21. Witte MC, Neel III HB., Nasopharyngeal Cancer. In: Calhoun KH, Healy GB, Johnson JT, Jackler RK, Pilsburry III H, Trady ME editors, Bailey BJ Head and Neck Surgery-Otolaryngology. 2nd ed. Philadelphia: Lippincot William & Wilkins; 2001:p.1414-26
22. Chew CT Nasopharynx (the post nasal space).In: Kerr AG editor. Scott- Brown's Otolaryngology. 5nd ed; London; Butterworth (4); Rhinology;1987:p.312-30
23. Feldmann I-U, Jund R. Wollenberg BW, Stadler P, Molls M, Changes in head and neck tumor hypoxic fraction during split course radiochemotherapy. Ann Otol Rhinol Laryngol 1999;108:p.73-78.
24. Mc Millan TJ, Steel GG. DNA damage and cell killing. In: Steel GG editor. Basic clinical radiobiology; 2nd ed. London; Oxford University Press 1997:p.58-68
25. Coleman CN. Beneficial Liesions : radiobiology meets cellular and molecular biology. Radiotherapy and Oncology 1993: 28:p.1-15.
26. Wara WM. Philips TL, Wara DW, Ammann AJ, Smith V, Immunosuppression following radiation therapy for carcinoma of the nasopharynx. Cancer 1975;123: (3).p.482-5.
27. Heimdal JH, Aarstad HJ, Olofsson J, Peripheral Blood Lymphocyte and Monocyte Function and Survival in Patients With Head and Neck Carcinoma. Laryngoscope 2000;110:p.402-7.
28. Boag. The time-scale of effects in radiation biology. In. Steel GG. Basic Clinical Radiobiology. 2nd edition. London : Oxford University Press,1975:p. 3-4.
29. McKenna G, Muschel RJ, The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation : a review. Radiotherapy and Oncology 1994;31:p.1-13.
30. Kentjono WA, Pengaruh vaksinasi BCG dalam meningkatkan respons T *helper* 1 (Th1) dan respons tumor terhadap radioterapi pada karsinoma nasofaring. [disertasi] Universitas Airlangga Surabaya 2001.
31. Richtsmesmeir WJ, Scher RL, Tumor biology and immunology of head and neck cancer. In: Bailey BJ ed, Head and Neck Surgery-Otolaryngology. Philadelphia : Lippincott co; 2001; p.1211-23.
32. Hussey DH, Wen BC. Principles of Radiation Oncology. In: Bailey BJ ed, Head and Neck Surgery-Otolaryngology. Philadelphia: Lippincott co; 2001; p.1199-1210.
33. McMillan TJ, Steel GG, DNA damage and cell killing. In: Steel GG editors, Basic clinical radiobiology, 2nd ed. Oxford; Oxford University Press Inc. 1997:p.58-69.
34. Horsman MR, Overgaard J, The oxygen effect. In: Basic clinical radiobiology. 2^{ed} ed. Oxford University Press Inc.,Oxford 1997: p.132-151.
35. Li L, Story M, Legerki RJ, Cellular respons to ionizing radiation damage. In. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 2001;49(4):p1157-1162.

36. Raben M, Walach N, Galili U, Schlesinger M, The effect of radiation therapy on lymphocyte sub populations in cancer patients. *Cancer* 1976;37: p.1417-21.
37. Morita M, Kuwano H, Araki K et al. Prognostic significance of lymphocyte infiltration following preoperative chemotherapy and hyperthermia for esophageal cancer. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 2001; 49(5):p.1259-66.
38. Baratawidjaja KG. *Imunologi kanker* In: *Imunologi dasar*. 6th ed. Jakarta; FKUI, 2004:p.363-73.
39. Oppenheim JJ, Ruscetti FW. Cytokines. In: Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB editors. *Medical Immunology*. 10^{ed}. Boston. McGraw-Hill;2003;p.148-64.
40. Wall L, Burke F, Barton C, Smyth J, Balkwill F. IFN- γ induced apoptosis in ovarian Cancer cells in vivo and invitro. *Clinical cancer research* 2003;9;p.2487-96.
41. Takikawa O, Kurtoiwa T, Yamazaki F, Kido R. Mechanism of interferon-gamma action. Characterization of indoleamine 2,3-dioxygenase in cultured human cells induced by interferon-gamma and evaluation of the enzyme-mediated tryptophan degradation in its anticellular activity. *J. Biol. Chem.* 1988;263(4): p.2041-8.
42. Wolf GT, Schmaltz S, Hudson H et al. Alternations in T-lymphocyte subpopulation in patients with Head and Neck Cancer. *Arch otolaryngol Head and Neck Surg.* 1987;113:p.1200-6.
43. Baxevanis CN, Reclos GJ, Grtzapis AD et al. Elevated Prostaglandin E2 Production by Monocytes is responsible for the depressed level of Natural killer and Lymphokine-Activated Killer Cell Function in Patients with Breast Cancer. *Cancer* 1993;72:p.491-501.
44. Wijaya S. Antioksidan: Pertahanan tubuh terhadap efek oksidan dan radikal bebas. *Maj Ilm Fak Kedokter Usakti*; Januari 1997;16(1):p.1659-72
45. Silalahi J. Senyawa polifenol sebagai komponen aktif yang berkhasiat dalam teh. *Maj kedokt indon*;52((10);Oktober 2002:p.361-4
46. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82:p.47-81.
47. Mayes PA, Lipid dan makna fisiologi In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW editors, *Biokimia Harper*;24^{ed}; EGC; Jakarta; 1997:p.151-62.
48. Chouaib S, Welte K, Mertelsmann R, Dupont B, Prostaglandin E2 acts at two disdicnt pathways of T lymphocyte activation: inhibition of interleukin 2 production and down regulation of transferin receptor expression. *The Journal of immunology* 1985:135(2) p.1172-9.
49. Patel A, Miller L, Ahmed K, Ondrey F. NF-Kappa-B down regulation strategies in head and neck cancer treatment. In: *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 2004:p.288-295.

50. Robb CS, Brown PR, 2001. Catechin in tea: chemistry and analysis. In: Brown PR, Grushka E editors, *Advances in Chromatography*.: Marcel Dekker ;2001;p.379-390
51. Rhee SJ, Kim MJ, Kwag OG, Effects of green tea catechin on prostaglandin synthesis of renal glomerular and renal dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian Pacific J. Clin. Nutr.* 2002;11(3):p.232-236.
52. Chow H-H S, Cai Y, Alberts DS, Hakim I, Don R, Shahi F, Crowell JA, Yang CS, Hara Y, Phase I Pharmacokinetic study of tea polyphenols following single-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E; *Cancer; Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2001;p.53-58.
53. Luo M, Kalmar K, Wahiqvist ML, O'Brien RC, Inhibition of LDL oxidation by green tea extract. *The Lancet* 1997;349:p.360-361.
54. Wang ZY, Huang MT, Lou YR, et al, Inhibitory effects of black tea., and decaffeinated green tea on ultraviolet B light-induced skin carcinogenesis in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-initiated SKH-1 mice; *Cancer Res* 1994;54;p.3428-35.
55. Erba D, Riso P, Colombo A, Giulio T. Supplementation of jurkat T cells with green tea extract decreases oxidative damage due to iron treatment. *J. Nutr.* 1999;129:p.2130-4.
56. Choi JH, Chang HW, Rhee SJ, Effect of green tea catechin on arachidonic acid cascade in chronic cadmium-poisoned rats. *Asia Pasific J Clin Nutr.* 2002;11(4): p.292-297.
57. Soetjijpto D. Karsinoma Nasofaring. In: *Tumor Telinga hidung tenggorok, diagnosis dan penatalaksanaan.* Jakarta;FKUI 2003:p.71-84
58. Hsu HC, Chen CL, Hsu MM, Lynn TC, Tu SM, Huang SC. Pathology of Nasopharyngeal Carcinoma, proposal of a new histologic classification correlated with prognosis. *Cancer* 1987;59:p.65-9.
59. Lanier A, Bender T, Talbot M, Wilmeth S et al. Nasopharyngeal carcinoma in Alaskan Eskimos, Indian and Aleuts: A review of cases and study od Epstein-Barr virus, HLA and environmental risk factor. *Cancer* 1980;46:p.324-26.
60. Roezin A. Food and social background of Nasopharyngeal cancer patient in Jakarta. *Med J Indones* 1997;6(4);p.249-52.
61. Bambang SS. WHO classification of the nasopharyngeal carcinoma in north central java. *Asean otolaryngology head and neck surgery journal* Vol 1 January 1997: p.1-6
62. Afandi Y. Evaluasi hasil radioterapi pada karsinoma nasofaring di lab/UPF THT FK UNPAD/RS Hasan Sadikin Bandung periosde 1 Januari 1986 sampai 31 Desember 1989. *Oto Rhino Laringologica Indonesiana* 1992;22(3):p.113-23.
63. Wa'id A Efek radioterapi pada sistem hemopoetik;Pusat standarisasi dan penelitian

keselamatan radioterapi badan tenaga atom nasional; Medika Oktober 1994;10:p.55-9.

64. D'Alesio V, Pacelli R, Durante M et al. Lymph nodes in the irradiated field influence the yield of radiation-induced chromosomal aberration in lymphocytes from breast cancer patients. *Int J. Radiation Oncology Biol Phys* 2003; 57(3):p.732-8.
65. West CML, Davidson SE, Elyan SAG et al. Lymphocyte radiosensitivity is a significant prognostic factor for morbidity in carcinoma of the cervix. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys* 2000;51(1);p.10-5.
66. Wang WD, Chen ZT, Li DZ et al. Correlation between DNA repair capacity in lymphocytes and acute side effects to skin during radiotherapy in nasopharyngeal cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 2005;11(14);p.5140-4.
67. Kim JK, Wu HG, Park IE, Ha SW. High cyclooxygenase-2 expression is related with distant metastasis in cervical cancer treated with radiotherapy. *Int. J Radiation oncology Biol. Phys.* 2003;55(1);p.16-20.
68. Schmitz A, Bayer J, Dechamps N, Gilles T. Intrinsic susceptibility to radiation-induced apoptosis of human lymphocyte subpopulation. *Int. J. Radiation oncology Biol.* 2003;57(3):p.769-78.
69. Baratawidjaja KG. *Imunologi neuro endokrin kanker* In: *Imunologi dasar*. 6th ed. Jakarta; FKUI, 2004;p.249-70.

Lampiran 1

Stadium klinik karsinoma nasofaring menurut UICC edisi V.

T menggambarkan keadaan tumor primer, besar dan perluasannya

- T1 : Tumor terbatas pada nasofaring
- T2 : Tumor meluas ke orofaring dan atau fosa nasal
- T2a : tanpa perluasan ke parafaring
- T2b : dengan perluasan ke parafaring
- T3 : Invasi ke struktur tulang atau sinus paranasal
- T4 : Tumor meluas ke intrakranial dan atau mengenai saraf otak, fosa infra temporal, hipofaring atau orbita

N menggambarkan keadaan kelenjar limfe regional

- N0 : Tidak ada pembesaran kelenjar
- N1 : Terdapat pembesaran kelenjar ipsilateral < 3 cm
- N2 : Terdapat pembesaran kelenjar bilateral < 6cm
- N3 : Terdapat pembesaran kelenjar > 6 cm atau ekstensi ke supraklavikular.

M menggambarkan metastasis jauh

- M0 : Tidak ada metastasis jauh
- M1 : Terdapat metastasis jauh

Berdasarkan TNM tersebut diatas, stadium penyakit dapat ditentukan

- Stadium I : T1,N0,M0
- Stadium IIA : T2a,N0,M0
- Stadium IIB : T1,N1,M0;T2a,N1,M0 atau T2b,N0-1,M0
- Stadium III : T1-2,N2,M0 atau T3,N0-2,M0
- Stadium IVA : T4,N0-2,M0
- Stadium IVB : Tiap T,N3,M0
- Stadium IVC : Tiap T, Tiap N, M1²³

Sumber: Naskah lengkap Pendidikan Kedokteran Berkelanjutan III Ilmu Penyakit THT-KL: Perkembangan terkini diagnosis dan penatalaksanaan Tumor ganas THT-KL oleh Mulyarjo, Surabaya, 2002.

Lampiran 2

PEMERIKSAAN LABORATORIUM IFN- γ

I. PEMERIKSAAN WHOLE BLOOD

1. Bahan

- Darah Heparin 3 ml
- RPMI + 2% FBS
- PHA
- Plate 24 *well*
- Tabung heparin
- Eppendorf tube (1,5 mL)
- Blue / yellow tip

2. Alat-alat

- Refrigerated centrifuge
- Laminar air flow Hood
- Inkubator CO₂
- Deep freezer
- Mikropipet

3. Cara kerja (untuk 1 pasien)

- a. Masukkan 900 μ l media RPMI 2% FBS dalam tiap *well* sebanyak 4 *well*.
- b. Tambahkan 100 μ l darah heparin pada tiap *well*, campur selama 1 menit
- c. Tambahkan 10 μ l PHA hanya pada 2 *well* saja, inkubasi 72 jam. (inkubasi no 3 & 4 pada inkubator dengan CO₂ 5% suhu 37⁰ C).
- d. Pengambilan supernatan setelah masa inkubasi

- Ambil supernatan, sentrifug 1500 rpm 10 menit.
- Ambil 250 μ l supernatannya (endapan dibuang) masukkan dalam eppendorf tube, 3 tube untuk tiap 2 well.
- Beri label identitas sampel + kultur PHA.
- Simpan dalam deep freezer dengan suhu -80° C.

II PEMERIKSAAN IFN- γ DENGAN METODA ELISA

1. Bahan

- Kit ELISA untuk IFN- γ dari Anogen Catalogue number EL 10024
- Sampel supernatan whole blood kultur

2. Alat

- Shaker
- Vootex
- Pipet multi chanel
- Mikro pipet
- Elisa reader
- Elisa washer
- Blue dan yellow tip

3. Cara kerja

a. Persiapan reagen

i. Buffer pencuci (1x)

- Tambahkan 60 ml buffer pencuci. (20X)
- Tambahkan 1200 ml dengan aquabidest, campur
- Volume kecil 1 bag buffer pencuci.
- Campur sebelum digunakan.

ii. Substrate solution

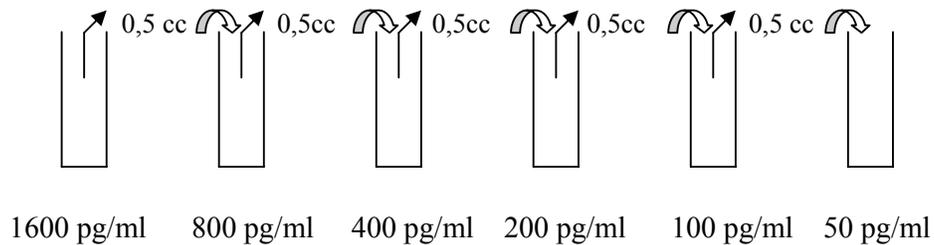
- Substrate A dan B dicampur sama banyak, 15 menit sebelum dipakai

b. Prosedur pemeriksaan

i. Untuk sampel supernatan kultur

- 1 fl + 2 ml Diluen II \rightarrow 1600 pg / ml

ii. Buat pengenceran bertingkat



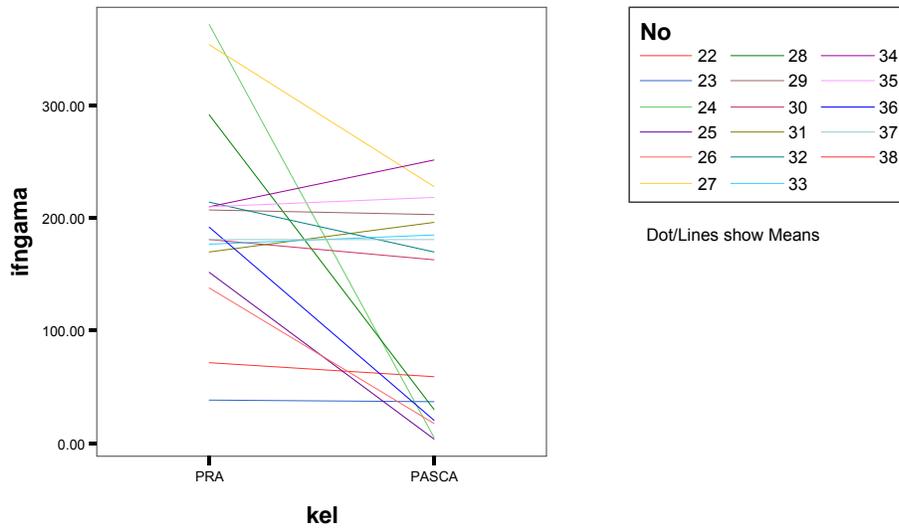
iii. Pemeriksaan ELISA

1. Siapkan buffer standart.
2. Masukkan 100 μ l buffer standart sample ke tiap well, inkubasi sambil digoyang (*tapping*) selama 1 jam.
3. Cuci dengan buffer pencuci , diulang selama 5 kali menggunakan Elisa washer, keringkan
4. Tambahkan 100 μ l *conjugate* tiap *well*, inkubasi inkubasi sambil digoyang dengan shaker selama 1 jam.
5. Siapkan substrate solution (persiapan no. 2)
6. Cuci dengan buffer pencuci , diulang selama 5 kali menggunakan Elisa washer, keringkan
7. Tambahkan *substrate solution* ditutup dan inkubasi selama 15 menit.
8. Baca pada 450 nm dalam 30 menit
9. Buat curva standart dari OD vs konsentrasi standart
10. Tentukan konsentrasi sampel dengan cara interpolasi pada curva standart.

Lampiran 3

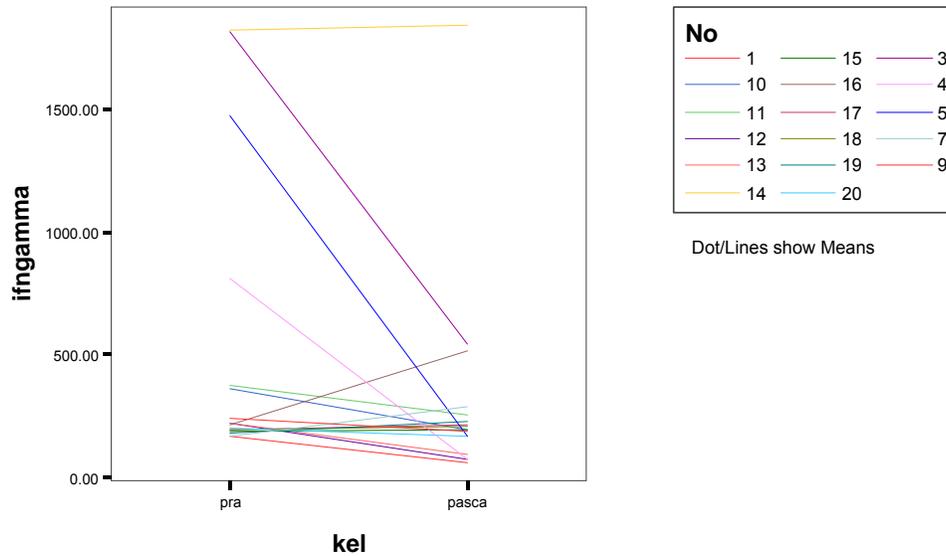
Lampiran 4

Lampiran 5



Perubahan kadar IFN- γ per pasien awal dan akhir pada kelompok kontrol.

Lampiran 6



Perubahan kadar IFN- γ per pasien awal dan akhir pada kelompok perlakuan.

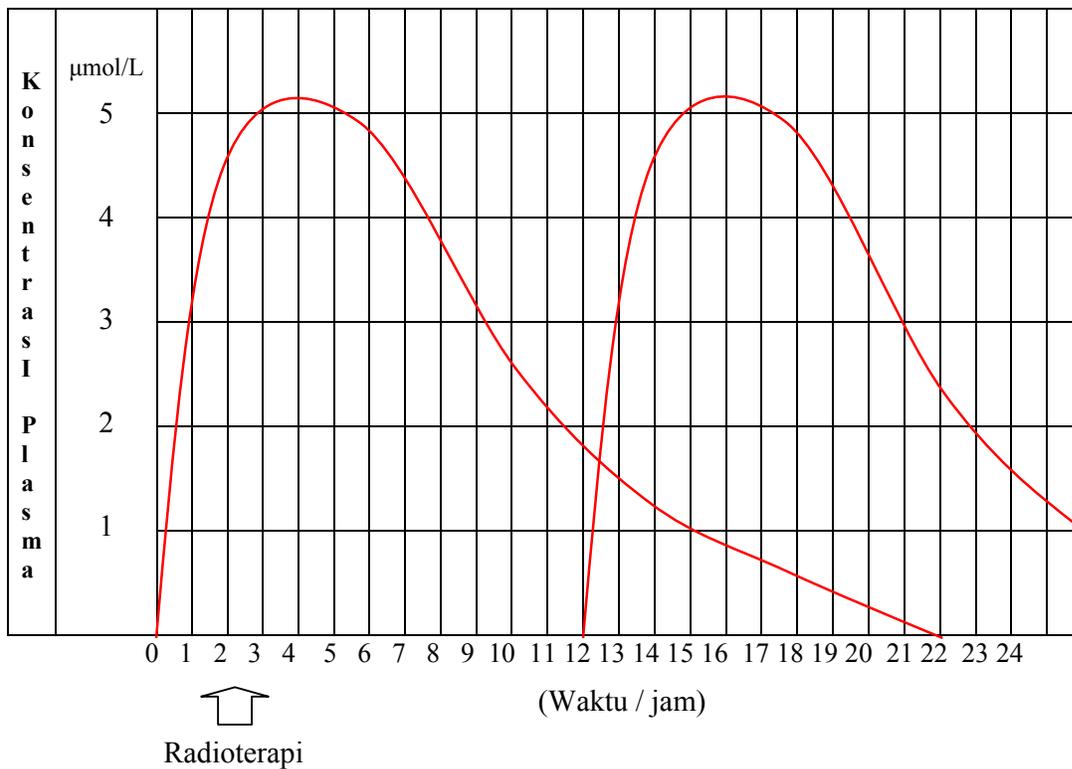
Lampiran 7

Farmako kinetik *catechin*

Polyphenols utama dalam teh hijau adalah catechins dengan derivatnya: epigallocatechin gallate (EGCG), epigallocatechin (EGC), epicatechin (EC) dan epicatechin gallate (ECG). Distribusi EGCG lebih rendah dibanding catechin lainnya. Pengeluaran lewat urin dalam bentuk konjugat dengan glucuronide sulfate. Bentuk konjugat umumnya lebih hidrofilik dan distribusi dalam tubuh terbatas. Setelah mengkonsumsi ekstrak murni 1,5 mmol

polyphenols, ECG mencapai kadar puncak setelah 4 jam, dengan waktu paruh ($t_{1/2}$) hampir 7 jam. EGCG mencapai kadar puncak setelah 2,9 jam dengan $t_{1/2}$ hampir 4 jam. EGC sangat cepat mencapai kadar puncak 1,4 jam dengan $t_{1/2}$ sekitar 1,4 jam.

Pada penelitian ini, seluruh sampel diberikan 4 kapsul *polyphenols* (setara dengan 986 mg EGCG atau $5\mu\text{mol/L}$ dalam darah) $1\frac{1}{2}$ - 3 jam sebelum radiasi. Puncak kurva pertama menunjukkan kadar EGCG yang dikonsumsi sebelum radiasi. Konsentrasi EGCG menurun terus dengan waktu paruh sekitar 4 jam. 10 jam setelah radiasi tampak kadar EGCG yang masih ada di dalam darah sekitar 25%. EGCG dosis kedua (sore hari) diberikan 10 jam sesudah radiasi. Tampak EGCG konsentrasi kembali tinggi dan dapat berfungsi sebagai *scavenging* radikal bebas sampai menjelang radiasi hari berikutnya.



Farmako-kinetik EGCG yang dikonsumsi subyek penelitian.

