

**EFEK *CYCLOPHOSPHAMID-TRANSFER FACTOR*
TERHADAP PROLIFERASI SEL (AgNOR)
DAN VOLUME TUMOR ADENO CA
MAMMAE MENCIT**

*The effects of cyclophosphamid-transfer factor on cells
proliferation (AgNOR) and volume of mice adeno ca mammae
tumor*



TESIS

Sri Anidya Utami

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

LEMBAR PENGESAHAN

EFEK *CYCLOPHOSPHAMID-TRANSFER FACTOR* TERHADAP PROLIFERASI SEL (AgNOR) DAN VOLUME TUMOR ADENO CA MAMMAE MENCIT

Disusun oleh

Sri Anidya Utami

Telah dipertahankan di depan tim penguji pada tanggal 13 September
2008 dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui Komisi Pembimbing

Pembimbing Pertama

Pembimbing Kedua

dr.Djoko Handojo,SpB,SpB.Onk
NIP:130.675.341

Prof.dr.Edi Dharmana,PhD,SpPark
NIP:140.119.299

Mengetahui,

Ketua Program Studi
Pendidikan Program Dokter Spesialis I Bedah

Ketua Program Studi
Magister Ilmu Biomedik

dr.Sidharta Darsoyono,SpB,SpU
NIP: 131.757.921

Prof.dr.H.Soebowo,SpPA
NIP: 130.352.549

KATA PENGANTAR

Seiring dengan selesainya penyusunan tesis ini , puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala limpahan kasih sayang dan rahmatNYA sehingga kami dapat menyelesaikan tesis ini. Salam dan sholawat senatiansa tersampaikan kepada junjungan kami Nabi Muhammad SAW atas segala suri tauladannya.

Penulis menyadari bahwa penelitian ini tidak akan mampu diselesaikan tanpa bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu dengan segala kerendahan hati kami mengucapkan terimakasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

1. Rektor UNDIP Semarang, Prof. DR.dr. Susilo Wibowo, Sp.And
2. Direktur Program Pasca sarjana UNDIP, Prof.Drs.Y.Warella, MPA, PhD
3. Prof.dr.H.Soebowo, SpPA(K) selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik atas segala kesempatan dalam memperoleh ilmu yang bermanfaat ini.
4. Prof.DR.dr.H.Tjahjono,SpPA(K),FIAC selaku pengelola Program Pascasarjana Ilmu Biomedik kelas khusus PPDS, terimakasih atas bimbingan, kemudahan ethical clearance dan selaku penguji kami.
5. dr.Djoko Handojo,SpB,SpB.Onk, sebagai Kepala Bagian Bedah dan juga sebagai pembimbing utama tesis kami. Terimakasih atas segala kemudahan, bimbingan dan dorongan morilnya.

6. dr.Sidharta Darsojono, SpB, SpU, sebagai Ketua Program Studi Pendidikan Spesialis Bedah FK UNDIP Semarang, atas kemudahan dalam perijinan penyusunan tesis ini.
7. Prof.dr.Edi Dharmana,PhD,SpPark, sebagai pembimbing kedua kami. Terimakasih atas waktu dan kesabarannya dalam membimbing penulisan tesis kami
8. dr.Noor WijayaHadi, M.Kes, PhD, atas bimbingan dan koreksinya selaku penguji kami
9. dr.Udadi Sadana, SpPA yang telah memberikan inspirasi penelitian kami dan membantu dalam proses penghitungan AgNOR
10. Para dosen pengajar kami di Magister Ilmu Biomedik dan PPDS Bedah atas segala bimbingannya.
11. Suamiku tercinta, dr.Andrie Setiabudi,M.Si Med, SpAn, atas perhatian dan supportnya dalam menyusun tesis ini. You are The best for me.
12. Untuk inspirasiku dan semangat hidupku, kedua anakku tersayang, Hernindra Rizaldi Pratama dan Sabrina Nafia Rizandya. Kebahagiaanmu adalah kebahagiaanku.
13. Kedua orang tuaku tersayang, Drs.Soenarto- Rr. Sumarmi, terimakasih atas dorongan moril dan doanya
14. Semua pihak yang membantu kelancaran proses penelitian kami (staf lab PA sentral RSUP Kariadi, para sekretaris, pak Dukut)

Semoga Allah membalas segala kebaikan dan melimpahkan hidayahNya untuk kita semua.

Semarang, September 2008

Sri Anidya Utami

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
RIWAYAT HIDUP.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
DAFTAR ISI.....	vii
ABSTRAK.....	ix
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. LATAR BELAKANG MASALAH.....	1
1.2. RUMUSAN MASALAH.....	5
1.3. TUJUAN PENELITIAN.....	5
1.4. MANFAAT PENELITIAN.....	6
1.5. KEASLIAN PENELITIAN.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1. KANKER.....	7
2.1.1. Apakah yang dimaksud dengan kanker.....	7
2.1.2. Kanker payudara.....	10
2.2. KEMOTERAPI.....	14
2.2.1. Kemoterapi pada kanker.....	14
2.2.2. <i>Cyclophosphamid</i>	19
2.3. IMUNOLOGI KANKER.....	22
2.3.1. Antigen tumor.....	22
2.3.2. <i>Imunosurveillance</i>	24
2.3.2.1. Limfosit T sitotoksik/ CTL.....	24
2.3.2.2. Peranan Sel NK Dalam <i>Imunosurveillance</i>	26
2.3.2.3. Makrofag.....	27
2.3.3. Mekanisme Penghindaran Sel Kanker.....	29
2.3.3.1. Kehilangan ekspresi Ag.....	29
2.3.3.2. <i>Down regulation</i>	29
2.3.3.3. Pelepasan (<i>shedding</i>) kompleks Ag-Ab.....	29
2.3.3.4. Produk tumor menekan respons imun, fungsi limfosit dan makrofag.....	30
2.3.3.5. <i>Ag masking</i>	30
2.3.3.6. Vaskularisasi.....	30
2.3.3.7. Faktor genetik.....	30
2.4. <i>TRANSFER FACTOR</i>	30
2.5. SIKLUS SEL.....	33
2.5.1. Mitosis.....	33
2.5.2. Pertumbuhan dan proliferasi Sel.....	37
2.6. HITUNG AgNOR.....	40
2.7. VOLUME TUMOR.....	43
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS.....	45
3.1. KERANGKA TEORI.....	45
3.2. KERANGKA KONSEP.....	46
3.3. HIPOTESIS.....	46
BAB IV METODE PENELITIAN.....	47

4.1. DESAIN PENELITIAN.....	47
4.2. RUANG LINGKUP PENELITIAN	47
4.3. WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN.....	47
4.4. SKEMA PENELITIAN	48
4.5. SAMPEL PENELITIAN.....	48
4.5.1. Kriteria inklusi.....	48
4.5.2. Kriteria eksklusi.....	49
4.5.3. Besar sampel.....	49
4.5.4. Cara pengambilan sampel.....	49
4.6. VARIABEL PENELITIAN.....	49
4.6.1. Variabel bebas.....	49
4.6.2. Variabel tergantung.....	50
4.7. DEFINISI OPERASIONAL	50
4.7.1. Proliferasi sel (AgNOR).....	50
4.7.2. Volume tumor.....	50
4.7.3. <i>Transfer factor</i>	50
4.7.4. <i>Cyclophosphamid</i>	51
4.8. ALAT DAN BAHAN PENELITIAN.....	51
4.8.1. Bahan untuk pemeriksaan histopatologi rutin.....	51
4.8.2. Alat transplantasi jaringan tumor pada mencit.....	51
4.8.3. Alat untuk sediaan penelitian dengan pewarnaan HE.....	52
4.8.4. Alat untuk pengecatan dan dokumentasi sediaan	52
4.9. PELAKSANAAN PENELITIAN.....	52
4.9.1. Alur kerja.....	53
4.9.2. Prosedur pemeriksaan.....	54
4.9.2.1 Prosedur transplantasi tumor.....	54
4.9.2.2 Prosedur pembuatan preparat histopatologi.....	55
4.10. ANALISIS DATA.....	57
BAB V HASIL PENELITIAN	58
5.1. Hasil Analisis Diskriptif	59
5.2. Analisa Uji Normalitas	62
5.3. Signifikansi dari perbedaan Variabel.....	62
5.3.1 Volume Tumor.....	62
5.3.2 Proliferasi Sel (AgNOR).....	63
5.4. Pengaruh Proliferasi Sel (AgNOR) Terhadap Volume Tumor.....	64
BAB VI PEMBAHASAN.....	66
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN.....	73
DAFTAR PUSTAKA.....	74
LAMPIRAN	80

ABSTRAK

Latar belakang : penderita kanker mengalami penurunan respon imun akibat supresi sistem imun oleh sel kanker dan modalitas terapi sistemik. *Transfer factor* merupakan oligoribonukleotida yang mampu meningkatkan fungsi memori sel imun dan meningkatkan jumlah sel NK. Apakah TF dapat menghambat proliferasi sel dan volume tumor masih belum dapat dibuktikan.

Tujuan : Untuk menganalisa efek pemberian *cyclophosphamid-transfer factor* terhadap proliferasi sel dan volume tumor Adeno Ca mammae mencit

Metode : Penelitian eksperimental laboratorik dengan desain “*Post test only control group*”. Menggunakan mencit betina C3H murni berjumlah 20 ekor. Sampel dibagi 4 kelompok: K sebagai kontrol, P1 diberi *cyclphosphamid*, P2 diberi *transfer factor* dan P3 diberi kombinasi *cyclophosphamid-transfer factor*. Sebagai variabel tergantung adalah proliferasi sel (AgNOR) dan volume tumor. Analisis perbedaan proliferasi sel (AgNOR) dan volume tumor antara keempat kelompok menggunakan uji ANOVA dengan tingkat kepercayaan 95 %.

Hasil : Perbedaan proliferasi sel (AgNOR) diperoleh nilai $p < 0,001$. Terdapat perbedaan bermakna antara keempat kelompok variabel. Perbedaan volume tumor didapatkan nilai $p = 0,086$, sehingga tidak didapatkan perbedaan antara keempat kelompok. Angka korelasi antara proliferasi sel (AgNOR) dan volume tumor didapatkan nilai 0,496 dengan nilai signifikansi 0,026. Ini berarti hubungan antara proliferasi sel (AgNOR) dan volume tumor bersifat substansial. Pengaruh proliferasi sel (AgNOR) terhadap volume tumor sebesar 20,4%, 79,6% volume tumor dipengaruhi oleh faktor lain yang tidak diteliti dalam penelitian ini.

Kesimpulan : *cyclophosphamid-transfer factor* mempunyai efek sinergis dalam menurunkan proliferasi sel tumor.

Kata Kunci :

kanker payudara, *cyclophosphamid*, *transfer factor*, AgNOR, volume tumor

ABSTRACT

Background : cancer patients have decreased immune system due to suppression by cancer cells and systemic therapy. Transfer factor is oligoribonukleotida that improve the memory function of T cell and the amount of NK cell. It still controversial whether TF has capability in reducing cells proliferation and the tumor volume.

Purposes : to analyze the effects of cyclophosphamid-transfer factor on cells proliferation and the volume of mice adeno Ca mammae tumor.

Methods : experimental laboratory research has been done by “ post test only control group design “. Twenty female pure C3H mice were divided into four groups: K as a control group, P2 given the cyclophosphamid, P3 given the transfer factor and P4 given the cyclophosphamid – transfer factor combination. As a dependent variable were cells proliferation (AgNOR) and tumor volume. ANOVA test was used to analyze the differences of cells proliferation (AgNOR) and tumor volume among the four groups with 0,05 significance level.

Results : The difference of cells proliferation (AgNOR) was $p < 0,001$. There were differences among the four groups. The difference of tumor volume was $p = 0,086$. There were no differences among the four groups. Correlation number between cells proliferation (AgNOR) and tumor volume was 0,496 value with the significant level 0,026. There is a substantial correlation between cells proliferation (AgNOR) and tumor volume. The influence of cells proliferation (AgNOR) to tumor volume was 20,4% and 79,6% tumor volume was influenced by other factors that hasn't been conducted in this research.

Conclusion : cyclophosphamid-transfer factor has a synergistic effect to the cells proliferation tumor

Key words :

Breast cancer, cyclophosphamid, transfer factor, AgNOR, tumor volume

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Faktor resiko kanker payudara.....	11
Tabel 2. Hasil analisis diskriptif berdasarkan volume tumor (cc).....	59
Tabel. 3.Hasil analisis diskriptif berdasarkan proliferasi sel (AgNOR).....	60
Tabel 4. Hasil uji Post Hoc dari proliferasi sel.....	63

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Skema mekanisme perubahan malignansi pada sel normal.....	9
Gambar 2. Grafik persentasi kematian wanita penderita kanker payudara berdasarkan umur.....	10
Gambar 3. Grafik prevalensi mortalitas akibat kanker payudara di beberapa negara.....	11
Gambar 4. Grafik relasi dosis terapi dan jumlah sel yang tahan hidup.....	14
Gambar 5. Rumus bangun <i>cyclophosphamid</i>	19
Gambar 6. <i>Cross-link</i> pada <i>cyclophosphamid</i>	20
Gambar 7. Mekanisme penghancuran sel tumor oleh sistem imun.....	28
Gambar 8. Siklus sel.....	34
Gambar 9. Mitosis pada sel somatik.....	36
Gambar 10. Pengendalian siklus sel.....	38
Gambar 11 Sinyal eksternal pertumbuhan sel.....	39
Gambar 12. Sinyal pertumbuhan sel.....	39
Gambar 13. Grafik box plot dari volume tumor.....	59
Gambar 14 Grafik box plot dari proliferasi sel.....	61

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 : Hasil mikroskopis pewarnaan AgNOR dan alat pletismometer	80
Lampiran 2 : Tabulasi input.....	81
Lampiran 3 : Output Volume Tumor dan Output Proliferasi Sel.....	82
Lampiran 4 : Hasil analisis uji normalitas.....	83
Lampiran 5 : Signifikansi Perbedaan Volume Tumor.....	84
Lampiran 6: Signifikansi Perbedaan Proliferasi sel (AgNOR).....	85
Lampiran 7 : Hasil Uji Pos Hoc Proliferasi Sel.....	86
Lampiran 8 : Korelasi Antara Volume Tumor dan Proliferasi Sel.....	87
Lampiran 9 : Regresi Antara Volume Tumor dan Proliferasi Sel.....	88
Lampiran10 : Ethical Clearance.....	89

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. LATAR BELAKANG

Di dunia, kanker payudara merupakan lima besar kanker penyebab kematian setelah kanker paru, kanker lambung, kanker hati dan kanker kolon. Kanker payudara merupakan keganasan paling banyak ditemukan di dunia bahkan merupakan salah satu kanker tertua yang ditemukan di dunia. Di USA, kanker payudara merupakan kanker dengan prevalensi tertinggi untuk keganasan pada wanita dan penyebab kematian kedua setelah kanker paru. Pada tahun 2007, kanker payudara merupakan 7% penyebab kematian karena kanker dan 2% penyebab kematian pada umumnya di USA.^{1,2} Penelitian di Semarang melaporkan pada tahun 2001 ditemukan kasus kanker payudara sebanyak 769 kasus, dan masih sama dengan tahun-tahun sebelumnya berada pada peringkat kedua tertinggi kasus keganasan pada wanita setelah kanker leher rahim³. Angka-angka diatas terus meningkat sejak tahun 1970.

Dengan berkembangnya teknologi dan pengetahuan kedokteran, modalitas terapi kanker menjadi lebih beragam diantaranya dengan pembedahan, kemoterapi, radioterapi, hormonal terapi, biologi terapi dan imunoterapi. Penangan sistemik tak dapat dihindari berhubung sudah terdapatnya metastasis mikro begitu tumor primer terpalpasi. Kemoterapi merupakan salah satu modalitas terapi sistemik yang sering digunakan. Kemoterapi pada kanker payudara tidak cukup diberikan hanya dengan satu regimen.⁴

Diantara regimen kemoterapi untuk kanker payudara yang sering digunakan adalah *cyclophosphamid*, *adriamycin*, *5 Fluoro Urasil (5FU)* dan paklitaksel. Mulai tahun 2007 sebagian daftar obat yang masuk Daftar Pedoman Harga Obat (DPHO) dipangkas. Diantara regimen kemoterapi kanker payudara yang paling murah dan masih masuk dalam daftar DPHO Asuransi Kesehatan keluarga Miskin (ASKESKIN) adalah *cyclophosphamid*.

Efek samping *cyclophosphamid* yang sering terjadi adalah : lekopeni yang dapat meningkatkan insiden infeksi dan hilangnya periode menstruasi. Derivat aktif *cyclophosphamid*, *hidroxy-peroxy-cyclophosphamid*, menekan aktivitas sel *natural killer (NK)*, hal ini memperberat efek immunosupresan *cyclophosphamid*. Penderita kanker sendiri mengalami supresi imun dan modalitas terapi kanker yang juga mempengaruhi sistem imun itu sendiri.

Sistem imun sangat diperlukan untuk membunuh sel-sel kanker dan pertahanan tubuh terhadap antigen. Sel kanker dikenal tubuh sebagai benda asing, tubuh merespon dengan sel imun secara humoral maupun seluler. Tubuh mempunyai kemampuan untuk *imunosurveillance* terhadap sel kanker dan sel yang bermutasi untuk mencegah perkembangan sel kanker tersebut. Namun kemampuan ini terbatas (maksimal 10^{4-5} sel).⁵ Dilain pihak sel kanker berusaha menghindari dari target sistem imun kita sehingga terhindar dari pengawasan sel imun, keadaan ini disebut *immunological escape*.

Dalam *imunosurveillance* kanker, peranan imunitas seluler lebih dominan dibanding imunitas humoral terutama adalah sel NK. Sel NK dapat berperan dalam imunitas spesifik maupun non spesifik dan kemampuannya melisiskan sel

kanker tidak bergantung pada *Major Histocompatibility Complex* (MHC) sel sasaran.⁶

Kanker payudara merupakan penyakit heterogen dengan penyebab yang multifaktorial maka penanganan terpadu merupakan modalitas utama untuk mendapatkan kualitas hidup yang baik. Penangan terpadu terdiri dari :

1. Penanganan lokal, yaitu tindakan bedah dan radioterapi
2. Penanganan sistemik, terdiri dari: kemoterapi, hormonal terapi, imunoterapi dan biologi terapi.⁷

Transfer factor (TF) merupakan salah satu imunostimulator yang diproduksi oleh limfosit T. TF dapat mentransfer kemampuan pengenalan terhadap patogen ke sel walaupun tidak kontak dengan patogen tersebut (sebagai fungsi memori) dan dapat meningkatkan kemampuan sistem imun dalam bereaksi terhadap patogen dan memicu pengenalan limfosit T terhadap antigen. Dulu TF diperoleh dari dialisa sel limfosit tetapi sekarang dapat diperoleh dari pemurnian kolostrum sapi.^{8,9}

Darryl See dkk telah melakukan penelitian penggunaan TF terhadap 20 pasien kanker dengan umur rata-rata 49,3 dan masing-masing pasien mengidap kanker stadium III-IV yang telah divonis mati oleh ahli onkologi dengan harapan hidup 3,7 bulan. Pada penelitian tersebut masing-masing pasien diberi 9 kapsul TF per hari ditambah dengan general nutrien lain (antioksidan, enzim digestif, prebiotik dan multivitamin). Setelah 8 bulan, 16 pasien masih hidup, diantaranya mengalami remisi dan stabil. Pada penelitian tersebut dalam waktu 4 minggu fungsi NK sel meningkat luar biasa yaitu sekitar 400%. Komponen campuran

lebih meningkatkan fungsi NK sel daripada komponen terpisah. Studi ini menunjukkan kemampuan tersebut ada pada TF yang mampu mempengaruhi nutrisi lain.⁸

Gold standard penilaian sel kanker untuk diagnostik, evaluasi terapi dan prognostik pasien adalah dengan histopatologi. Dalam penilaian histopatologi sel kanker, proliferasi sel merupakan faktor penilaian utama. Penilaian histopatologi yang sekaligus dapat menilai perubahan gen sel kanker dan proliferasi sel dapat ditunjukkan dengan melihat kuantitas *nuclear organization region* (NOR). NOR dapat dilihat dengan mikroskop cahaya setelah dilakukan pewarnaan dengan perak (Ag). Pewarnaan perak untuk melihat NOR disebut AgNOR.¹⁰

Pemeriksaan imunohistokimia untuk prognostik faktor *Estrogen Reseptor* (ER), *Progesteron Reseptor* (PR), gen Tumor Protein (TP) 53, protein Retinoblastoma (pRb) dan *Human Epidermal growth factor Receptor-2* (Her-2) sebaiknya dilakukan secara rutin untuk evaluasi terapi dan penentuan langkah terapi selanjutnya.⁷ Namun sampai saat ini pemeriksaan imunohistokimia tersebut masih cukup mahal.

Problema penanganan kanker pada saat ini diantaranya problem diagnostik, terapi dan penentuan prognostik yang akurat, efektif, mudah dan murah. Hitung AgNOR tidak hanya mampu melihat proliferasi sel, pemeriksaan ini harganya murah dan mudah pengerjaannya.

Penelitian ini ingin menganalisis pengaruh pemberian kemoterapi (*cyclophosphamid*) dan TF terhadap proliferasi sel (AgNOR) dan volume tumor pada adeno ca mammae mencit C3H. Penelitian ini ingin menganalisis hubungan

antara volume tumor dengan proliferasi sel. Harapannya penelitian ini dapat meningkatkan *quality of life* pada penderita kanker pada umumnya dan penderita kanker payudara pada khususnya.

1.2. RUMUSAN MASALAH

Dari uraian latar belakang di atas dapat diambil rumusan masalah:

1. Apakah ada pengaruh pemberian *cyclophosphamid*-TF terhadap proliferasi sel (AgNOR) jaringan adeno ca mammae mencit C3H?
2. Apakah ada pengaruh pemberian *cyclophosphamid* - TF terhadap volume tumor jaringan adeno ca mammae mencit C3H?
3. Apakah ada pengaruh proliferasi sel (AgNOR) terhadap volume tumor pada adeno ca mammae mencit C3H yang diberi *cyclophosphamid* – TF ?

1.3. TUJUAN PENELITIAN

Tujuan Umum

Mengetahui efek pemberian *cyclophosphamid*-TF terhadap proliferasi sel (AgNOR) dan volume tumor adeno ca mammae.

Tujuan Khusus

1. Menganalisis pengaruh pemberian *cyclophosphamid*-TF terhadap proliferasi sel (AgNOR) jaringan adeno ca mammae mencit C3H
2. Menganalisis pengaruh pemberian *cyclophosphamid* - TF terhadap volume tumor jaringan adeno ca mammae mencit C3H.
3. Menganalisis pengaruh proliferasi sel terhadap jumlah volume tumor pada adeno ca mammae yang mendapat terapi *cyclophosphamid* - TF.

1.4. MANFAAT PENELITIAN

1. Membuktikan teori yang ada dengan kenyataan data yang diperoleh.
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan informasi mengenai pentingnya penggunaan imunostimulator dalam terapi kanker payudara
3. Menambah khasanah pustaka tentang studi adeno ca mama dari aspek biomedik.
4. Bila hasil penelitian ini terbukti lebih banyak manfaatnya daripada kerugian yang ditimbulkan, diharapkan pemberian TF dapat meningkatkan kualitas hidup penderita kanker payudara.

1.5. KEASLIAN PENELITIAN

Darryl See dkk mengkombinasikan TF dengan nutrien lain pada 20 penderita kanker stadium III-IV dengan umur rata-rata 49,3th. Hasil yang diperoleh mampu meningkatkan fungsi sel NK sekitar 400%.⁸ *Ministry of Health and Social Development of The Russian Federation* telah melakukan studi klinis pemberian TF untuk berbagai penyakit seperti : HIV, hepatitis B dan C, herpes, osteomielitis, dan Ca lambung mampu memperbaiki efektivitas dan lama terapi.³² Fabre menyimpulkan bahwa pemberian TF dan kemoterapi konvensional mempunyai efek sinergis dalam menghambat proliferasi bakteri tuberkulosis.³³

Sepanjang pengetahuan peneliti, penelitian efek TF pada kanker payudara yang diberi *cyclophosphamid* belum pernah dilakukan. Penilaian histopatologi akibat pengaruh pemberian TF belum ada yang dipublikasikan . Berdasarkan studi literatur, seberapa besar pengaruh proliferasi sel terhadap penambahan volume tumor belum dapat ditentukan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. KANKER

2.1.1. Apakah yang dimaksud dengan kanker

Kanker merupakan neoplasma ganas. Neoplasma didefinisikan sebagai masa jaringan abnormal yang tumbuh berlebihan dengan tidak ada koordinasi dengan pertumbuhan jaringan normal dan tetap tumbuh dengan cara berlebihan setelah stimulus yang menyebabkan perubahan tersebut berhenti. Pada dasarnya awal semua neoplasma ialah hilangnya tanggapan terhadap kendali pertumbuhan normal. Kanker dapat tumbuh dari satu atau lebih sel. Neoplasma terjadi akibat mutasi dari gen.¹¹ Mutasi gen pada organisme terjadi akibat adanya faktor yang menyebabkan kerusakan gen :^{11,12}

1. Konstitusi Genetika.

Konstitusi genetika berupa kerusakan struktur dan atau kerusakan fungsi dan sistem kerja. Kerusakan struktur berupa perubahan urutan, sisipan atau pengurangan nukleotida, perpindahan gen maupun persilangan sebagian kromosom. Kerusakan fungsi dan sistem kerja yang menentukan kemampuan tubuh untuk memperbaiki kerusakan gen dalam kromosom, menetralkan karsinogen yang masuk ke dalam tubuh, menjaga imunitas tubuh dan mematikan sel kanker yang baru terbentuk .

2. Karsinogenesis.

Zat yang dapat menimbulkan kanker, karsinogen kimiawi :

- a. Basa analog, berpengaruh saat repair *Deoxiribonukleotida Acid* (DNA), yang digunakan basa analog bukan basa yang sebenarnya.
- b. *Alkilating agent*, penambahan alkil pada nukleotida sehingga merubah ekspresi DNA.
- c. *Hidroksilating agent*, menghidroksilasi DNA.
- d. *Deaminating agent*, pengurangan gugus amin.
- e. *Intercalating agent*, agent yang menyela urutan DNA

3. Sinar Ionisasi.

Hanya Ultraviolet B (UVB) yang bersifat karsinogen. UVA mempunyai panjang gelombang pendek, tidak menembus kulit. UVC punya daya tembus kulit lebih poten dan lebih bersifat mutagen dibanding UVB, tetapi UVC sudah diblok oleh atmosfer. Cara UVB merubah gen :

- a. Menimbulkan formasi dimer pirimidin sehingga dalam transkripsi mRNA tidak dapat membaca.
- b. Menekan viabilitas dan fungsi limfosit
- c. Menyebabkan mutasi Ras dan TP53

Mekanisme ionisasi radiasi berlangsung melalui 2 cara:

- a. Secara langsung merusak DNA sehingga menyebabkan mutasi gen
- b. Efek dari ionisasi air dan elektrolit yang menghasilkan radikal hidroksil yang dapat merusak membran sel, DNA maupun protein sel

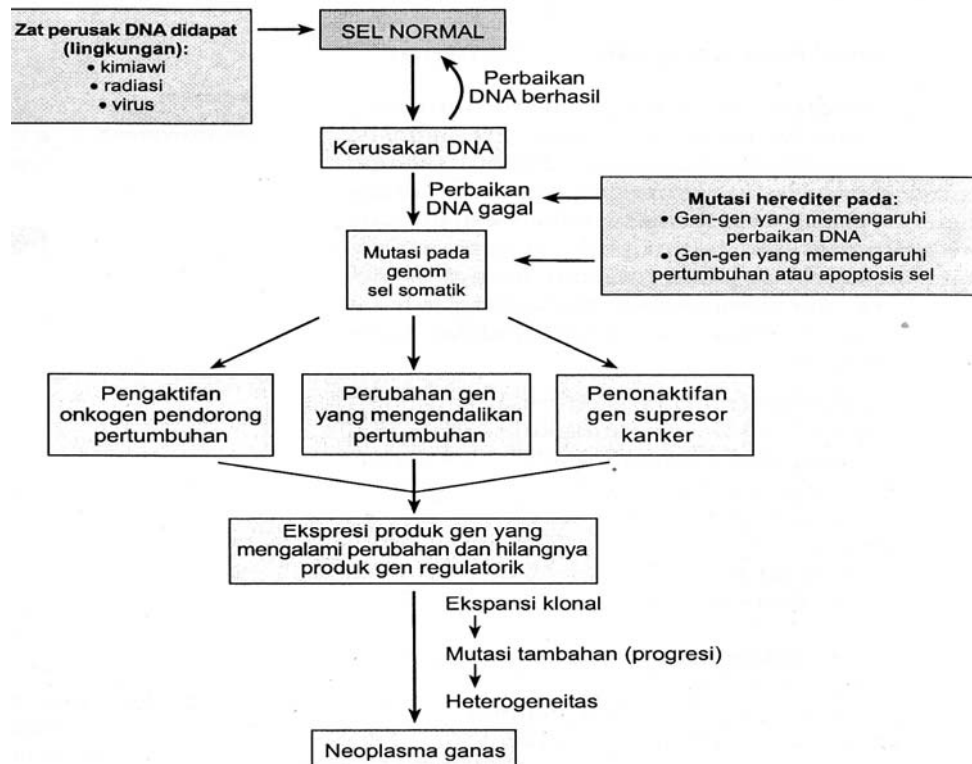
4. Infeksi Virus.

Protein DNA virus setelah menembus membran sel mengadakan fusi dengan protein DNA hospes. Fusi DNA virus dan hospes menimbulkan mutasi gen.

Manifestasi timbulnya kanker tergantung sistem imunitas tubuh dan mekanisme penghindaran virus.

5. Keadaan klinis tertentu yang merupakan predisposisi terjadinya neoplasma ganas :

- a. Replikasi sel regeneratif persisten : misal pada karsinoma sel squamosa di tepi suatu fistula kulit atau pada luka kulit yang tidak sembuh-sembuh
- b. Proliferasi hiperplastik dan displastik : karsinoma bronkogenik pada mukosa displatik akibat kebiasaan merokok.
- c. Gastritik atropi kronik : karsinoma lambung pada anemia pernisiiosa

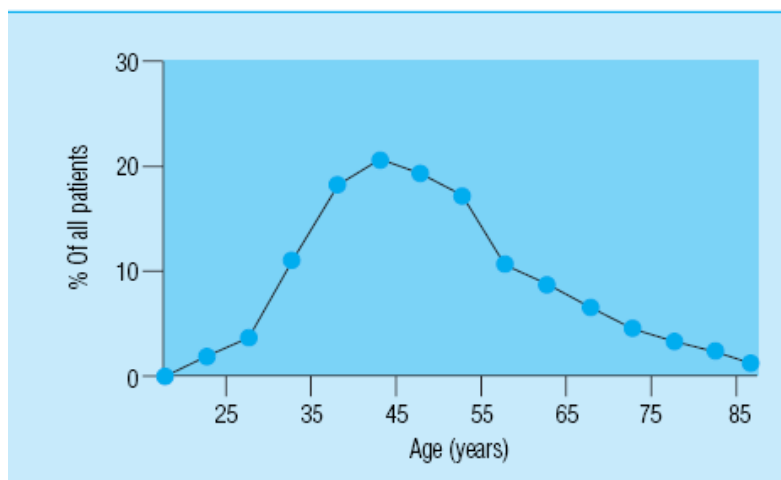


Gambar 1. Skema mekanisme perubahan malignansi pada sel normal. Diambil dari buku Ajar Patologi¹¹

2.1.2. Kanker Payudara

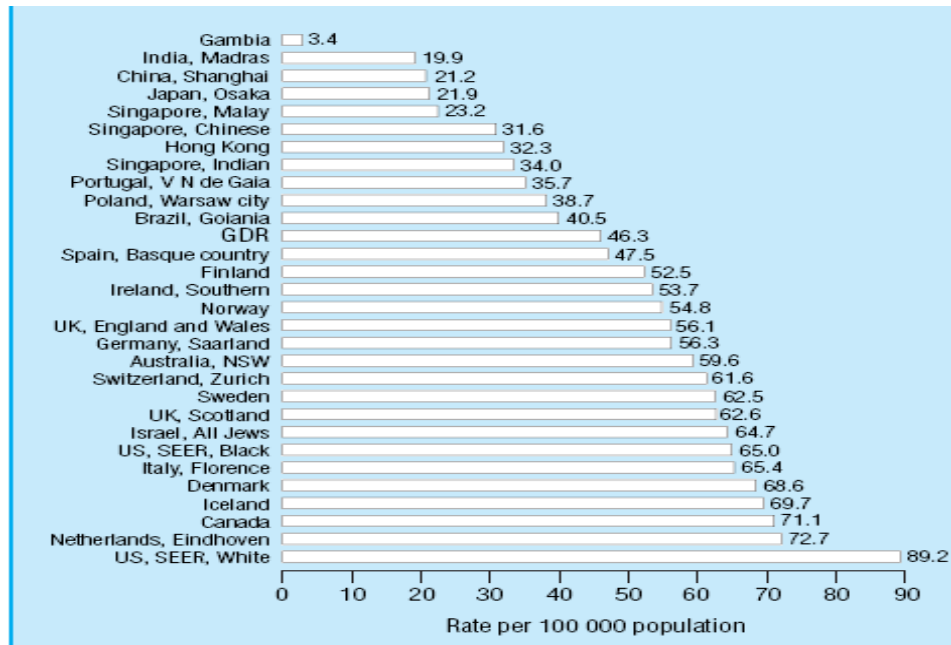
Kanker payudara merupakan kanker tertua yang ditemukan di dunia. Setiap tahun ditemukan satu juta kasus kanker payudara baru di dunia, angka ini merupakan 18% dari keseluruhan angka keganasan yang ada. Di tahun 2005, kanker payudara menyebabkan 1% dari keseluruhan angka kematian dunia dan 5% dari angka kematian akibat kanker.^{1,2} Di Indonesia, kanker payudara menduduki urutan kelima dari jenis morbiditas penyakit menahun dan urutan ketiga dari sebab kematian.⁷

Kematian akibat kanker payudara tersering pada usia produktif yaitu umur 40-50 tahun dan mengalami *flatening* kurva statistik setelah umur menopause, seperti terlihat pada kurva berikut:¹³



Gambar 2. Grafik persentasi kematian wanita penderita kanker payudara berdasarkan umur. Diambil dari ABC Breast Cancer¹³

Perbedaan demografi antara wanita yang tinggal di negeri barat dan timur menunjukkan perbedaan prevalensi mortalitas akibat kanker payudara, mungkin hal ini berkaitan dengan faktor genetik dan perbedaan gaya hidup.



Gambar 3. Grafik prevalensi mortalitas akibat kanker payudara di beberapa negara. Diambil dari ABC Breast Cancer ¹³

Tabel. 1 . Faktor resiko kanker payudara. Diambil dari ABC Breast Cancer

13

FAKTOR	RR	Kelompok Resiko Tinggi
Umur	>10	Pada umur tua (>40th)
Negara	5	Negara berkembang
Umur saat menarche	3	Sebelum umur 11
Umur saat menopause	2	Setelah 54th
Umur saat hamil pertama	3	Saat umur 40th
Riwayat keluarga	≥ 2	Menderita kanker payudara saat umur masih muda
Pernah menderita kanker jinak	4-5	<i>Atypical hiperplasia</i>

Kanker di luar payudara	>4	
Status sosial	2	
Diet	1,5	Banyak konsumsi lemak jenuh
BMI premenopause	0,7	BMI>35
BMI post menopause	2	BMI>35
Konsumsi alkohol	1,3	
Riwayat terkena paparan radiasi	3	Terkena paparan abnormal setelah umur 10th
Kontrasepsi oral	1,24	Menggunakan
Terapi hormonal	1,35	Menggunakan lebih dari >10th
Diethylstilbestrol	2	Menggunakan saat hamil

Untuk wanita Indonesia, faktor konsumsi alkohol tidak signifikan sebagai faktor resiko kejadian kanker payudara.

Di Indonesia 96% kelainan di payudara yang berbentuk tumor justru dikenali oleh penderita sendiri sehingga memudahkan dokter untuk mendeteksi kanker payudara namun sayangnya hal ini menyebabkan penemuan kanker payudara biasanya sudah pada stadium yang lanjut. Berbeda dengan di negara yang sudah mewajibkan warga negaranya untuk asuransi kesehatan, setiap wanita usia subur diwajibkan untuk memeriksakan payudaranya dengan mamografi secara berkala sehingga kanker payudara ditemukan pada stadium dini jauh lebih banyak.^{7,14}

Metode penegakkan diagnosa kanker payudara yang belum palpabel adalah dengan mamografi dan cara ini termasuk yang paling baik untuk skrining pada wanita usia diatas 35 tahun. Pemeriksaan lebih awal dengan melakukan pemeriksaan payudara sendiri (SADARI) dengan baik dan biopsi *Fine Needle Aspiration Biopsy* (FNAB) lebih dini pada lesi fibrokistik diharapkan dapat membantu menemukan kanker pada stadium dini. *Gold standard* diagnosa kanker payudara adalah pemeriksaan histopatologi. Tindakan invasif diagnostik yang sekarang dikerjakan rutin adalah FNAB ketepatan hasil FNAB ditangan sitolog yang berpengalaman adalah 80-98% dengan spesifitas mendekati 100%.^{14,15}

Untuk panduan penanganan, kanker payudara dikelompokkan :

1. Non Metastazing in Situ Lesion yaitu *Ductal Carcinoma In Situ* (DCIS) dan *Lobular Carcinoma In Situ* (LCIS)
2. Stadium Dini Invasi kanker (Stadium I, beberapa stadium II)
3. Stadium Intermediate Operabel (stadium II dan III A)
4. Stadium In Operabel, Stadium Lanjut lokal (stadium III B)
5. Stadium Lanjut (stadium IV)

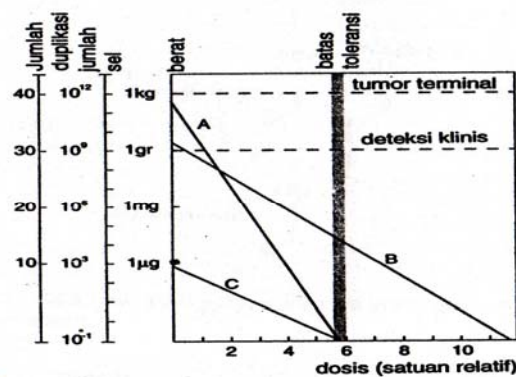
WHO menyatakan bahwa 1/3 dari seluruh kanker payudara sebenarnya dapat dicegah, 1/3 lainnya dapat disembuhkan dan 1/3 sisanya tidak dapat disembuhkan tapi kualitas hidupnya dapat diperbaiki. Pencegahan kanker payudara secara primer dilakukan oleh setiap wanita untuk menghindarkan diri dari setiap faktor yang dapat menyebabkan timbulnya kanker dan mempengaruhi hormonal millieu pada wanita yang beresiko tinggi menderita kanker payudara. Pencegahan kanker payudara secara sekunder dilakukan dengan penyuluhan

terhadap masyarakat dan skrining pada masyarakat yang beresiko tinggi mendapatkan kanker payudara atau pada individu tertentu walaupun belum terdapat gejala kanker.^{7,13,14,15}

2.2. KEMOTERAPI

2.2.1. Kemoterapi pada Kanker

Kemoterapi merupakan terapi sistemik sehingga terutama diindikasikan untuk malignansi sistemik yaitu tumor-tumor yang penyebarannya telah dibuktikan atau diduga telah menyebar dan tumor yang tidak operabel. Terapi dengan sitostatika berdasarkan pada eliminasi sel-sel tumor dengan sesedikit mungkin efek yang merugikan terhadap jaringan normal. Sel kanker tumbuh potensial lebih cepat daripada jaringan normal. Karena itu zat-zat penghambat pertumbuhan dapat memperlambat progresi proses penyakit, tetapi untuk penyembuhan sesungguhnya diperlukan sel tumor yang paling akhir harus juga terbunuh.¹⁶



Gambar 4 . Relasi dosis terapi dan jumlah sel tumor yang tahan hidup. Diambil dari buku Onkology¹⁷

Suatu grafik yang menggambarkan logaritma jumlah sel yang masih hidup terhadap jumlah tindakan (=intensitas tindakan), memberikan hubungan linier dosis–efek. Pada gambar di atas digambarkan beberapa kurva ketahanan hidup. Suatu tumor yang beratnya 1kg mengandung kira-kira 10^{12} sel tumor dan terjadi dengan paling sedikit 40 duplikasi sel asal yang berubah maligna. Batas bawah deteksi klinik (dengan palpasi, rontgen dll) berada pada 10^9 sel, ini berarti satu tumor seberat 1gr.¹⁷

Sitostatika menurut asal dan mekanisme kerjanya dibagi beberapa golongan .^{16,17,18,19}

1. Anti Metabolit, yang termasuk golongan ini adalah sitosin-arabinosid, 5-fluorourasil dan metotrexat. Golongan ini berhubungan erat dengan unsur bangun asam nukleat sehingga dapat ikut serta dalam sistem transport dan proses metabolit sampai strukturnya berbeda memblokade proses selanjutnya.
2. Zat Pengalkil, meliputi sejumlah derivat nitrogen mustard seperti melfalan, klorambusil dan *cyclophosphamid*. Mereka mempunyai satu atau dua alkil yang reaktif yang merubah ekspresi nukleotida DNA. *Cross-link* yang terjadi menyebabkan RNA polimerase tidak dapat memotong rantai *double helix* DNA.
3. Antibiotik
Golongan anti tumor antibiotik umumnya obat yang dihasilkan oleh suatu mikroorganisme, yang umumnya bersifat sel non spesifik, terutama berguna untuk tumor yang tumbuh lambat. Mekanisme

kerja terutama dengan jalan menghambat sintesa DNA dan RNA.

Yang termasuk golongan ini :

- Aktinomisin D -Mithramisin - Bleomisin
- Mitomisin -Daunorubisin - Mitozantron
- Doksorubisin -Epirubisin - Idarubisin

4. *Mitotic Spindle*

Golongan obat ini berikatan dengan protein mikrotubuler sehingga menyebabkan disolusi struktur *mitotic spindle* pada fase mitosis, antara lain:

- Paklitaksel (Taxol) - Vinorelin
- Dosetaksel - Vindesin
- Vinblastin - Vinkristin

5. *Topoisomerase Inhibitor*

Obat ini mengganggu fungsi koenzim topoisomerase sehingga menghambat proses transkripsi dan replikasi, diantaranya : Irinotekan, Topotekan, Etoposit

6. *Cytoprotective agents*

Macam-macamnya antara lain : Amifostin, Dekrazosan

7. Lain-lain

Obat ini tidak mempunyai mekanisme khusus, antara lain :

- L — asparaginase - Estramustine - Lavamisol - Suramin
- Okreotide - Anagrelide - Hexamethylmelamine

Hampir semua sitostatika mempengaruhi proses yang berhubungan dengan pembelahan sel aktif seperti mitosis dan duplikasi DNA. Sel dalam keadaan

membelah umumnya lebih sensitif daripada sel dalam keadaan istirahat karena pada saat itu mereka mempunyai metabolisme aktif mengubah sitostatika lebih cepat ke dalam bentuk metabolit efektif dan mempunyai sedikit waktu untuk memperbaiki kerusakan yang ditimbulkan pada DNA.^{17,18}

Indikasi pemberian kemoterapi adalah untuk :^{4,17}

- a. Menyembuhkan kanker, hanya beberapa jenis kanker yang dapat disembuhkan dengan kemoterapi : limfoblastik leukemia, Burkitt limfoma, dan Wilm tumor pada anak.
- b. Memperpanjang hidup dan remisi, ditujukan pada kanker yang kemosensitif walaupun penyakit berjalan progresif.
- c. Memperpanjang interval bebas kanker, walaupun kanker tampak masih lokal setelah operasi atau radioterapi.
- d. Menghentikan progresifitas kanker, yang ditunjukkan secara subyektif maupun obyektif, tumor dapat diterapi sitostatika asalkan kemungkinan berhasilnya 25% atau lebih.
- e. Mengecilkan volume tumor, baik prabedah maupun pra-radioterapi
- f. Terapi paliatif, ditujukan pada kanker stadium lanjut atau kanker yang lokasinya pada tempat-tempat yang tidak cocok untuk radiasi, misalnya : instalasi sitostatika, intrapleural, injeksi intramural.
- g. Menghilangkan gejala paraneoplasma

Hanya sebagian kecil kemoterapi yang mempunyai efek terapeutik lebih besar daripada efek samping toksiknya. Sifat ini dinyatakan dalam indeks terapeutik : rasio efek terapeutik terhadap tumor dan toksisitas terhadap jaringan

normal. Obat yang dipakai adalah obat yang efektif dengan nilai indeks terapeutik >1.¹⁷ Evaluasi keberhasilan terapi kemoterapi didasarkan pada *objective response rate* pasca kemoterapi : *partial respon* (PR) dan *complete reponse* (CR). CR/PR kemoterapi pada kanker payudara berkisar 22%-70%.¹⁹

Pemberian kemoterapi pada kanker payudara ditujukan pada kanker yang menunjukkan petanda imunohistokimia kurang baik :⁷

- ER dan PR negatif
- Aktivitas DNA ploidi tinggi
- Nilai nuklear grade yang menentukan *multiple loci of mutation*
- Nilai fraksi fase S yang tinggi
- Kadar TP 53 yang rendah
- Kadar Ki 67 antigen monoklonal *antibody-proliferation cell marker* tinggi
- HER 2 over ekspresion sampai 25-30%
- Kadar Cathepsin D yang dapat meramalkan rekurensi terutama *Node Negative Breast Cancer* (NNBC) tinggi
- *Epidermal Growth Factor Reseptor* (EGFR). Elevasi faktor ini meramalkan rekurensi pada NNBC dan prognosis yang buruk.

Pada tanda imunohistokimia diatas, kemoterapi dianjurkan sebagai pengobatan neoajuvan atau ajuvan terapi. Pada ajuvan kemoterapi, efektivitas sulit dinilai karena tidak ada cara untuk memonitor keefektifitasan obat tersebut kecuali setelah dinilai beberapa waktu, *survival rate/expectancy life* dengan penderita yang mendapat penangan lokal tetapi tidak mendapat terapi sistemik.

Pengobatan neoajuvan kemoterapi dapat dinilai segera efektifitasnya dengan mengukur tumor primer apakah mengalami pengecilan atau tidak.

Problem potensial pada pengobatan kemoterapi secara primer adalah biasanya diagnosa kanker payudara dilakukan dengan biopsi jarum halus saja sehingga kadang pada kasus kanker insitu mendapatkan pengobatan terapi yang *inappropriate* oleh karena sitologi tidak bisa membedakan jenis insitu dan jenis invasif. Oleh karena itu pada tumor yang sangat kecil, diagnosa kanker payudara yang ditegakkan dengan mamografi sebaiknya dilakukan *core-biopsy*.^{4,7,15}

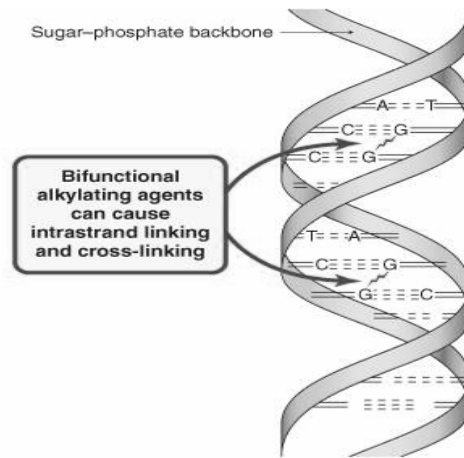
2.2.2. Cyclophosphamid.

Agent ini termasuk golongan zat pengalkil tipe nitrogen mustard dengan berat molekul 279,10.^{19,20} Berikut rumus bangun dari *cyclophosphamid*:



Gambar 5. Rumus bangun *cyclophosphamid*. Diambil dari artikel Cytostatic Cancer²¹

Cyclophosphamid mempunyai gugus alkil reaktif sebagai basa analog sitosin yang berikatan dengan guanin sehingga merubah ekspresi dari nukleotida dan pembuatan *cross-link*, pengikatan 2 rantai DNA dengan reaksi ganda sehingga *Ribonukleotida Acid* (RNA) polimerase tak dapat memotong rantai *double helix* DNA yang menyebabkan proses duplikasi DNA terganggu.



Gambar 6. *Cross-link* pada *cyclophosphamid*. Diambil dari artikel *Cyclophosphamid* di wikipedia²¹

Cyclophosphamid menimbulkan kerusakan DNA permanen dan kurang spesifik fase sehingga efek yang lebih luas terhadap jaringan yang sedang membelah pada umumnya. Sel-sel labil, seperti sel hematopoiesis dalam sumsum tulang, epitel rambut, epitel permukaan rongga organ dalam (epitel kolumnar traktus digestivus dan tuba falopi dan epitel transisional pada kandung kemih) yang mempunyai kemampuan membelah terus menerus dan berproliferasi tak terbatas, merupakan sasaran kemoterapi juga pada umumnya dan *cyclophosphamid* khususnya. Itulah sebabnya pada terapi tersebut, gejala kerusakan sel-sel labil nampak jelas terlihat seperti : rambut rontok, diare dan imunosupresan.^{4,19,20}

Efek samping *cyclophosphamid* yang sering terjadi adalah : lekopeni dan hilangnya periode menstruasi. Efek samping yang timbul pada dosis tinggi adalah

nefrotoksik, hiperuresemia dan *Sindrome Inappropriate Anti Diuretic Hormon* (SIADH).^{19,20,21}

Tonini dkk dari *University of Rome* melakukan penelitian untuk memberikan modalitas imunoterapi berupa pemberian *Interleukin* (IL)-2 dan *Interferon* (IFN) pada kanker payudara yang diterapi *cyclophosphamid* mendapatkan hasil komplrit *recovery* jumlah leukosit dan aktivitas sel NK.²²

Andrei I melakukan penelitian pada tikus yang mengidap kanker metastase ke paru dengan kombinasi terapi antara kemoterapi (*cyclophosphamid*) dengan imunoterapi (IL-15). Kombinasi terapi *cyclophosphamid* dan IL-15 dapat memperpanjang lama hidup hingga 32% dan mampu meningkatkan level dari NK1.1+/LGL-1 dan CD8+/CD44+ T sel.²³

Cyclophosphamid diabsorpsi dengan baik setelah pemberian oral dengan bioavaibilitas lebih dari 75%, diikat protein kecil sekali, dapat menembus barrier otak dengan *half-life* 3-12 jam dan mencapai konsentrasi puncak dalam plasma 2-3 jam setelah pemberian intra vena. Biotransformasi *cyclophosphamid* di hepar dan dieliminasi di ginjal 5-25% metabolitnya, pada dialisa darah *cyclophosphamid* juga ikut didialisa.

Pemberian *cyclophosphamid* bersama dengan sulfinpyrazon akan meningkatkan konsentrasi asam urat dalam darah. Bersama allupurinol akan meningkatkan toksisitas *cyclophosphamid* pada sumsum tulang. Pada pemberian bersama antikoagulan, *cyclophosphamid* meningkatkan aktivitas antikoagulan seakan-akan terjadi penurunan sintesis faktor koagulan dan perubahan formasi platelet tetapi juga dapat menurunkan aktivitas koagulan dengan mekanisme yang belum diketahui. Hati-hati pula pada penggunaan bersama obat-obat yang

menginduksi enzim mikrosom hati karena dapat meningkatkan metabolit *cyclophosphamid*. Kardiotoksisitas *cyclophosphamid* akan meningkat bila pemberian dengan doksorubisin melebihi 400mg tiap meter persegi permukaan tubuh. *Cyclophosphamid* dapat menghambat aktivitas kolinesterase sehingga pada pemberian bersama *succinylcholine* dapat memacu blokade neuromuskuler *succinylcholine* dan meningkatkan depresi pernapasan.

Pasien dengan pemberian *cyclophosphamid* perlu dimonitor mengenai produksi urin, kadar asam urat, bilirubin dan kreatinin konsentrasi dalam serum. Selain itu perlu diperiksa SGOT, SGPT, Hb, BUN, jumlah platelet dan jumlah lekosit darah.^{16,17,18,19,20}

Dosis 25 – 50 mg tablet oral. Dosis injeksi: 500mg/m² luas permukaan tubuh dapat juga menggunakan dosis berdasarkan berat badan yaitu: 15mg/kgbb.^{19,20}

2.3. IMUNOLOGI KANKER

2.3.1. Antigen Tumor

Antigen tumor merupakan molekul yang terbentuk pada permukaan sel yang berubah ganas. Antigen itu dapat mengaktifkan sistem imun yang spesifik terhadap sel kanker tersebut. Antigen tumor dapat dibagi 2 sesuai gambaran ekspresinya pada sel kanker dan juga sel normal :^{24,25}

1. Tumor Spesific Antigen (TSA)

TSA adalah protein yang dihasilkan akibat mutasi satu atau lebih gen yang diekspresikan pada sel kanker namun tidak pada sel normal. Merupakan antigen sasaran ideal untuk terapi imun kanker.

2. Tumor Assosiative Antigen (TAA)

TAA adalah protein yang dihasilkan akibat mutasi satu atau lebih gen yang diekspresikan pada sel kanker namun juga dihasilkan dan diekspresikan oleh sel normal. TAA dapat dibedakan 2 macam :

- a. *Antigen onkofetal*, disandikan oleh gen yang diekspresikan selama embriogenesis dan perkembangan janin namun transkripsional tenang setelah dewasa. Gen tersebut menyandi protein yang diduga berperan dalam pertumbuhan cepat sel embrio dan diaktifkan kembali untuk fungsi yang sama pada kanker yang tumbuh cepat.
- b. *Tissue Spesific Differentiation Antigen*, protein yang diekspresikan sel yang menjadi kanker, ekspresinya ditemukan terus sesudah transformasi neoplastik. Antigen ini menunjukkan asal jaringan kanker. Contoh : *Prostate Spesific Antigen (PSA)*, *Carsinoma Embriogenic Antigen (CEA)* dan *Alfa Feto Protein (AFP)*

Antigen tumor ini akan diekspresikan ke membran sel bersama MHC I dan MHC II membentuk MHC-antigen kompleks. Komplek inilah yang akan dikenali oleh sistem imun kita. Antigen+MHC klas I akan dikenali oleh *Cytotoxic T Lymphocyte (CTL)*. Antigen +MHC klas II akan dikenali oleh sel T helper.^{6,26}

2.3.2. *Imunosurveillance*

Secara umum terdapat dua jenis respon imun terhadap kanker yaitu mekanisme humoral dan mekanisme selular:

A . Mekanisme humoral

1. Lisis oleh antibodi dan komplemen
 2. Oponisasi melalui antibodi dan komplemen
 3. Hilangnya adhesi oleh antibodi
- B. Mekanisme seluler
1. Destruksi oleh sel CTL / Tc (sel pembunuh = Tc)
 2. Destruksi oleh sel NK
 3. Destruksi oleh makrofag.

Peran imunitas seluler pada kanker lebih dominan dibandingkan imunitas humoral.^{6,25,26}

2.3.2.1. Limfosit T Sitotoksik / CTL

Limfosit T timbul dari sel induk di dalam sumsum tulang yang bermigrasi ke timus. Kemudian sel induk berdiferensiasi menjadi sel T dewasa dan meninggalkan timus. Sel T matur ikut aliran darah, aliran limfe dan jaringan limfoid perifer. Sel T hanya mampu mengenali antigen suatu sel dalam bentuk peptida. CTL/Th1 dapat dikenali dengan penggunaan marker CD8⁺, sedangkan Th2 dapat dikenali dengan penggunaan marker CD4⁺.

Berdasarkan fungsinya, reseptor CTL ada 3 macam yaitu :

- a. Reseptor untuk *recognition* antigen yang disebut *T Cell reseptor* (TCR)
- b. Reseptor untuk signal transduksi : CD3, CD8, CD28 dan cincin ζ.
- c. Reseptor untuk adhesi yang disebut integrin

Signal biokimia untuk *recognition* antigen dipicu tidak hanya dengan TCR saja tetapi diperlukan transduksi dari CD3 dan cincin ζ yang kemudian disebut TCR kompleks.⁶

Sel Th2 akan mengeluarkan IFN γ dan *Tumor Nekrosis Factor* (TNF) α . IFN γ dapat meningkatkan fagositosis makrofag dan CTL, TNF α mampu meningkatkan kemotaksis sehingga timbul inflamasi. PMN juga mengeluarkan IL-4 untuk meningkatkan proliferasi sel B sehingga mampu memproduksi *antibodi* (Ab). Dalam hal ini fungsi Ab adalah untuk opsonisasi sel kanker sehingga mudah dikenali oleh sel imun dan mengaktifkan sistem komplemen. IL-2 diproduksi oleh sel imun dan diperlukan untuk mengaktifkan sel imun sendiri.^{6, 25,26}

Banyak studi menunjukkan bahwa kanker mengekspresikan antigen spesifik yang dapat memacu CTL sehingga dapat menghancurkan sel kanker. Untuk ketahanan terhadap tumor peran CTL sangat penting, disatu pihak karena mereka sangat kuat daya kerjanya (satu CTL dalam binatang percobaan in vivo dapat membinasakan kira kira 1000 sel tumor) di lain pihak karena molekul MHC I terdapat hampir semua pada sel berinti, termasuk tumor-tumor.²² CTL melaksanakan tugas menghancurkan sel kanker dengan cara :

1. Mengeluarkan perforin dan granzim yang menyebabkan sel kanker lisis.
2. Mengeluarkan IFN γ sehingga meningkatkan kerja fagositosis makrofag.
3. Dengan perantara FasL, CTL melakukan recognition terhadap sel kanker yang telah diopsonisasi sehingga mengakibatkan apoptosis sel kanker.^{6,25,26}

2.3.2.2. Sel NK

Sel NK berukuran sedikit lebih besar daripada sel limfosit kecil, berjumlah 10-15% limfosit darah perifer. Secara morfologi sel NK termasuk dalam populasi *Large Granular Lymphocyte* (LGL), yang mengandung granula sitotoksik dari

sitoplasma. Sel NK dapat berperan dalam respon imun spesifik maupun non spesifik.

Sel NK merupakan sel efektor terhadap sitotoksitas spontan berbagai jenis sasaran, tidak memiliki sifat klasik dari makrofag, granulosit maupun CTL dan sitotoksitasnya tidak tergantung pada MHC. Mekanisme yang digunakan sel NK dalam membunuh sel kanker serupa dengan yang dilakukan oleh CTL yaitu dengan melisiskan dan apoptosis sel kanker.^{6,26,28}

Sel NK tidak mempunyai TCR dan merupakan CD3 negatif. Sel NK mempunyai 2 tipe reseptor yaitu yang berkaitan dengan aktivasi sel NK dan *killer inhibitor reseptor* (KIR) yang menghambat sitolisis NK melalui pengenalan terhadap molekul MHC I-nya sendiri. Sel NK tidak melisiskan sel berinti yang sehat karena semuanya mengeluarkan MHC I. Jika infeksi virus dan atau perubahan neoplastik mengurangi pengeluaran MHC I normal, sinyal KIR akan terganggu dan terjadilah lisis.¹¹

Sel NK juga mengekspresikan CD56 yaitu suatu molekul yang mampu mempromosikan adesi intraseluler. Sel NK mempunyai reseptor untuk bagian tetap (Fc γ RIII atau CD 16) dari *Imunoglobulin G* (IgG) yang menjadikannya sitotoksitas tergantung antibodi, *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity* (ADCC). Antigen yang diopsonisasi oleh Ig G akan dikenali oleh sel NK untuk dilisiskan. Aktivitas ADCC ini penting untuk efek terapeutik optimal dari antibodi monoklonal tumor spesifik. Pada penelitian-penelitian terakhir mengungkapkan bahwa pengikatan sel NK terhadap sel sasaran dapat terjadi melalui sel reseptor

khusus yang berbeda dengan Fc yaitu reseptor NKR-PI, yang mengikat molekul semacam lektin.^{6,26,28}

Kemampuan sel ditingkatkan oleh IFN, TNF, IL 2, IL-12, sehingga peran anti tumor sel NK bergantung pada rangsangan yang terjadi secara bersamaan pada sel T dan makrofag yang memproduksi sitokin tersebut. IFN mengubah sel pre-NK menjadi sel NK.²² Aktivitas sel NK sering dihubungkan dengan prognosis karena sel NK mempunyai peran penting dalam mencegah metastasis dengan mengeliminasi sel tumor dalam sirkulasi. Hal ini dibuktikan dengan adanya penelitian yang mengungkapkan bahwa 90%-99% sel tumor yang dimasukkan intravena akan hilang dalam 24 jam pertama yang berhubungan secara bermakna dengan jumlah dan aktivitas sel NK. Percobaan menggunakan sel NK yang diaktivasi dengan cyclophosphamid menunjukkan bahwa sel NK gagal mencegah metastasis.^{6,28}

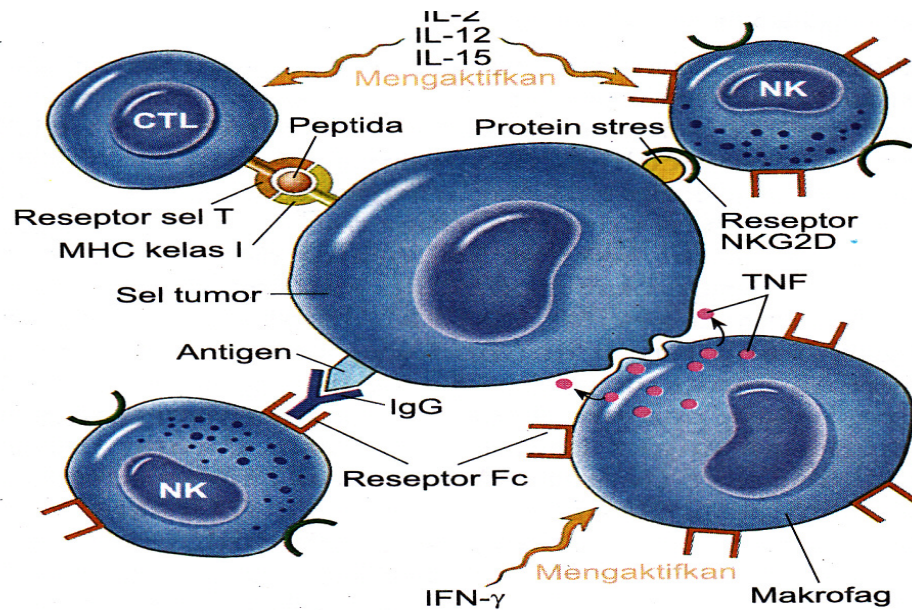
2.3.2.3. Makrofag

Makrofag dapat berperan dalam melawan sel tumor dengan berperan sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC), menghasilkan sitokin yang mengaktifkan sel imunitas lain dan bertindak sebagai efektor langsung dengan melisiskan sel tumor apabila sudah diaktivasi oleh *Makrofag Activating Factor* (MAF).

Kemampuannya berikatan dengan sel tumor karena makrofag juga mempunyai reseptor Fc yang mampu bekerjasama dengan IgG. Penyebab sel tumor lisis akibat reaksi enzim lisosom, metabolit reaktif terhadap oksigen dan *nitrit oxide* (NO). Makrofag juga aktif mensekresi TNF yang mampu melisiskan sel tumor dengan cara berikatan dengan reseptor permukaan sel tumor dan

menyebabkan nekrosis dari sel tumor dengan cara memobilisasi berbagai respon imun tubuh.

Diakhir peristiwa imunitas dihasilkan debris-debris sisa penghancuran sel, disini peran makrofag sebagai petugas kebersihan yang membersihkan debris tersebut. Opsonisasi komplemen dan antibodi terhadap debris-debris tersebut membantu proses fungsi pembersihan makrofag. Bila fungsi makrofag terganggu maka kompleks Ag-Ab akan menyebabkan reaksi hipersensitivitas ataupun autoimun.^{6,25,26,27}



Gambar 7. Mekanisme penghancuran sel tumor oleh sistem imun. Diambil dari buku Ajar Patologi¹¹

2.3.3. Mekanisme Penghindaran Sel Kanker

Sel kanker untuk mempertahankan hidupnya mempunyai suatu cara penghindaran terhadap sel imun. Sel kanker pada hakekatnya adalah sel normal

yang mengalami mutasi sehingga sel kanker juga masih mempunyai antigen sel sendiri (*self antigen*) yang tidak dapat dikenali oleh sistem imun. Pengenalan petanda tumor oleh sistem imun terjadi pada tahap lanjut dari proses transformasi sel normal hingga mutasi tersebut terekspresikan.^{6,26}

2.3.3.1. Kehilangan ekspresi Ag :

Tumor timbul cepat (ada mutasi dan delesi gen) sehingga tak ada ekspresi kompleks peptida tumor – MHC = *Ag loss variants*

2.3.3.2. Down regulation

Terjadi pengurangan ekspresi molekul MHC kelas I sehingga tak terbentuk kompleks Ag / peptida tumor – molekul MHC kelas I

2.3.3.3. Pelepasan (*shedding*) kompleks Ag-Ab

Komplek Ag-Ab yang tak mengikat komplemen berperan sebagai *blocking factors* menyebabkan terjadi *acquired resistance to immune effector mechanisme*, karena : terjadi endositosis, pelepasan (*shedding*) kompleks Ag-Ab. Namun mekanisme yang tetap masih tidak jelas (mungkin disebabkan karena blokade fungsi reseptor Fc dari sel NK, induksi supressor sel, penurunan regulasi fungsi sel Th)

2.3.3.4. Produk tumor menekan respons imun, fungsi limfosit & makrofag

Sel tumor mensekresi *Transformed Growth Factor β* (TGF β) berlebihan sehingga menghentikan respon imun humoral. Beberapa tumor mengekspresi Fas ligand yang dapat mengganggu efektor sel T. Prostaglandin yang dihasilkan oleh sel tumor dapat menghambat sel NK dan CTL.

2.3.3.5. Ag *masking*

Ag permukaan sel tumor bersembunyi di balik molekul. Molekul tertentu seperti sialomucin yang sering diikat permukaan sel tumor dapat menutupi antigen dan mencegah ikatan dengan limfosit.

2.3.3.6. Vaskularisasi

Tumor mungkin mencapai 1-2 cm sebelum terbentuk vaskularisasi. Pertumbuhan vaskuler merupakan pertumbuhan sel pejamu sendiri, sehingga endotel tumor dikenal sebagai *self* dan tidak ditolak, sehingga pada beberapa keganasan terus berproliferasi dengan antigen tersembunyi dibalik endotel vaskuler.

2.3.3.7. Faktor genetik

Kegagalan untuk mengaktifkan sel efektor T dapat disebabkan karena faktor genetik.^{6,29,30}

2.4. TRANSFER FACTOR

Pengetahuan tentang TF dimulai ketika Dr.H. Sherwood menyuntikkan ekstrak leukosit dari seseorang yang pernah terkena tuberkulosis kepada seseorang yang belum pernah terjangkiti ternyata memberikan kekebalan sistem imun pada penerima terhadap serangan tuberkulosis. Dari fenomena ini disimpulkan adanya suatu "*factor*" yang mampu memindahkan kemampuan imunitas dari pemberi ke penerima, faktor ini diberi nama "*transfer factor*".

Pada manusia, TF dari sistem imun ibu yang diberikan kepada bayinya melalui kolostrum. Melalui kolostrum, bayi mewarisi data imun si ibu dan melatih sistem imun bayi sehingga sistem imun bayi lebih kuat dalam melakukan perlawanan dan pertahanan terhadap berbagai antigen asing.⁹

TF merupakan oligoribonukleotida yang terdiri dari 44 asam amino dengan berat molekul kecil hanya 3500-6000 kda. TF tidak spesifik spesies karena hampir semua mammalia berhubungan dengan dunia mikroorganisme yang sama dan mempunyai sistem imun yang berfungsi dengan cara yang sama., tetapi keefektifannya secara *invivo* tergantung tiap individu. Dengan kata lain, TF yang diekstrak dari kolostrum sapi dapat memberi kelebihan sistem imun yang sama seperti si bayi mendapat susu pertama ibunya.⁸

Tidak seperti antibodi yang terdapat pada kolostrum yang mempunyai berat molekul besar sehingga mampu menimbulkan reaksi alergi, TF hanya bermolekul kecil yang tidak menimbulkan alergi bagi resipien. Ekstrak TF mengandung lebih dari 200 faktor, lebih pekat daripada kolostrum yang hanya mengandung sejumlah kecil faktor. Kemampuan TF yang telah diekstrak ternyata lebih unggul daripada TF campuran dalam kolostrum.⁹

TF meningkatkan data memori sistem imun kita sehingga memacu sistem imun untuk lebih cepat dan lebih agresif dalam perlawanan bila antigen yang sama masuk ke tubuh sehingga seakan-akan kita dulu pernah terjangkiti. Efek TF pada sistem imun terutama sebagai *inducer*, spesifik antigen dan supresor. Sebagai *inducer*, TF meningkatkan kewaspadaan sistem imun terhadap berbagai agressor. Sebagai spesifik antigen, TF menjadi antigen spesifik dan berfungsi sebagai sitokin yang membantu sistem imun mengenali berbagai mikroorganisme dan antigen asing lebih baik sehingga mengurangi masa jangkitan penyakit. Sebagai supresor, TF mencegah sistem imun kita menjadi tidak terkendali dalam melakukan perlawanan.^{31,32}

Berbagai penelitian tentang TF untuk peningkatan jumlah dan aktivitas sel NK dilakukan dengan gabungan dengan agent lain seperti TF yang diperoleh dari ekstrak kolostrum sapi digabungkan dengan TF dari jenis avian yaitu dari ekstrak kuning telur ayam, TF kolostrum sapi yang dikombinasi dengan mikronutrien lain seperti antioksidan dan prebiotik atau juga TF yang dikombinasi dengan IL-2, ternyata memberikan efek lebih baik pada peningkatan jumlah dan aktivitas sel NK dibanding diberikan sendiri .^{9,32}

Seperti halnya kolostrum yang mengandung hormon pertumbuhan, begitu pula dengan TF. Salah satunya, TF mengandung *Insulin like Growth Factor* (IGF)-1 yang dapat mengadakan *recognition* dengan reseptor pertumbuhan sel lebih dari 30menit. IGF-1 merupakan salah satu hormon pertumbuhan yang mempunyai struktur protein mirip dengan insulin namun aktivitasnya tidak sama dengan insulin. Di dalam sirkulasi IGF-1 diikat oleh protein binding yang menyebabkan *half-life* IGF-1 menjadi lebih panjang. Bila IGF-1 telah berinteraksi dengan reseptor sel (IGF-1 R) kemampuannya merangsang proliferasi akan hilang hanya dalam waktu 30 detik akibat *broken down* komponen dasarnya. Akibat rusaknya komponen dasar IGF-1 maka kemampuan merangsang proliferasi sel berubah menjadi menghambat proliferasi. Bila IGF-1 mampu bertahan berinteraksi dengan reseptor pertumbuhan sel maka hormon pertumbuhan lain tidak dapat mengadakan interaksi dengan reseptor pertumbuhan tersebut.^{8,33}

Fabre dkk pada tahun 2004 meneliti pemberian TF dan kemoterapi konvensional pada mencit BALB/c yang diinfeksi *M. tuberculosis* mendapatkan pada fase inisial didominasi produksi sitokin dari CTL dan saat bersamaan

didapatkan kadar yang tinggi dari TNF α dan *isoform of nitric oxide synthase* (iNOS). Yang menarik dalam penelitian ini pemberian TF mempunyai efek sinergis dengan pemberian kemoterapi konvensional dalam penghambatan proliferasi bakteri. Pada penelitian tersebut Fabre berkesimpulan bahwa pemberian TF dapat memperbaiki ekspresi sitokin Th1, TNF α dan iNOS yang memprovokasi penghambatan proliferasi bakteri.³⁴

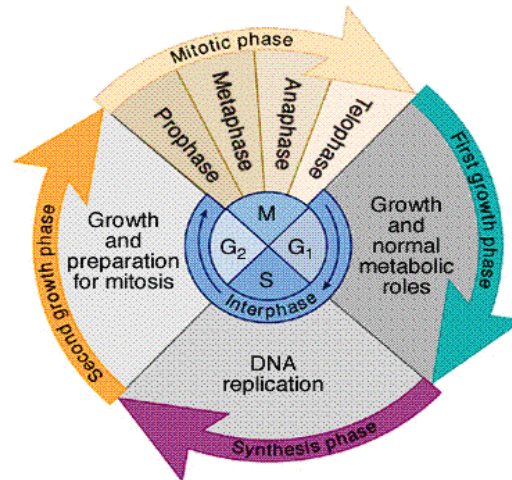
2.5. SIKLUS SEL

2.5.1. Mitosis

Mitosis dapat didefinisikan sebagai proses pembelahan sel yang menghasilkan 2 sel yang identik sama.^{11,12,33} Siklus sel terdiri dari:

1. Fase G1 (Gap 1), merupakan fase terpanjang setelah mengalami mitosis dan persiapan sel untuk sintesis DNA. Sel tumbuh membesar dan berfungsi normal dan sebagai kontrol mitosis selanjutnya.
2. Fase S (Sintesis) merupakan fase replikasi DNA sehingga terbentuk 2 kromatid yang identik. Di fase ini terdapat 2 fase penting yaitu transkripsi dan translasi
3. Fase G2 (Gap2) antara fase S dan Mitosis. Persiapan mitosis, fase ini lebih pendek dibanding G1. Pada saat ini sentriol/sentrosom mengalami duplikasi. Pada saat ini sel mengecek hasil sintesis protein yang telah dibuat pada fase sintesis. Bila ada kerusakan DNA maka akan diperbaiki oleh gen DNA polimerase atau diprogram apoptosis.
4. Fase mitosis. Fase ini juga terdiri dari 4 fase, yaitu fase profase, metafase, anafase dan telofase.

5. Fase sintesis, fase G₁ dan fase G₂ disebut fase interfase yang merupakan 90% dari siklus sel.



.Gambar 8. Siklus sel . Diambil dari buku The World of The Cell ³⁵

PROFASE

DNA bersama dengan protein pendukungnya mengubah bentuk DNA untaian panjang menjadi bentuk yang terkondensasi seperti bentuk X. Kromatid mengalami kondensasi menjadi lebih pendek dan lebih padat sehingga terbentuk kromosom. Sentrosom yang telah menduplikasi, mulai memproduksi mikrotubulus. Mikrotubulus terus diproduksi ke segala arah, sebagian mikrotubulus dari kutub yang berlawanan bertemu dan berikatan dan mendorong sentrosom bergerak ke kutub sel. Kromosom terus mengalami kondensasi. Membran nukleus menghilang, pecah menjadi fragmen kecil sehingga kromosom terapung di dalam sitoplasma setelah itu nukleolus menghilang. Setiap kromosom membentuk kinetokor pada setiap sisi sentromer. Sentromer merupakan kompleks protein, tempat melekatnya mikrotubulus pada kromosom. Kinetokor memiliki molekular motor yang menggunakan ATP untuk menarik mikrotubulus.

Mikrotubulus terus memanjang sehingga ujung mikrotubulus bertemu dengan mikrotubulus dari kutub lain menjadi mikrotubulus polar membentuk *mitotic spindle*. Mikrotubulus yang menempel pada kinetokor disebut mikrotubulus kinetokor.

METAFASE

Kromosom akan berjajar di garis tengah gelondong (*equatorial plane*), mikrotubulus kinetokor saling tarik menarik. Setiap kinetokor harus berhubungan dengan mikrotubulus. Bila ada yang terlewat, kinetokor akan memberikan sinyal sehingga proses mitosis tidak berlanjut ke tahap selanjutnya (*mitotic spindle check point*).

ANAFASE

Pada fase ini terjadi 2 peristiwa:

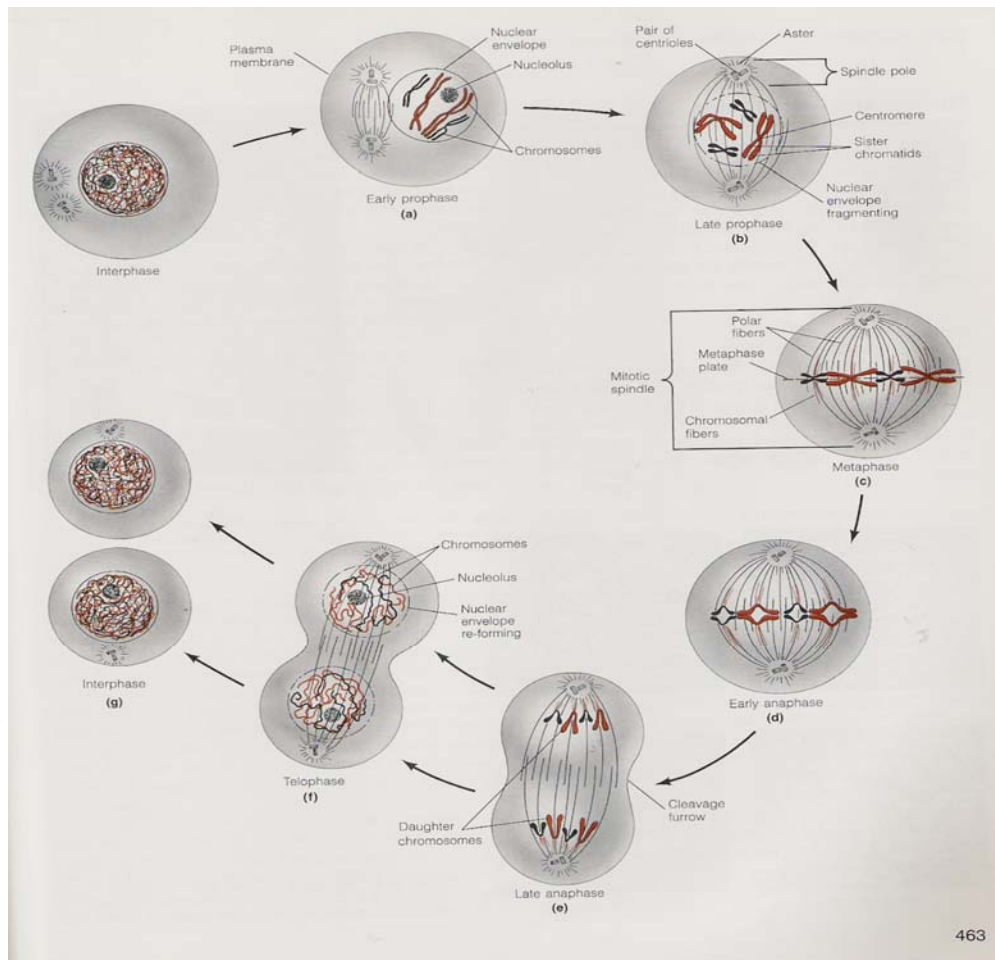
1. Protein yang mengikat 2 kromatid terputus.
2. Mikrotubulus kinetokor memendek menarik kromatid ke arah kutub sel.

Mikrotubulus polar terus memanjang untuk persiapan sitokinesis. Pada akhir anafase terjadi peristiwa sitokinesis yaitu : akhir dari mitosis dimana terjadi pembagian sitoplasma dan mulai terbentuk *cleavage furrow* ditempat *metaphase plate* akibat pengerutan ring yang terbentuk oleh filamen aktin dan miosin. *Cleavage furrow* semakin jelas sampai kedua sitoplasma dan sel terbagi sempurna.

TELOFASE

Pada fase ini mikrotubulus kinetokor menghilang, mikrotubulus polar terus memanjang untuk persiapan sitokinesis. Kromosom mencapai kutub sel

kemudian mulai membentuk membran inti dengan menggunakan fragmen membran inti sel induk yang kemudian menyelubungi kromosom. Selanjutnya muncul nukleolus dan kromosom mengalami penguraian.^{35,36,37}



Gambar 9. Mitosis sel . Diambil dari buku The World of The Cell³⁶

2.5.2. Pertumbuhan dan Proliferasi Sel

Proliferasi sel dapat dirangsang oleh faktor pertumbuhan intrinsik, jejas, kematian sel, bahkan dapat pula oleh deformasi mekanis jaringan. Mediator kimiawi yang terdapat pada lingkungan mikro setempat dapat menghambat atau

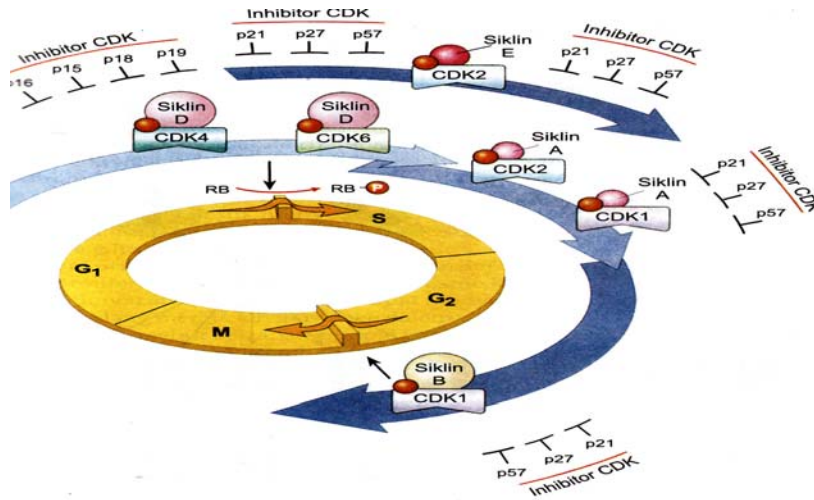
merangsang pertumbuhan sel. Kendali pertumbuhan yang terpenting adalah penginduksian sel istirahat (*resting cell*) pada fase G₀ ke siklus sel.^{11,12}

Masuk dan berkembangnya siklus sel dikendalikan melalui perubahan kadar dan aktivitas suatu kelompok protein yang disebut siklin. Pada tahapan tertentu siklus sel, siklin meningkat kemudian didegradasi dengan cepat saat sel bergerak melalui siklus tersebut. Siklin menjalankan fungsi regulasinya melalui pembentukan kompleks dengan suatu protein yang disintesis secara konstitutif yaitu *Cyclin Dependent Kinase* (CDK). Kombinasi yang berlainan antara siklin dan CDK berkaitan dengan setiap transisi penting dalam siklus sel dan kombinasi ini menggunakan efeknya dengan memfosforilasi sekelompok substrat terpilih (fosforilat kinase dan defosforilat kinase). Fosforilasi dapat menimbulkan perubahan konformasi bergantung pada proteinnya yang secara potensial dapat:

- Mengaktivasi atau menginaktivasi satu aktivitas enzimatik
- Menginduksi atau mengganggu interaksi protein
- Menginduksi atau menghambat pengikatan protein pada DNA
- Menginduksi atau mencegah katabolisme protein

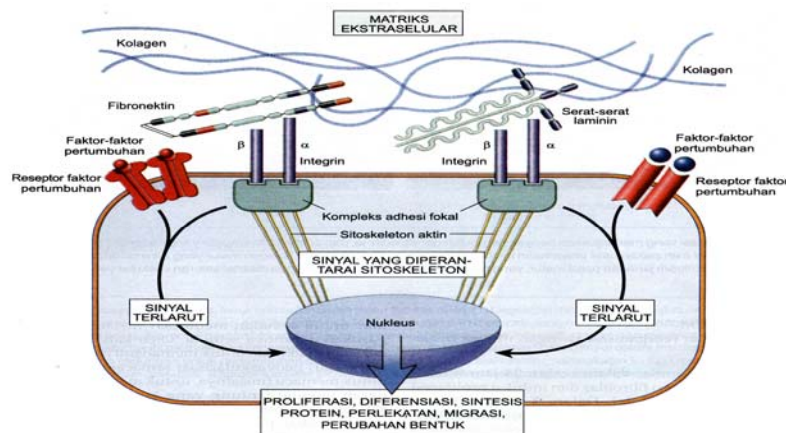
Selain dari sintesis dan pemecahan siklin, kompleks CDK juga diatur melalui pengikatan inhibitor CDK yang terdiri dari 2 famili yaitu CDKI yang punya 3 protein yang menghambat CDK secara luas (p21,p27,p57) dan INK4 yang secara selektif menghambat CDK4 dan CDK6 (p15,p16,p18 dan p19). Komplek ini sangat penting dalam mengatur tahapan siklus sel (G₁→S dan G₂→M) yaitu tahapan saat sel memastikan bahwa DNA sudah terreplikasi dengan benar dan atau kesalahan sudah diperbaiki. Kegagalan pemantauan secara

memadai terhadap keakuratan replikasi DNA akan menyebabkan akumulasi mutasi dan transformasi yang mungkin ganas.^{11,12,35}



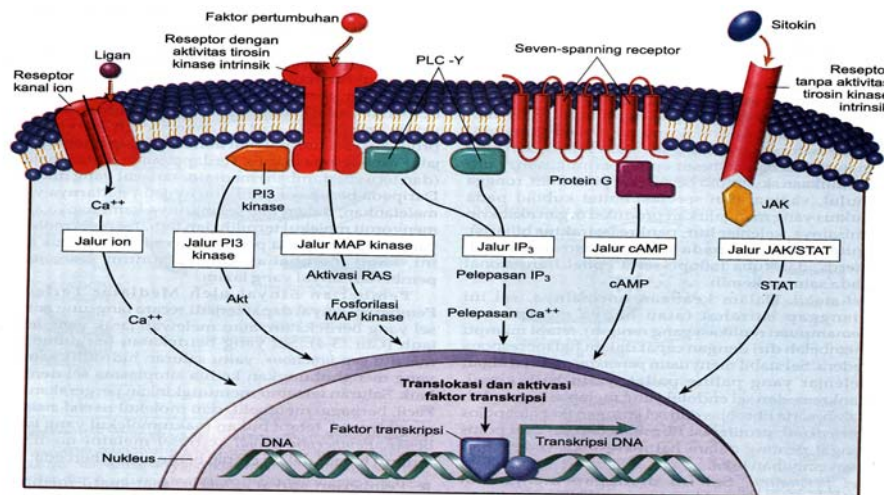
Gambar 10. Pengendalian siklus sel. Diambil dari buku Ajar Patologi¹¹

Pertumbuhan dan diferensiasi sel juga dipengaruhi oleh sinyal ekstra sel dan matrik ekstra seluler. Mediator kimiawi yang mempengaruhi pertumbuhan adalah faktor pertumbuhan polipeptida yang beredar didalam serum atau diproduksi secara lokal oleh sel. Pemberian sinyal dapat terjadi secara langsung antara sel yang berdekatan atau melalui jarak yang jauh.



Gambar 11. Sinyal ekstrinsik untuk pertumbuhan sel. Diambil dari buku Ajar Patologi¹¹

Untuk reseptor intrasel, pengikatan ligan mengakibatkan pembentukan kompleks reseptor-ligan yang langsung berhubungan dengan DNA inti sel dan selanjutnya mengaktifkan atau menghentikan transkripsi. Untuk reseptor permukaan sel, pengikatan ligan menghasilkan suatu kaskade peristiwa intrasel sekunder yang diawali dengan kenaikan Ca^{++} intrasel atau AMP siklik atau inositol trifosfat (IP₃) atau aktivasi kinase.



Gambar 12. Sinyal pertumbuhan sel. Diambil dari buku Ajar Patologi¹¹

Sinyal penghambat pertumbuhan pada kenyataannya penting dalam pengendalian pertumbuhan sel. Faktor pertumbuhan β yang bertransformasi, TGF β , reseptornya mempunyai aktivitas kinase intrinsik dan jika membentuk kompleks dengan TGF β akan memfosforilasi protein intrasel spesifik yang kemudian meningkatkan sintesis inhibitor CDK dan memblok aktivitas faktor transkripsi.

Sebagai contoh DNA yang mengalami radiasi, maka protein supresor gen TP53 akan distabilkan dan meginduksi transkripsi CDKN1A (p21). Inhibitor ini menahan sel pada fase G1 atau G2 untuk memperbaiki DNA, bila telah selesai maka TP53 akan turun dan CDKN1A berkurang maka sel dapat melanjutkan ke fase berikutnya. Bila kerusakan terlalu luas maka TP53 akan meyakinkan sel untuk bunuh diri (apoptosis).

Pertumbuhan dan differensiasi sel setidaknya melibatkan dua jenis sinyal yang bekerja secara bersamaan. Sinyal pertama berasal dari molekul terlarut, seperti faktor pertumbuhan dan penghambat pertumbuhan polipeptida. Sinyal yang kedua melibatkan unsur tidak terlarut pada ekstra seluler matrik yang berintegrasi dengan integrin sel.^{11,12,37}

2.6. Hitung AgNOR

Pertumbuhan dan proliferasi sel merupakan dua hal yang berkaitan erat pada fenomena koordinasi biologi untuk memastikan bahwa sel yang dihasilkan normal. Pada saat proliferasi, penambahan sintesis protein untuk pertumbuhan sel dipenuhi dengan cara merubah biogenesis ribosom. Biogenesis ribosom berhubungan dengan respon proliferasi sel dan progresifitas siklus sel. Sistem regulasi siklus sel ditunjukkan oleh aktivitas transkripsi rRNA. Karakteristik sel kanker berupa delesi dan atau perubahan fungsi gen ditunjukkan juga oleh karakteristik biogenesis ribosom, hal ini menyebabkan pembelahan sel tanpa faktor pertumbuhan yang cukup.^{11,37,38}

Untuk melihat perubahan gen pada sel kanker yang dihubungkan dengan biogenesis ribosom dapat ditunjukkan dengan kuantitas dari *nuclear organization*

region (NOR). NOR merupakan segmen dari kromosom yang terdiri dari gen ribosom. Selama interfase, NOR berada tepat pada struktur nukleolar dan diselubungi komponen fibriler yang tebal. Semua komponen penting untuk transkripsi ribosom berada pada NOR interfase dimana sintesis rRNA terjadi. NOR interfase dapat dilihat dibawah mikroskop cahaya dengan pewarnaan perak (Ag) yang akan mengikat protein secara selektif. Pewarnaan NOR dengan perak (Ag) disebut AgNOR. Jumlah AgNOR berkaitan erat dengan *nuclear size* dan aktivitas transkripsi dan dapat dijadikan parameter biogenesis ribosom. Visualisasi NOR dengan menggunakan pewarnaan silver diperkenalkan oleh Ploton dkk pada tahun 1986 yang kemudian dimodifikasi oleh Ofner dkk tahun 1994 dengan menambahkan formalin untuk fiksasi.^{10,38}

Trere dkk pada tahun 2004 meneliti tentang hubungan antara besar nukleus dan aktivitas nukleus dengan status pRb dan TP53 pada kanker payudara manusia dengan melihat kuantitas AgNORnya. Hasil yang diperoleh menunjukkan korelasi yang signifikan antara jumlah AgNOR dan status pRb dan TP53. Dengan mengetahui hitung AgNOR nukleus sel dapat mengetahui informasi unik tentang laju biogenesis ribosom secara histologi dan dengan mengetahui distribusi AgNOR dapat dilihat aktivitas RNA polimerase, makin tinggi hitung AgNOR makin banyak rRNA polimerase. Trere menyimpulkan bahwa perubahan status pRb dan TP53 berhubungan dengan biogenesis ribosom yang tinggi pada sel kanker payudara manusia.^{10,38}

Pada tahun 2007, Miranti melakukan penelitian diskriptif analitik dengan pendekatan belah lintang pada 36 orang penderita karsinoma duktus invasif

payudara yang diperiksa histopatologinya di lab Patologi Anatomi RSUP dr. Kariadi/FK UNDIP Semarang, menyimpulkan bahwa ada korelasi positif antara hitung AgNOR dengan status HER-2. Peningkatan kepositifan status HER-2 akan meningkatkan jumlah bintik AgNOR, sehingga AgNOR dapat dipertimbangkan untuk memprediksi secara kasar penentuan terapi anti HER-2 dan menentukan fungsi reseptor HER-2 dalam menghantarkan sinyal transduksi.³⁹

Pada kanker payudara 20-30% mengalami amplifikasi HER-2. Ekspresi yang berlebihan dari HER-2 menunjukkan pacuan transkripsi dan peningkatan copy gen yang mengalami amplifikasi. Amplifikasi HER-2 dapat dijadikan prediksi dan mengevaluasi respon pemberian antiHER-2 antibodi, Herceptin. Bankfalvi meneliti hubungan antara HER-2 status dan laju proliferasi dengan menggunakan imunohistokimia dengan agent A0485, *fluorescence insitu hybriditation* dan AgNOR. Dari hasil penelitian tersebut disimpulkan bahwa pemeriksaan AgNOR yang murah dan sederhana dapat dipertimbangkan sebagai alat prediktor negatif terapi herceptin.^{40,41}

2.7. VOLUME TUMOR

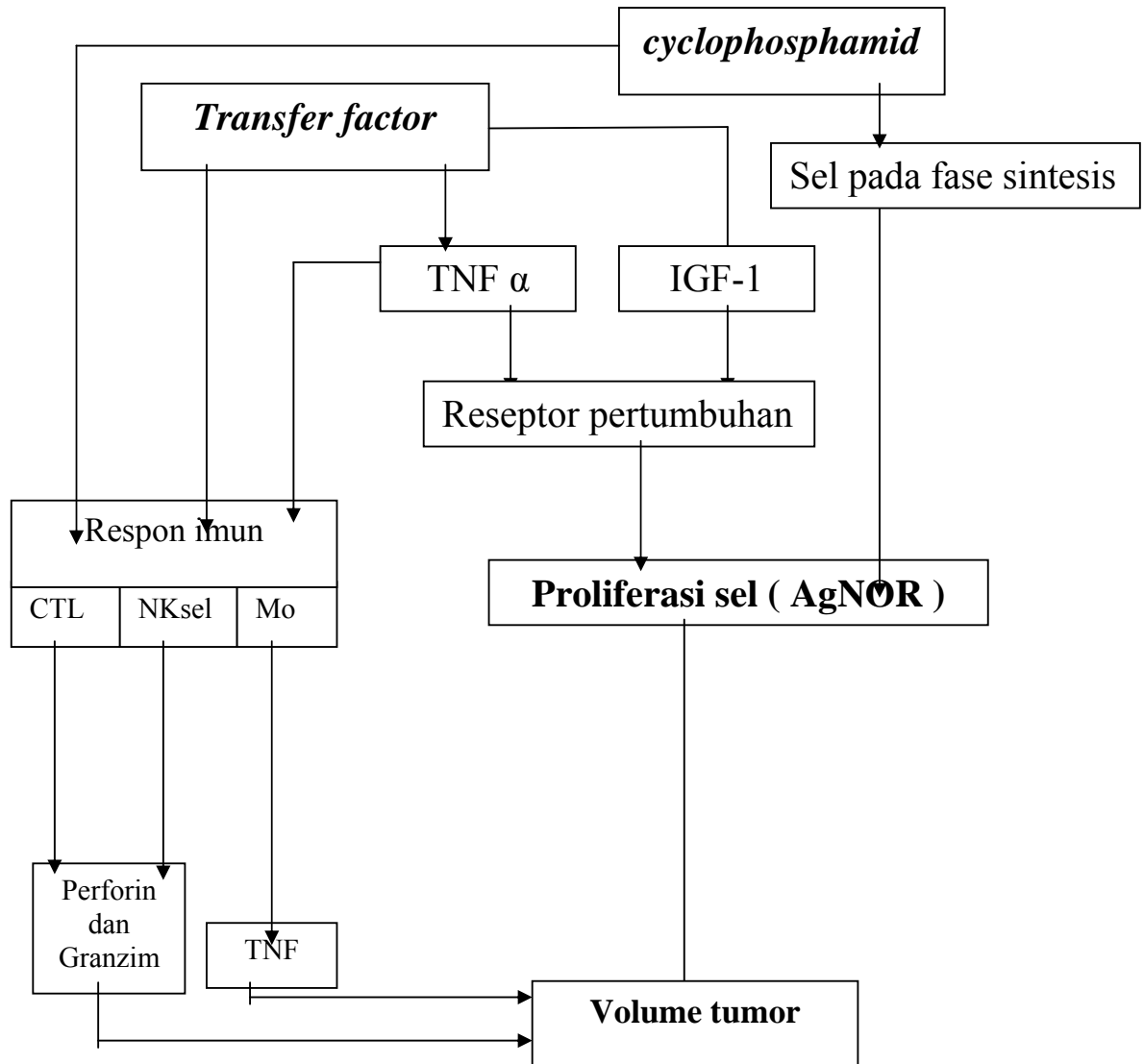
Secara umum jumlah sel yang ada pada suatu jaringan merupakan fungsi kumulatif antara tumbuhnya sel baru dan keluarnya sel yang ada pada populasi. Tumbuhnya sel baru dalam suatu jaringan sebagian besar ditentukan oleh kecepatan proliferasinya, sementara sel dapat meninggalkan populasinya karena kematian sel atau berdifferensiasi menjadi jenis sel lain.¹¹

Pada umumnya sel kanker tumbuh biner, secara eksponensial dari 1 sel menjadi 2 sel, 4 sel, 8 sel, dan seterusnya menjadi 2^n sel sampai terbentuk gerombolan sel berupa tumor. Makin besar tumor tersebut seakan-akan makin cepat kanker itu tumbuh. Setelah mencapai besar tertentu pertumbuhan sel kanker itu berubah dari tumbuh secara eksponensial menjadi secara Gompertz, yaitu pertumbuhannya menjadi lambat dengan makin bertambah besarnya tumor. Pertumbuhan yang lambat tersebut terjadi karena keterbatasan pasokan darah, ruang tempat tumbuh dan daya imunitas tubuh. Besar rata-rata sel kanker ialah 10 μ m dan tumor sebesar 1cm³ terdiri dari 10^9 (1 milyar) sel, sebesar 1dm³ terdiri dari 10^{12} . Dengan beban sel sebanyak 1 trilyun (10^{12}) sel atau setelah menjalani 40 kali ganda sel kanker telah dapat membunuh penderita dan tidak ada orang yang tahan hidup bila beban sel kanker itu telah mencapai jumlah 10^{13} sel atau setelah sel itu menjalani 44-45 kali ganda. Karena kecepatan tumbuh kanker tidak seimbang dengan kecepatan pasokan darah maka ada sebagian sel kanker akan tidak tumbuh dan mengalami nekrose.⁴

Banyak data yang menunjukkan bahwa faktor imunitas mempunyai pengaruh yang besar pada timbul, pertumbuhan dan terapi kanker. Sel kanker berbeda dengan sel normal, dan sistem imunitas dapat mengenal perbedaan itu. Kemampuan imunoterapi menghancurkan sel-sel kanker terbatas. Diperkirakan sampai sejumlah 10^{4-5} sel kanker. Diperlukan imunostimulator untuk meningkatkan kemampuan imunitas.^{4,11}

BAB III
KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1. KERANGKA TEORI



Ket: mo:makrofag

3.2. KERANGKA KONSEP



3.3. HIPOTESIS

1. Proliferasi sel pada mencit yang diberi kombinasi *cyclophosphamid*-TF lebih rendah dibandingkan yang diberi *cyclophosphamid* saja atau TF saja.
2. Volume tumor pada mencit yang diberi kombinasi *cyclophosphamid*-TF lebih kecil dibandingkan yang diberi *cyclophosphamid* saja atau TF saja.
3. Terdapat pengaruh positif proliferasi sel terhadap volume tumor pada adeno ca mammae mencit.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. DESAIN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain “*Post test only control group*”. Kelompok penelitian ini dibagi menjadi 4 kelompok yaitu:

- K: Kelompok kontrol, mencit yang diinokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan digunakan sebagai kontrol.
- P1: Kelompok perlakuan 1, mencit yang diinokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan, mendapat terapi kemoterapi dengan *cyclophosphamid*.
- P2: Kelompok perlakuan 2, mencit yang diinokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan, mendapat terapi *transfer factor*.
- P3: Kelompok perlakuan 2, mencit yang diinokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan, mendapat terapi kemoterapi dengan *cyclophosphamid* dan *transfer factor*.

4.2. RUANG LINGKUP PENELITIAN

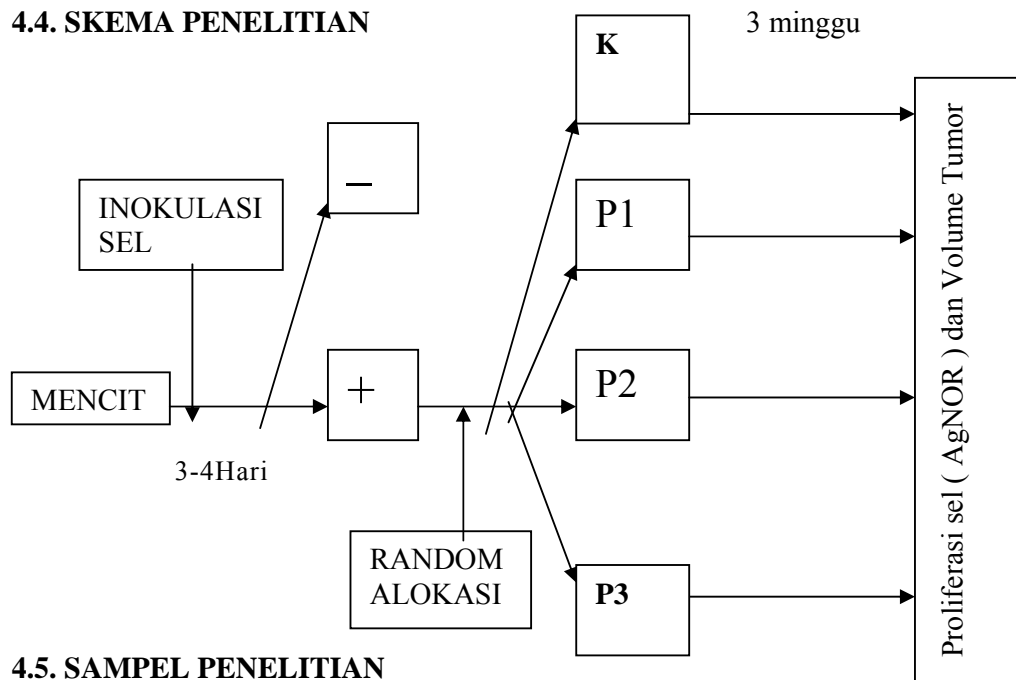
Ruang lingkup ilmu bedah Onkologi dan ilmu Biomedik

4.3. WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 6 bulan. Perlakuan terhadap mencit dan pengambilan jaringan dilakukan di laboratorium Biokimia FK UNDIP, proses pembuatan blok parafin sampai pewarnaan *Haematoxillin Eosin* (HE) dan

hitung AgNOR, dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi RSUP dr. Kariadi/FK UNDIP Semarang.

4.4. SKEMA PENELITIAN



4.5. SAMPEL PENELITIAN

Mencit C3H diperoleh dari laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

4.5.1. Kriteria inklusi

- Mencit betina C3H keturunan murni
- Berusia 3 bulan
- Berat badan 20-30 gram
- Telah diaklimatisasi dan tidak ada kelainan anatomi

4.5.2. Kriteria eksklusi

- Hewan percobaan tidak berhasil diinokulasi tumor
- Selama percobaan ada mencit yang sakit.

4.5.3. Besar sampel

Menurut WHO, untuk penelitian preklinik dengan hewan percobaan tiap kelompok perlakuan minimal 5 ekor mencit. Pada penelitian ini jumlah sampel tiap kelompok berjumlah 5 ekor mencit. 20 mencit yang telah berhasil diinokulasi dilakukan randomisasi menjadi 4 kelompok:

- Kelompok K: 5 mencit
- Kelompok P1: 5 mencit
- Kelompok P2: 5 mencit
- Kelompok P3: 5 mencit

4.5.4. Cara pengambilan sampel

Masing- masing sampel dieksisi kemudian diukur volume tumor dengan alat pletismometer lalu dibuat preparat setebal 6 mikron kemudian dilakukan pewarnaan dengan HE kemudian dihitung proliferasi sel dengan hitung AgNOR.

4.6. VARIABEL PENELITIAN

4.6.1. Variabel Bebas

Sebagai variabel bebas adalah:

- Pemberian *cyclophosphamid*
- Pemberian *transfer factor*
- Pemberian *cyclophosphamid* dan *transfer factor*

4.6.2. Variabel Tergantung

Sebagai variabel tergantung adalah proliferasi sel (AgNOR) dan volume tumor

4.7. DEFINISI OPERASIONAL

4.7.1. Proliferasi sel (AgNOR)

Rata-rata persentase dari jumlah bintik hitam yang terletak pada 100 inti sel ganas yang dihitung di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x. Skala pengukuran hitung AgNOR adalah skala numerik berupa angka 1-10. Penghitungan hitung AgNOR dilakukan oleh ahli patologi anatomi.

4.7.2. Volume Tumor

Volume tumor adalah volume (dalam ml) jaringan tumor yang diambil secara intoto yang diukur dengan alat pletismometer. Skala pengukuran volume tumor adalah skala numerik berupa angka x ml

4.7.3. *Transfer Factor*

Transfer factor adalah oligoribonukleotida dengan berat 3500-6000 kda yang berpasangan dengan sebuah molekul peptida. Diperoleh dari pemurnian kolostrum sapi yang diproduksi oleh 4life. Dosis adalah dosis maksimal yang dianjurkan pada manusia dengan dikalikan angka konversi untuk mencit 20g yaitu 0,0026, dibagi dalam 3 dosis dan diberikan dengan menggunakan pipet secara peroral. Skala pengukuran dari dosis TF adalah skala numerik.

4.7.4. *Cyclophosphamid*

Cyclophosphamid adalah zat pengalkil yang mempunyai berat molekul 290,10. Dosis adalah dosis yang dianjurkan untuk terapi kanker pada manusia sebesar 30 mg tablet oral dengan dikonversikan untuk mencit 20g yaitu 0,0026 diberikan

dengan pipet secara peroral. Skala pengukuran dari dosis *cyclophosphamid* adalah skala numerik.

4.8. ALAT DAN BAHAN PENELITIAN

4.8.1. Bahan untuk pemeriksaan histopatologi rutin

- Phospat buffer formalin 10%
- Alkohol 70%, 80%, 96%, absolute
- Xylol
- Parafin cair (Histoplast)
- Albumin dan Pole-L-Lysine
- Bahan pengecatan HE
- Canada balsam dan Entelan

4.8.2. Alat transplantasi jaringan tumor pada mencit

- Cawan petri ukuran 6 Cm
- Cawan petri ukuran 15 Cm
- Cawan ukuran 10 Cm
- Sduit lcc
- Jarum suntik trokar
- Gunting lurus 10 Cm
- Gunting bengkok 10 Cm .
- Pinset anatomi 10 Cm
- Pinset biasa 12 Cm
- Alat fiksasi

4.8.3. Alat untuk sediaan penelitian dengan pewarnaan HE

- Digital Tissue Processor Leica R
- Tissue Blocking Leica R EG-1160
- Inkubator suhu 56° C MemmertR
- Mikrotom Leica ' RM-2131.5
- Auto Stainer Leica-XLR
- Kaca obyek dan kaca penutup

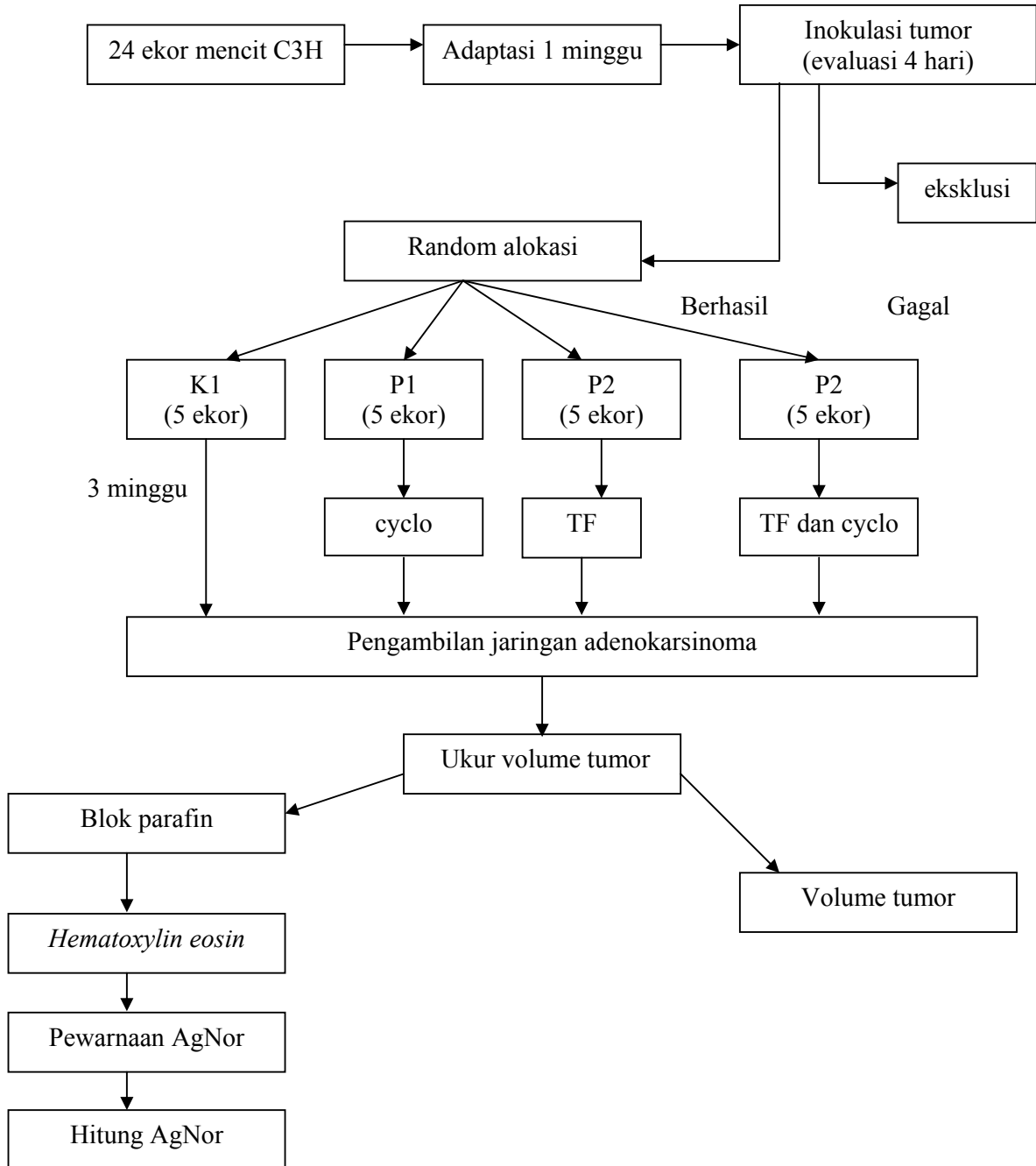
4.8.4. Alat untuk pengecatan dan dokumentasi sediaan

- Unit Multi Head Microscope OlympusR
- Nikon Digital Net Camera DN 100 + SD Card
- 1 Unit Personal Computer Intel Pentium' ~ Processor

4.9. PELAKSANAAN PENELITIAN

Dua puluh ekor mencit tersebut kemudian diinokulasi tumor, diamati selama 4 hari, dan jaringan tumor yang disuntikkan tidak mengalami regresi. Mencit yang berhasil diinokulasi dibagi menjadi 4 kelompok yang ditentukan secara acak. Masing-masing kelompok dikandangkan secara individual dan mendapatkan pakan standar yang sama dan minum ad libitum. Perlakuan yang diberikan seperti di atas dan pemberian TF dilakukan dengan pipet mikro.

4.9.1. Alur kerja



Cyclo= cyclophosphamid, TF = Transfer factor

4.9.2. Prosedur pemeriksaan

4.9.2.1. Prosedur transplantasi tumor

Mencit donor dimatikan dengan ether, kemudian diletakkan terlentang pada tatakan / alas fiksasi dan keempat kakinya difiksasi dengan jarum. Kulit dibagian yang bertumor diusap dengan alkohol 70 %, kemudian dibuat sayatan dengan gunting lurus, untuk mengeluarkan tumor. Tumor diletakkan di cawan petri kecil yang telah terlebih dahulu dicuci dengan garam fisiologis dan diletakkan diatas es.

Amati bentuk dan keadaan tumor, kemudian ambil/potong jaringan tumor yang masih baik yaitu bagian yang tanpa nekrosis (biasanya di daerah tepi jika tumor besar) sebanyak kira-kira yang dapat menghasilkan bubur tumor paling sedikit 1 ml dan taruh dicawan petri kecil lainnya. Bersihkan dari jaringan ikat (simpai), jaringan nekrotik dan darah, kemudian cacah / potong-potong sampai halus dengan gunting hingga akhirnya terbentuk "bubur tumor" yang partikelnya dapat melewati jarum trokar. Tambahkan garam fisiologis lebih kurang sama banyak dengan volume tumor. Bubur tumor disuntikkan subkutan di aksila kanan mencit dengan dosis 0,2 ml. Sisa tumor yang padat di masukkan ke dalam botol formalin untuk dibuat sediaan mikroskopik.

Masing-masing mencit diberi nomor ditelinganya dan dimasukkan dalam kandang yang berbeda yang diberi label berisi : jenis kelompok perlakuan tanggal transplantasi

4.9.2.2. Prosedur pembuatan preparat histopatologi

FIKSASI

Potongan adenokarsinoma dimasukkan dalam larutan formalin buffer (larutan formalin 10% dalam buffer Natrium fosfat sampai mencapai pH 7,0). Setelah fiksasi selesai, jaringan dimasukkan dalam larutan aquadest selama 1 jam untuk proses penghilangan larutan fiksasi.

DEHIDRASI

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

IMPREGNASI

Jaringan dimasukkan dalam parafin cair selama 2x2 jam.

EMBEDDING

Jaringan ditanam dalam parafin padat yang mempunyai titik lebur 56-58°C, ditunggu sampai parafin padat. Jaringan dalam paraffin dipotong setebal 4 mikron dengan mikrotom. Potongan jaringan ditempelkan pada kaca obyek yang sebelumnya telah diolesi polilisin sebagai perekat. Jaringan pada kaca obyek dipanaskan dalam inkubator suhu 56-58°C sampai parafin mencair.

4.9.2.2.1. Pewarnaan jaringan dengan H&E

Secara berurutan jaringan pada kaca obyek dimasukkan dalam:

1. Xylol	1 menit	11. Air	15 detik
2. Xylol	2 menit	12. Alkohol 80%	15 detik
3. Xylol	2 menit	13. Alkohol 96%	30 detik
4. Alkohol 100%	1) menit	14. Alkohol 100%	45 detik
5. Alkohol 96%	2 menit	15. Xylol	1 menit
6. Alkohol 70%	1 menit	16. Xylol	1 menit
7. Air	1 menit		
8. Maver HE	7,5 menit		
9. Air	7,5 menit		
10. Eosin 0,5%	1menit		

4.9.2.2.2. Prosedur pewarnaan AgNOR :

1. Blok paraffin yang berisi jaringan dipotong setebal 3mikron dan dilekatkan pada kaca obyek.
2. Potongan jaringan dilakukan deparafiniasi dan rehidrasi dengan aquadest
3. Potongan jaringan dimasukkan dalam ruang gelap
4. Inkubasi potongan jaringan dengan larutan AgNOR selama 45-60 menit.
5. Celupkan potongan jaringan sebanyak 3x dalam aquadest.
6. Potongan jaringan dilakukan dehidrasi dengan alkohol bertingkat 50% sampai absolut.
7. Rendam dalam xylol selam 30 menit

8. Mounting dengan balsam Canada
9. Siap dilihat dibawah mikroskop cahaya
10. Larutan AgNOR: campuran 2 bagian AgNO₃ 50% dan 1 bagian (asam format + gelatin)

4.10. ANALISIS DATA

1. Data yang terkumpul akan diedit, di-koding dan di-*entry* ke dalam file komputer. Setelah itu dilakukan cleaning data.
2. Kemudian dilakukan analisis statistik dengan menggunakan software SPSS 15 sbb. :
 - Pertama dilakukan analisis deskriptif dengan menghitung ukuran kecenderungan sentral (mean dan median) serta sebaran data (SD) variabel menurut kelompok perlakuan.
 - Dilakukan uji normalitas data dengan uji Kolmogorov-smirnov dan penggambaran distribusi data.
 - Dilakukan uji kesamaan varian dengan uji Pillai's Trace
 - Data proliferasi sel (AgNOR) dari keempat kelompok memenuhi syarat uji ANOVA yaitu sebaran data normal dan varian data sama. Kemudian dilakukan analisis menggunakan uji multivariat ANOVA dengan tingkat kepercayaan 95%.
 - Data perbedaan volume tumor antara keempat kelompok memenuhi syarat uji ANOVA yaitu sebaran data normal dan varian data sama. Kemudian dilakukan analisis dengan uji multivariat ANOVA dengan tingkat kepercayaan 95%.

- Signifikansi dari korelasi antara proliferasi sel (AgNOR) dan volume tumor dinilai dengan uji Pearson Product Momen. Dilanjutkan uji Regresi untuk mengetahui besar pengaruh proliferasi sel (AgNOR) terhadap volume tumor.^{42,43}

BAB V

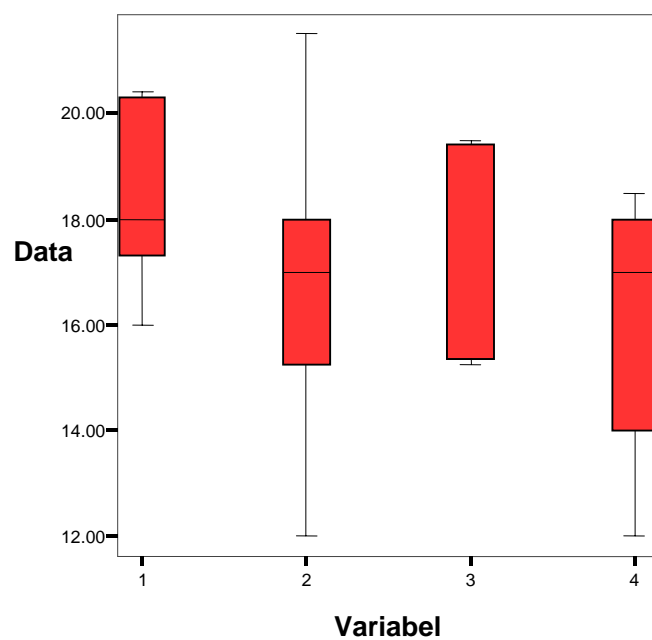
HASIL PENELITIAN

Telah dilakukan penelitian eksperimental laboratorik untuk menganalisa pengaruh TF terhadap proliferasi sel (AgNOR) dan volume tumor pada bulan November 2007. Kami mendapatkan mencit betina C3H murni dari FK UI sejumlah 24 ekor, kemudian dilakukan adaptasi selama 1minggu. Mencit diinokulasi tumor, ditunggu hasil pertumbuhan tumor \pm 4hari. Semua mencit berhasil diinokulasi. Mencit dibagi 4 kelompok, dikandangan sesuai kelompok perlakuan dan diberi makan standart ad libitum. *Cyclophosphamid* diberikan sekali secara oral melalui pipet sedangkan TF diberikan peroral melalui pipet setiap hari dengan dosis terbagi 3 selama 3 minggu. Dalam pengamatan dan perlakuan selama 3 minggu ada 2 ekor mencit yang mati karena tak mau makan (dari kelompok kontrol dan kelompok *cyclophosphamid*) dan 1 mencit yang mati akibat aspirasi. Pada pengamatan terakhir didapatkan 21 mencit, untuk mempermudah analisis, kami memutuskan menggunakan 20 ekor yang masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor. Setelah mencit dimatikan dengan menggunakan zat ether, masa tumor diekstirpasi secara intoto. Masa tumor dibelah menjadi beberapa bagian untuk memudahkan pengukuran volume dengan alat pletismometer. Setelah diukur volumenya, masa tumor dimasukkan dalam larutan formalin buffer selanjutnya dibuat prosedur pembuatan preparat histopatologi dan penghitungan AgNOR di lab Patologi Anatomi RSUP dr.Kariadi/ FK UNDIP Semarang.

5.1 Hasil Analisis Deskriptif

Tabel 2. Hasil analisis deskriptif berdasarkan volume tumor (cc)

Volume Tumor	Kontrol	Cyclo	TF	Kombinasi
< 15 ml	-	1	-	1
15 - 20 ml	3	3	5	4
> 20 ml	2	1	-	-
N	5	5	5	5
Mean ± SD	18,90 ± 1,93	17,35 ± 1,15	16,17 ± 1,17	15,9 ± 2,79



ket : 1 : kontrol

2 : *cyclophosphamid*

3 : *transfer factor*

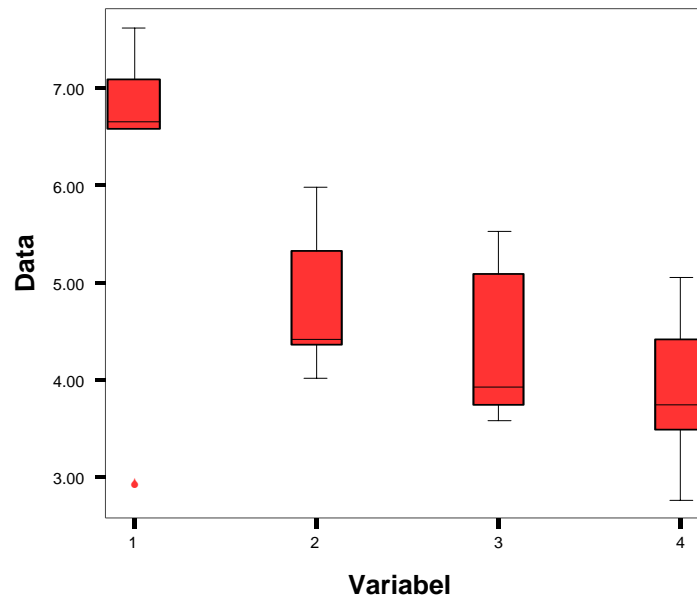
4 : kombinasi

Gambar 13. Grafik box plot dari volume tumor

Dari tabel tersebut dapat dianalisis bahwa 60% kelompok kontrol mempunyai volume tumor antara 15-20 ml, demikian juga untuk kelompok *cyclo*. Pada kelompok TF keseluruhan volume tumor berkisar 15-20 ml. Pada kelompok kombinasi 80% volume tumor antara 15-20 ml dan 20% sisanya mempunyai volume <15 ml. Dari tabel tersebut juga dapat dianalisis bahwa kontrol memiliki nilai rerata 18,9, *cyclophosphamid* memiliki nilai rerata 17,35, TF memiliki nilai rerata 16,16, kombinasi memiliki nilai rerata 15,9. Sebaran data yang ada pada kelompok kontrol berkisar 1,93, pada kelompok *cyclophosphamid* berkisar 1,146, pada kelompok TF berkisar 1,173, dan pada kelompok kombinasi berkisar 2,793. Nilai rerata terendah diperoleh oleh kombinasi. Nilai tengah data (median) yang diperoleh kelompok kontrol adalah 18, nilai median yang diperoleh kelompok *cyclophosphamid* adalah 17, nilai median yang diperoleh kombinasi adalah 17. Terlihat dua nilai median yang sama yaitu kelompok *cyclophosphamid* dan kombinasi. Dari hasil analisis tersebut kelompok *cyclophosphamid* dan TF mempunyai sebaran yang hampir sama, hal ini menunjukkan efek *cyclophosphamid* dan TF mempunyai pengaruh yang hampir sama.

Tabel 3. Hasil analisis diskriptif berdasarkan proliferasi sel (AgNOR)

Proliferasi Sel	Kontrol	Cyclo	TF	Kombinasi
1 - 3	1	-	-	1
3 - 6	-	5	5	4
6 - 10	4	-	-	-
N	5	5	5	5
Mean ± SD	7,16 ± 0,58	4,81 ± 0,80	4,96 ± 0,36	3,89 ± 0,87



Gambar14. Grafik box plot dari proliferasi sel

ket : 1 : kontrol

3 : *transfer factor*

2 : *cyclophosphamid*

4 : kombinasi

Dari tabel tersebut dapat dianalisis bahwa 80% nilai hitung AgNOR pada kelompok kontrol antara 6-10. Keseluruhan nilai hitung AgNOR kelompok cyclo dan TF antara 3-6. Pada kelompok kombinasi 80% diantaranya mempunyai nilai hitung AgNOR antara 3-6 dan 20 % sisanya mempunyai nilai AgNOR < 3. Dari tabel tersebut dapat dianalisis bahwa kontrol memiliki rerata 7,15 *Cyclophosphamid* memiliki rerata 4,818, TF memiliki rerata 4,96, kombinasi memiliki rerata 3,88. Rerata *Cyclophosphamid* lebih rendah dari TF. Kombinasi TF dengan *cyclophosphamid* menjadikan rata-rata proliferasi sel tumor menjadi lebih rendah. Dari kedua efek tersebut menunjukkan rata-rata proliferasi sel tumor

dan volume tumor menjadi lebih rendah ketika TF dengan *cyclophosphamid* dikombinasikan. Sebaran data yang ada pada kelompok kontrol berkisar 0,577. Sebaran data yang ada pada kelompok *cyclophosphamid* berkisar 0,806. Sebaran data yang ada pada kelompok TF berkisar 0,361. Sebaran data yang ada pada kelompok kombinasi berkisar 0,876. Dengan demikian proliferasi sel (AgNOR) dengan *cyclophosphamid* memiliki sebaran data lebih besar dari efek TF. Nilai tengah data (median) yang diperoleh kelompok kontrol adalah 7,08, nilai median yang diperoleh kelompok *cyclophosphamid* adalah 4,42, nilai median yang diperoleh kombinasi adalah 3,73.

5.2. Analisis Uji Normalitas

Kriteria pengujian : Data berdistribusi normal jika nilai sig. lebih dari 0,05. Dari hasil pengujian normalitas data, ternyata data tersebut dalam kondisi normal karena nilai signifikansinya $p = 0,697 > \alpha = 0,05$.

5.3. Signifikansi dari Perbedaan Variabel

Hipotesis uji : H_0 : Kontrol = *Cyclophosphamid* = Transfer Factor = Kombinasi. H_a : Salah satu ada yang berbeda. Kriteria pengujian : H_0 ditolak jika nilai p yang diperoleh kurang dari taraf signifikansi $\alpha = 0,05$ (5%). H_0 di terima jika nilai p yang diperoleh lebih dari taraf signifikansi $\alpha = 0,05$ (5%).

5.3.1 Volume Tumor

Karena nilai p lebih dari nilai $\alpha = 0,05$ atau $0,086 > 0,05$, maka H_0 diterima, atau dengan kata lain signifikansi dari perbedaan volume tumor antara keempat kelompok analisis dengan menggunakan uji multivariat ANOVA dengan tingkat kepercayaan 95% diterima.

5.3.2 Proliferasi Sel (AgNOR)

Karena nilai p kurang dari nilai $\alpha = 0,05$ atau $< 0,001$ maka H_0 ditolak, atau dengan kata lain signifikansi dari perbedaan antara keempat kelompok analisis dengan menggunakan uji multivariat ANOVA dengan tingkat kepercayaan 95% ditolak. Jadi perlu dianalisis lebih lanjut dengan menggunakan uji Post Hoc untuk mengetahui kelompok mana saja yang terdapat perbedaan proliferasi sel yang bermakna, dengan hasil sebagai berikut :

Tabel 4. Hasil uji Post Hoc dari proliferasi sel

Variabel		p	95 % Konfiden Interval	
			<i>Lower bound</i>	<i>Upper Bound</i>
Kontrol	Cyclo	<0,001	1,4199	3,2601
	TF	<0,001	1,2699	3,1101
	Kombinasi	<0,001	2,3519	4,1921
Cyclo	Kontrol	<0,001	-3,2601	-1,4199
	TF	0,734	-1,0701	0,7701
	Kombinasi	0,047	0,0119	1,8521
TF	Kontrol	0,000	-3,1101	-1,2699
	Cyclo	0,734	-0,7701	1,0701
	Kombinasi	0,024	0,1619	2,0021
Kombinasi	Kontrol	<0,001	-4,1921	-1,3519
	Cyclo	0,047	-1,8521	-0,0119
	TF	0,024	-2,0021	-0,1619

Dari hasil analisis Post Hoc, atau analisis lanjutan untuk uji banding yang diberikan oleh keempat variabel menunjukkan hanya perbedaan variabel *cyclophosphamid* dan TF saja yang signifikansinya tidak bermakna dengan nilai $\text{sig.} = 0,734 > 0,05$. Sedangkan untuk kontrol-*cyclophosphamid*, kontrol-TF, kontrol-kombinasi mempunyai nilai signifikansi yang sama yaitu $0,000 < 0,05$ dengan kata lain perbedaan antara variabel tersebut bermakna. Signifikansi antara

cyclophosphamid-kombinasi diperoleh nilai sig.: $0,047 < 0,05$, sedangkan signifikansi antara TF-kombinasi diperoleh nilai : $0,024 < 0,05$ sehingga kedua variabel perbedaannya bermakna .

5.4. Pengaruh Proliferasi Sel (AgNOR) Terhadap Volume Tumor

Nilai korelasi yang dimaksud adalah nilai korelasi dari dua variabel yang saling berhubungan. Angka korelasi yang diperoleh sebesar 0,496 dengan nilai signifikansi sebesar 0,026. Penjelasan mengenai nilai korelasi positif maupun negatif mudah dimengerti, begitu juga untuk nilai nol, yang berarti tidak ada hubungan linier. Menurut Young,⁴⁴ ukuran korelasi adalah sebagai berikut :

1. 0,70 – 1,00 (baik positif atau negatif) menunjukkan adanya derajat korelasi yang tinggi
2. 0,40 – < 0,70 (baik positif atau negatif) menunjukkan hubungan yang substantial
3. 0,20 – < 0,40 (baik positif atau negatif) menunjukkan adanya derajat korelasi yang rendah
4. < 0,20 (baik positif atau negatif) berarti dapat diabaikan

Hal ini berarti kedua variabel menunjukkan hubungan yang substantial, artinya derajat korelasinya sedang. Pengaruh yang diberikan tidak terlalu tinggi, tetapi juga tidak rendah.

Persamaan Regresi diperoleh adalah:

$$\hat{Y} = 13,134 + 0,758X \rightarrow \hat{Y} = \text{Volume tumor, } X = \text{Proliferasi Sel (AgNOR)}$$

Persamaan regresi dengan prediktor proliferasi sel (AgNOR) diperoleh hasil positif, dengan demikian pengaruh positif diberikan oleh proliferasi sel (AgNOR)

terhadap volume tumornya. Dengan demikian jika diberikan satu satuan proliferasi maka akan meningkatkan besar volume tumornya.

Pengujian ini dipergunakan uji F untuk mengetahui apakah hasil persamaan regresi yang dihasilkan memang benar-benar signifikan ataulah hanya karena kebetulan saja. Pengujian ini diukur pada suatu taraf keyakinan tertentu yaitu 95% ($\alpha = 5\%$). Kriteria pengujian : H_0 diterima jika $F_{hitung} < F_{tabel}$

$$H_0 \text{ ditolak jika } F_{hitung} > F_{tabel}$$

Karena nilai F_{hitung} lebih dari F_{tabel} atau $5,859 > 4,413$ maka H_0 ditolak, atau dapat dilihat nilai signifikansinya yaitu $0,026 < \alpha = 0,05$, atau dengan kata lain ada pengaruh antara proliferasi sel (AgNOR) terhadap volume tumornya. Pengaruh yang diberikan kedua variabel menuju arah positif seperti ditunjukkan pada nilai kritik r_{xy} yang telah diuraikan di atas.

Besar pengaruh antara proliferasi sel (AgNOR) terhadap volume tumor yang diberikan sebesar 0,204 atau 20,4%, sedangkan 79,6% lainnya dipengaruhi oleh faktor yang tidak diteliti pada penelitian ini.

BAB VI

PEMBAHASAN

Kemoterapi merupakan terapi sistemik yang diindikasikan untuk tumor malignansi sistemik yaitu tumor yang telah dibuktikan atau diduga telah menyebar secara sistemik. *Cyclophosphamid* merupakan sitostatika golongan zat pengalkil yang mempunyai gugus alkil reaktif sebagai basa analog sitosin yang berikatan dengan guanin. *Cross-link* yang terjadi merubah ekspresi dari nukleotida sehingga RNA polimerase tak dapat memotong rantai *double helix* DNA. Akibat yang ditimbulkan dari *cyclophosphamid* adalah penghambatan proliferasi dari sel kanker. *Cyclophosphamid* merupakan zat pengalkil yang bekerja pada fase tidak spesifik, sehingga akibat yang ditimbulkan tidak hanya pada sel kanker tetapi juga sel normal lain termasuk sel hemopoitik.

Penurunan sel hemopoitik mengakibatkan penurunan imunitas tubuh. Kenyataan klinik adanya peranan imunitas tubuh dalam penanganan kanker ditunjukkan dengan adanya kejadian-kejadian berikut : adanya regresi spontan pada beberapa jenis tumor (kejadian ini 1: 1000 kasus), timbulnya residif setelah adanya remisi yang lama, pada percobaan transplantasi tumor autologous pada penderita sendiri menunjukkan *take* yang rendah. Dalam *imunosurveillance* peranan sistem imun seluler lebih dominan dibandingkan dengan sistem imun humoral. Terutama sel NK yang akivitasnya dihubungkan dengan prognosis karena kemampuannya dalam mencegah metastasis dengan mengeliminasi sel kanker dalam sirkulasi. Kemampuan sistem imun tubuh menghancurkan sel

kanker terbatas, diperkirakan maksimal 10^{4-5} sel atau tumor sebesar 1mm.³⁷ Diperlukan suatu imunostimulator untuk meningkatkan kemampuan sel imun tubuh dalam membunuh sel kanker dan mengurangi efek samping dari penanganan kanker secara konvensional (operasi, radiasi dan kemoterapi).⁴

Transfer factor merupakan salah satu imunostimulator yang diproduksi oleh sel limfosit T. TF dapat mentransfer kemampuan pengenalan terhadap patogen ke sel walaupun tidak kontak dengan patogen tersebut (sebagai fungsi memori). TF juga dapat meningkatkan kemampuan sistem imun dalam bereaksi terhadap patogen, memicu pengenalan limfosit T terhadap antigen sehingga mengurangi masa jangkitan penyakit. Seperti kolostrum yang juga mengandung hormon pertumbuhan, TF juga mengandung IGF-1 natural yang istimewanya mampu mengadakan ikatan dengan reseptornya lebih dari 30 menit.⁹

Bulan Februari 1999, *Journal of American nutraceutical association* telah mempublikasikan 196 produk atau kombinasi dari 400 produk yang telah diuji, 44 diantaranya mampu meningkatkan aktivitas sel NK. Yang paling kuat diantaranya mampu meningkatkan 48,6% aktivitas sel NK. Namun TF mampu meningkatkan aktivitas sel NK sebanyak 103%.⁹ Darryl See dkk meneliti pemberian TF yang dikombinasikan dengan nutrisi lain pada 20 penderita kanker stadium III-IV dengan umur rata-rata 49,3th. Hasil yang diperoleh mampu meningkatkan fungsi sel NK sekitar 400%.⁸ *Ministry of Health and Social Development of The Russian Federation* telah melakukan studi klinis pemberian TF untuk berbagai penyakit seperti : HIV, hepatitis B dan C, herpes, osteomielitis, dan Ca lambung mampu memperbaiki efektivitas dan lama terapi.³²

Pertumbuhan dan proliferasi sel merupakan dua hal yang berkaitan erat pada fenomena koordinasi biologi. Pada saat proliferasi, penambahan sintesis protein dipenuhi dengan cara merubah biogenesis ribosom. Untuk melihat perubahan gen pada sel kanker yang berhubungan dengan biogenesis ribosom dapat ditunjukkan dengan kuantitas dari *nuclear organization region* (NOR). Perwarnaan NOR dengan perak (Ag) disebut AgNOR. Pewarnaan AgNOR ternyata juga dapat mengekspresikan perubahan status TP53, pRb serta HER-2. Menurut Miranti dan Bankfalvi pemeriksaan AgNOR yang murah dapat dipertimbangkan sebagai prediktor negatif terapi herceptin dan memperkirakan prognosis.^{39,41}

Secara umum jumlah sel yang ada pada suatu jaringan merupakan fungsi kumulatif antara tumbuhnya sel baru dan keluarnya sel yang ada pada populasi. Pertumbuhan sel baru dalam suatu jaringan sebagian besar ditentukan oleh kecepatan proliferasinya, sementara sel dapat meninggalkan populasinya karena kematian sel atau berdiferensiasi menjadi jenis sel lainnya. Pada umumnya sel kanker tumbuh biner, secara eksponensial (2^n sel) sampai terbentuk gerombolan sel berupa tumor. Makin besar tumor tersebut seakan-akan sel kanker itu tumbuh semakin cepat. Setelah mencapai besar tertentu pertumbuhan sel kanker itu berubah dari tumbuh secara eksponensial menjadi secara Gompertz. Pertumbuhannya menjadi lambat dengan makin bertambah besarnya tumor, karena keterbatasan pasokan darah, ruang tempat tumbuh dan daya imunitas tubuh.⁴

Analisis dari penelitian ini didapatkan angka signifikansi proliferasi sel (AgNOR) sebesar $< 0,001$. Hal ini berarti terdapat perbedaan yang bermakna

antara keempat kelompok. Nilai rerata antara *cyclophosphamid* (4,818) lebih rendah dalam menekan proliferasi sel dibandingkan kelompok yang diberi TF (4,96), hal ini sesuai dengan teori bahwa cara kerja *cyclophosphamid* adalah dengan penghambatan replikasi DNA. Kelompok kombinasi mempunyai rerata yang paling kecil (3,88) diantara keempat kelompok. Dari hasil uji Post Hoc perbedaan proliferasi sel antara keempat variabel menunjukkan nilai yang bermakna : kontrol-TF, kontrol-*cyclophosphamid*, kontrol-kombinasi, *cyclophosphamid*-kombinasi dan TF-kombinasi. Yang menarik walaupun rerata *cyclophosphamid* lebih rendah daripada rerata TF namun pada uji Post Hoc pengaruh *cyclophosphamid* dan TF dalam penghambatan proliferasi sel tidak menunjukkan perbedaan yang berarti ($p=0,734$). Sehingga dapat disimpulkan bahwa komponen kombinasi lebih menghambat proliferasi sel kanker dibanding komponen terpisah

Penghambatan proliferasi sel kanker akibat pemberian TF dan *cyclophosphamid*. *Cyclophosphamid* menghambat proliferasi dengan membentuk *cross-link* rantai *double helix* sel tumor. Selain itu proliferasi sel dihambat akibat pemberian TF yang mengandung IGF-1 dan TNF α . IGF-1 pada TF mampu mengadakan ikatan dengan reseptor pertumbuhan sel lebih dari 30 menit sehingga memblok interaksi hormon pertumbuhan lain dengan reseptor pertumbuhan. Ikatan yang lama antara IGF-1 dan reseptornya (>30detik) membuat komponen dasar IGF-1 hilang dan efeknya justru menghambat proliferasi sel. TNF α . Selain merangsang reaksi imun juga mempunyai efek menghambat proliferasi sel. Penelitian ini sejalan dengan penelitian Fabre dimana pemberian TF pada mencit

yang terinfeksi tuberkulosis mampu menghambat proliferasi bakteri *M.tuberculosis*. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian TF dan *cyclophosphamid* mampu memberikan efek sinergisme dalam menghambat proliferasi sel kanker.³³⁻³⁴

Signifikansi dari perbedaan volume tumor pada keempat kelompok perlakuan didapatkan hasil sebesar 0,086 atau $> 0,05$. Hal ini berarti H_0 diterima atau dengan kata lain tak ada perbedaan bermakna volume tumor antara keempat kelompok. Dilihat dari nilai rerata, TF mempunyai nilai rerata lebih rendah (16,16) dibandingkan *cyclophosphamid* (17,35), hal ini dapat dimengerti dimana aktivitas melisis sel kanker mampu menurunkan volume tumor. Kelompok kombinasi mempunyai rerata yang paling kecil (15,9) diantara keempat kelompok, sehingga disimpulkan bahwa komponen kombinasi lebih menurunkan volume tumor dibanding komponen terpisah

Hal ini mungkin karena adeno Ca mama sebagai obyek penelitian merupakan kanker yang kemoresponsif dan bukan kanker yang kemosensitif. Kemoterapi kanker payudara tidak cukup hanya menggunakan satu regimen. Dalam satu tumor tidak semua sel kanker peka terhadap obat antikanker. Kalau pada pertumbuhan kanker sel itu bertambah secara logaritmik, maka sel yang mati pun secara logaritmik pula. Jumlah sel kanker yang terbunuh oleh obat anti kanker adalah konstan secara proporsional atau persentase tanpa memandang banyaknya sel kanker yang ada, dari minimum 0 % sampai maksimum 99,99 % sel. Hipotesa ini disebut hipotesa Log sel yang Terbunuh (*Log Cell Kill Hypothesis*). Penelitian ini hanya dilakukan selama 3 minggu yaitu hanya sekali siklus

pemberian kemoterapi. Kanker yang kemoresponsif tidak cukup hanya diberikan satu kali siklus kemoterapi. Pemberian imunostimulator memerlukan waktu untuk mendapatkan hasil maksimal.^{16,17,18,19}

Nilai korelasi yang diperoleh antara proliferasi sel (AgNOR) dengan volume tumor adalah 0,496, menunjukkan korelasi substansial, artinya korelasinya bernilai positif dengan derajat korelasi sedang. Signifikansi dari korelasi antar proliferasi sel dan volume tumor didapatkan hasil sebesar 0,026 atau dengan kata lain ada korelasi bermakna antara kedua variabel. Pengaruh proliferasi sel terhadap volume tumor pada penelitian ini sebesar 20,4% sedangkan 79,6% dipengaruhi oleh faktor lain yang tidak diteliti dalam penelitian.

Hasil analisis penelitian ini sejalan dengan teori bahwa proliferasi sel mempengaruhi jumlah volume tumor. Pada pertumbuhan eksponensial, semakin cepat proliferasi semakin besar volume tumor, walaupun waktu gandanya tetap. Pada batas tertentu memasuki pertumbuhan Gompertz, makin besar volume tumor makin pelan tumbuhnya, akibat keterbatasan vaskularisasi dan tempat tumbuh. Oleh karena itu selain proliferasi sel, faktor lain yang mempengaruhi volume tumor seperti : jumlah sel yang apoptosis, ruang tempat tumbuh, vaskularisasi dan daya imunitas hospes itu sendiri perlu diteliti lebih lanjut.⁴

Penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian imunoterapi (*transfer factor*) mampu meningkatkan sinergisme *cyclophosphamid* dalam penekanan proliferasi sel. Penelitian ini juga mendukung tentang pentingnya pemberian imunoterapi dalam penanganan kanker terutama yang mendapat kemoterapi. Contohnya adalah penelitian Tonini yang menambahkan imunoterapi (IL-2 dan

IFN) pada penderita kanker payudara yang diterapi *cyclophosphamid* dan penelitian Andrei I yang menambahkan IL-15 pada penanganan kanker paru yang diberi *cyclophosphamid*.²²⁻²³ Keduanya mendapatkan hasil peningkatan aktivitas imun seluler dan memperpanjang masa hidup penderita. Penelitian ini juga sejalan dengan penelitian Fabre yang menyimpulkan bahwa pemberian TF dan kemoterapi konvensional mempunyai efek sinergis dalam menghambat proliferasi bakteri tuberkulosis.³³

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. KESIMPULAN

1. *Transfer factor* berperan menurunkan proliferasi sel dalam penanganan kanker .
2. Pemberian kombinasi antara *transfer factor* dan *cyclophosphamid* mempunyai efek sinergis dalam menurunkan proliferasi sel kanker.
3. Didapatkan hubungan yang signifikan antara peningkatan volume tumor dengan proliferasi sel. Dalam penelitian ini proliferasi sel mempunyai pengaruh positif terhadap volume tumor, pengaruhnya sebesar 20,4%.

7.2. SARAN

Untuk menyempurnakan konsep pemikiran dan kajian, masih diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai peran *transfer factor* lain seperti: indek perforin, jumlah sel NK, jumlah neutrofil, TNF, maupun indek apoptosis terhadap sel kanker.

Penilaian histologi dengan hitung AgNOR selain mampu melihat proliferasi sel, harganya yang murah serta mudah dikerjakan merupakan alternatif pemeriksaan rutin penanganan kanker payudara.

DAFTAR PUSTAKA

1. American Cancer Society. What Are The Key Statistic for Breast Cancer. Retrieved , Mei 2007.
2. American Cancer Society. Cancer Fact and Figures. Retrieved, April 2007 : 07-04
3. Sarjadi, Trihartini. Cancer registration in Indonesia. Asian Pacific J Cancer 2001; 2(Supplement):21-4.
4. Sukardja IDG. Onkologi Klinik. 2nded. Surabaya: Airlangga University Press, 2000
5. Selgrade M K, Daniels M J, Hu P C, Miller F J, and Graham J A . Effects of immunosuppression with cyclophosphamide on acute murine cytomegalovirus infection and virus-augmented natural killer cell activity. American Society of Microbiology December 2000;38:1046-55
6. Abbas A, Lichtman AH, Pober JS. Celluler and Moleculer Immunology. 5thed. Philadelphia: Elsevier-Saunders, 2005
7. Tjindarbumi. Penanganan Kanker Payudara Masa Kini dengan Berbagai Issue di Indonesia. Disampaikan pada Indonesian Issues on Breast Cancer, Simposium PERABOI, Surabaya, 2004
8. Bennett R, Gunaan SH. Transfer Factor Penemuan Baru Mempertingkatkan Pengetahuan Kita Tentang Imunit. 2007 [cited July 20]. Available from:URL:<http://www.google.com/Imunity-Transfer-Factor.html>

9. Elkin R. Transfer factor Pengukuh Imun Semula Jadi yang Terkini. Utah : Woodland Publishing, 2001.
10. Trere D, Ceccarelli C, Montanaro L, Tosti E, Derenzini M. Nukleolar Size and Activity Are Related by pRb and p53 Status in Human Breast Cancer. *Journal of Histochemistry and Citochemistry* 2004;52:1601-7
11. Robbins SL, Kumar V, Cotran RZ. Buku Ajar Patologi. 7thed. Vol I. Jakarta: EGC, 2007
12. Sarjadi. Patologi Umum dan Sistematik. 2nd ed. vol 2. Jakarta : EGC 2000.
13. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC Breast Cancer. *BMJ* 2000;321:624-8
14. Blamey RW, Wilson ARM, Patrick J. Screening for Breast Cancer. In: Dixon JM. ABC of Breast Cancer. 2nded. London:BMJ 2000:33-7
15. Bowcock AM. Breast Cancer: Molecular Genetic, Pathogenesis, and Therapeutics. New Jersey: Humana Press 1999.
16. Smets LA, Pinedo RM, Van De Velde CJH. Prinsip-Prinsip Kemoterapi. Dalam: Onkology. Panitia Kanker RSUP Dr. Sardjito. 5thed. Yogyakarta, 1999 :217-31
17. Baquiron DC. Cancer Chemotherapy Handbook. 2nded. Philadelphia: Lippincott's, 2001:13-41.
18. Hwu P. Genetic Therapy. In : Devita JVT, Helman S, Rovenberg SA, Ed. Cancer Principle and Practice of Oncology. 6thed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2001 : 3161-76

19. Beretta G. Cancer Treatment Medical Guide. 10th ed. Milan: Farmitalia Carlo Erba-Erbamont, 1991: 174-6
20. United States Pharmacopeial Convention. USP DI Drug Information for The Health Care Profesional. 12nded.Vol I A.Arcat Graphic, 1992.p.1097-104
21. Wikipedia Free Encyclopedia. Cyclophosphamide Adelaide. 2007 [cited 2007 July7]. Available from: URL: <http://www.wikipedia.org/wiki/cyclophosphamide.html>
22. Tonini G, Nunziata C, Prete SP, Peponi R, Turriziani M, Masci G et al. Adjuvant Treatment of Breast Cancer: A Pilot Imunochemoterapy Study with CMF, Interleukin-2 and Interferon alpha. Cancer Immunol Immnother 1998;47:157-66
23. Chapoval AI, Fuller JA, Kremlev SG, Kamda SJ, and Evan R. Combination Chemotherapy and IL-15 Administration Induce Permanen Tumor Regression in a Mouse Lung Tumor Model: NK and T Cell Mediated Effects Antagonized by B Cells. The American Assosiation of Immunologist 1998:6978-83
24. Restifo NP, Wundelich JR. Essential of Imunology. In: Devita JVT, Elman S, Rovenberg SA, Ed. Cancer Principles and Practice of Oncology. 5th Ed. Philadelphia : Lippincott-Raven, 1997:47-70
25. Karnen GB. Imunologi. 6th ed. Jakarta : Balai Penerbit FKUI, 2006.
26. Roitt IM. Essentials of Immunology. 8th ed. Barcelona: Time Mirror International,1994.

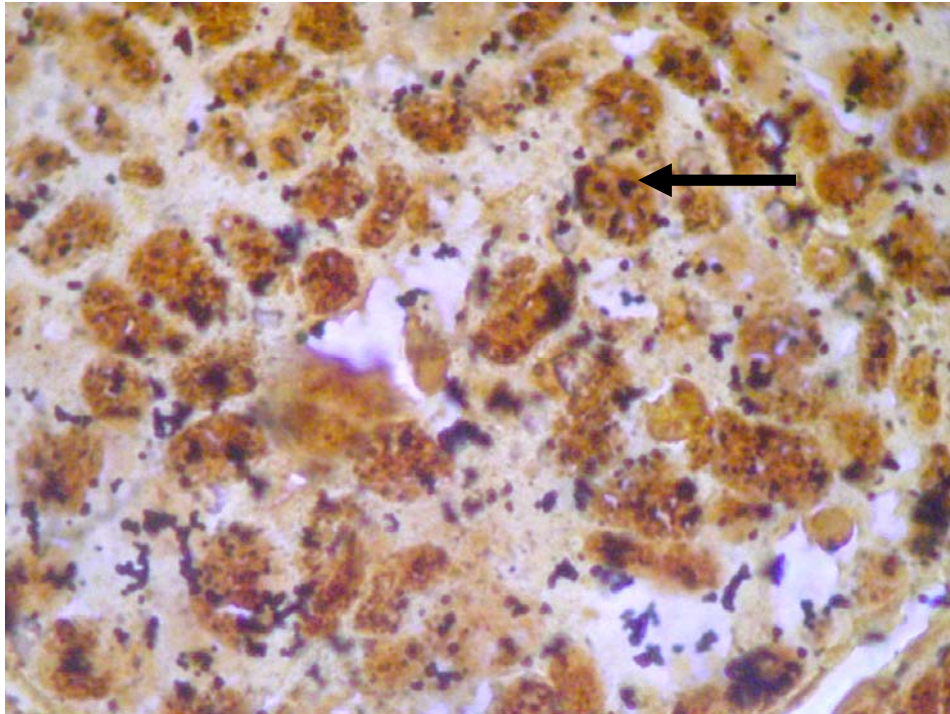
27. Kresno SB. Aspek imunologi pada kanker. Disampaikan pada Simposium Antimicrobial Update, Jakarta, 2003 : 59 – 77.
28. Whiteside TL, Haberman RB. Characteristic of Natural Killer Cell and Lymphokine-activated Killer Cell. In: Oettgen HF Ed. Human Cancer Immunology. Philidelphia:WB Sanders Company 1990:718-44.
29. Halim B, Sahil MF. Imunologi Kanker. Cermin Dunia Kedokteran 2001 edisi 132; 47-50.
30. Bast RC, Bookman MA,Knapp RC. Gynecology Tumor Immunology. Dalam: Knapp RC,Bast C, Bookman MA,ed. Gynecology Oncology. Singapore: Mc Graw Hill,Inc,1993;56-82.
31. Melief CJM, Stoter G. Imunoterapi pada Kanker. Dalam: Oncology. Panitia Kanker RSUP Dr. Sardjito. 5thed. Yogyakarta,1999: 233-234
32. Vorobiev AA, Telnuikh V, Kisielevskyn MV, Karbuisheva NV, Khabarov AS, Sultanov LV et al. Transfer Factor Use In Immunorehabilitation After Infectious-Inflammatory and Somatic Diseases. Moscow: Center of MicroNutrientology, 2004.
33. Fabre RA, Perez TM, Aguilar LD, Rangel MD, Garcia IE, Hernandez E et al. Transfer factors as immunotherapy and supplement of chemotherapy in experimental pulmonary tuberculosis. Clin Exp Immunol. 2004 May; 136(2): 215–223.
34. Wikipedia Free Encyclopedia. Insulin like Growth Factor -1. 2008 [cited 2008 July27]. Available from: URL: <http://www.wikipedia.org/wiki/IGF-1.html>

35. Beeker WB. The Cell Cycle, DNA, Replication and Mitosis. In: Beeker WB. The World of The Cell. California: The Benjamin/Cumming publ,1986:441-75
36. Raven, Johnson GB. The Cell Cycle. In: Biology. St.Louis:Time Mirror/Mosby College publ, 1986:138-46
37. Kleinsmith LS, Kish VM. The Cell Cycle. Dalam: Principle of Cell Biology. New York: Harper and Row,1988:490-533
38. Ellis EO, Schnitt SJ, Sastre-Garau X. Invasive Breast Carcinoma. Dalam: Pathology and Genetics of Tumors of The Breast Cancer and Female Genital Organ. Lyon: IARC Press 2003:13-59
39. Miranti, IP. Korelasi Hitung AgNOR dan Status HER-2 pada Karsinoma Duktus Invasif Payudara (NOS). Bagian Patologi Anatomi FK UNDIP/RSUP Kariadi Semarang. 2007
40. Huamenoglu S, Kaya H, Kotilogin E, Erdem G, Denirey E, Ekicioghi Hormonal Profil and AgNOR Value in Pituitary Adenomas. Turk Journal Medicine Sci 2001;31:523-8.
41. Bankfalvi A, Giuffre G, Ofner D, Diallo R, Poremba C, Buchwlow IB. Relation ship Between HER-2 Status and Proliferation Rate in Braest Cancer Assessed by Imunohistochemisty, Fluorecence In situ Hibriditation and Standardised AgNOR Analysis. International Journal of Oncology 2003; 23: 1285-92.
42. Chandra Budiman. Pengantar Statistik Kesehatan. Jakarta: EGC, 1995:1-96.

43. Dahlan MS. Statistika untuk Kedokteran dan Kesehatan. Jakarta: Bina Mitra, 2004
44. Trihendradi. SPSS 12 Statistik Inferen Teori Dasar dan Aplikasinya. Yogyakarta: Andi Offset, 2005.

Lampiran 1

Hasil Mikroskopis Pewarnaan AgNOR



Alat pengukuran volume tumor (pletismometer)



Lampiran 2

TABULASI INPUT

Hasil penelitian berdasarkan volume tumor (cc)

Kontrol	20,40	20,30	18,00	16,00	17,30
Cyclo	18,00	17,00	12,00	21,50	15,26
TF	15,35	15,34	19,40	19,50	15,24
Kombinasi	18,00	12,00	14,00	18,50	17,00

Hasil penelitian berdasarkan proliferasi sel (AgNOR)

Kontrol	6,65	7,61	6,57	7,08	2,88
Cyclo	5,33	4,35	4,42	4,02	5,97
TF	5,08	3,74	3,58	3,92	5,52
Kombinasi	5,04	3,48	4,42	3,73	2,76

Lampiran 3

Analisa Output Volume tumor

	Kontrol	Cyclo	TF	Kombinasi
N	5	5	5	5
Mean	18.9000	17.3560	16.1660	15.9000
Median	18.0000	17.0000	15.3500	17.0000
Mode	17.30	15.88 ^a	15.24 ^a	12.00 ^a
Std. Deviasi	1.93261	1.14694	1.17345	2.79285
Varian	3.735	1.315	1.377	7.800
Minimum	17.30	15.88	15.24	12.00
Maximum	21.50	18.54	17.50	18.50
	94.50	86.78	80.83	79.50

Analisa Out Put Proliferasi Sel

	Kontrol	Cyclo	TF	Kombinasi
N	5	5	5	5
Mean	7.1580	4.8180	4.9680	3.8860
Median	7.0800	4.4200	4.9200	3.7300
Mode	6.57 ^a	4.02 ^a	4.58 ^a	2.76 ^a
Std. Deviasi	.57781	.80677	.36128	.87663
Varian	.334	.651	.131	.768
Minimum	6.57	4.02	4.58	2.76
Maximum	7.88	5.97	5.52	5.04
Sum	35.79	24.09	24.84	19.43

Lampiran 4

Hasil Analisis Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Data
N		20
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	17.0805
	Std. Deviation	2.11501
Most Extreme Differences	Absolute	.158
	Positive	.145
	Negative	-.158
Kolmogorov-Smirnov Z		.709
Asymp. Sig. (2-tailed)		.697

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Lampiran 5

Signifikansi Perbedaan Volume Tumor

Multivariate Tests^b

Effect	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept Pillai's Trace	.997	84.494 ^a	4.000	1.000	.081
Wilks' Lambda	.003	84.494 ^a	4.000	1.000	.081
Hotelling's Trace	337.976	84.494 ^a	4.000	1.000	.081
Roy's Largest Root	337.976	84.494 ^a	4.000	1.000	.081

a. Exact statistic

b. Design:

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	Kontrol	.000 ^a	0	.	.	.
	Cyclo	.000 ^a	0	.	.	.
	TF	.000 ^a	0	.	.	.
	Kombinasi	.000 ^a	0	.	.	.
Intercept	Kontrol	1786.050	1	1786.050	478.193	.000
	Cyclo	1506.154	1	1506.154	1144.946	.000
	TF	1306.698	1	1306.698	948.959	.000
	Kombinasi	1264.050	1	1264.050	162.058	.000
Error	Kontrol	14.940	4	3.735		
	Cyclo	5.262	4	1.315		
	TF	5.508	4	1.377		
	Kombinasi	31.200	4	7.800		
Total	Kontrol	1800.990	5			
	Cyclo	1511.416	5			
	TF	1312.206	5			
	Kombinasi	1295.250	5			
Corrected Total	Kontrol	14.940	4			
	Cyclo	5.262	4			
	TF	5.508	4			
	Kombinasi	31.200	4			

a. R Squared = .000 (Adjusted R Squared = .000)

ANOVA

Data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	28.082	3	9.361	2.632	.086
Within Groups	56.910	16	3.557		
Total	84.992	19			

Lampiran 6

Signifikansi Perbedaan Proliferasi sel (AgNOR)

Multivariate Tests^b

Effect	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept Pillai's Trace	1.000	116252.7 ^a	4.000	1.000	.002
Wilks' Lambda	.000	116252.7 ^a	4.000	1.000	.002
Hotelling's Trace	465010.7	116252.7 ^a	4.000	1.000	.002
Roy's Largest Root	465010.7	116252.7 ^a	4.000	1.000	.002

a. Exact statistic

b. Design:

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	Kontrol	.000 ^a	0	.	.	.
	Cyclo	.000 ^a	0	.	.	.
	TF	.000 ^a	0	.	.	.
	Kombinasi	.000 ^a	0	.	.	.
Intercept	Kontrol	256.185	1	256.185	767.319	.000
	Cyclo	116.066	1	116.066	178.324	.000
	TF	123.405	1	123.405	945.488	.000
	Kombinasi	75.505	1	75.505	98.252	.001
Error	Kontrol	1.335	4	.334		
	Cyclo	2.603	4	.651		
	TF	.522	4	.131		
	Kombinasi	3.074	4	.768		
Total	Kontrol	257.520	5			
	Cyclo	118.669	5			
	TF	123.927	5			
	Kombinasi	78.579	5			
Corrected Total	Kontrol	1.335	4			
	Cyclo	2.603	4			
	TF	.522	4			
	Kombinasi	3.074	4			

a. R Squared = .000 (Adjusted R Squared = .000)

ANOVA

Data

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	28.799	3	9.600	20.385	.000
Within Groups	7.535	16	.471		
Total	36.334	19			

Lampiran 7

Hasil uji Pos Hoc Proliferasi Sel

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Data

LSD

(I) Variabel	(J) Variabel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Cyclo	2.34000*	.43402	.000	1.4199	3.2601
	TF	2.19000*	.43402	.000	1.2699	3.1101
	Kombinasi	3.27200*	.43402	.000	2.3519	4.1921
Cyclo	Kontrol	-2.34000*	.43402	.000	-3.2601	-1.4199
	TF	-.15000	.43402	.734	-1.0701	.7701
	Kombinasi	.93200*	.43402	.047	.0119	1.8521
TF	Kontrol	-2.19000*	.43402	.000	-3.1101	-1.2699
	Cyclo	.15000	.43402	.734	-.7701	1.0701
	Kombinasi	1.08200*	.43402	.024	.1619	2.0021
Kombinasi	Kontrol	-3.27200*	.43402	.000	-4.1921	-2.3519
	Cyclo	-.93200*	.43402	.047	-1.8521	-.0119
	TF	-1.08200*	.43402	.024	-2.0021	-.1619

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 8

Korelasi Antara Volume Tumor dan Proliferasi Sel

Correlations

		Volume Tumor	Proliferasi Sel Agnor
Volume Tumor	Pearson Correlation	1	.496*
	Sig. (2-tailed)		.026
	N	20	20
Proliferasi Sel Agnor	Pearson Correlation	.496*	1
	Sig. (2-tailed)	.026	
	N	20	20

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Lampiran 9

Regresi Antara Volume Tumor dan Proliferasi Sel

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	13.134	1.684		7.798	.000
	Proliferasi Sel Agnor	.758	.313	.496	2.421	.026

a. Dependent Variable: Volume Tumor

Model Summary^b

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate	Change Statistics				
					R Square Change	F Change	df1	df2	Sig. F Change
1	.496 ^a	.246	.204	1.88740	.246	5.859	1	18	.026

a. Predictors: (Constant), Proliferasi Sel Agnor

b. Dependent Variable: Volume Tumor

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	20.871	1	20.871	5.859	.026 ^a
	Residual	64.121	18	3.562		
	Total	84.992	19			

a. Predictors: (Constant), Proliferasi Sel Agnor

b. Dependent Variable: Volume Tumor