

**PENGARUH KOMBINASI TRANSFER FACTOR -  
CYCLOPHOSPHAMIDE TERHADAP INDEKS  
APOPTOSIS DAN JUMLAH MAKROFAG PADA  
ADENOCARCINOMA MAMMAE MENCIT C3 H**  
(Studi eksperimental laboratorik)

*The Effect of Transfer Factor-Cyclophosphamide Combination on  
Apoptotic index and Macrophage Count in Breast Adenocarcinoma  
C3H Mice*  
(*Experimental study of laboratoric*)



**TESIS**  
untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat  
Sarjana S2 dan Program Pendidikan Dokter Spesialis I Bedah

**Muryanto**

**PROGRAM PASCA SARJANA  
MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
DAN  
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I  
ILMU BEDAH  
UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG  
2007**

## TESIS

# PENGARUH KOMBINASI TRANSFER FACTOR - CYCLOPHOSPHAMIDE TERHADAP INDEKS APOPTOSIS DAN JUMLAH MAKROFAG PADA ADENOCARSINOMA MAMMAE MENCIT C3 H (Studi eksperimental laboratorik)

Disusun oleh :

**Muryanto**

Akan dipertahankan didepan Tim Penguji  
pada tanggal 28 November 2007  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,  
Komisi Pembimbing

Pembimbing I

Pembimbing II

dr. Djoko Handojo, SpB, SpB.Onk  
NIP. 130 675 341

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

Mengetahui :

Ketua Program Studi  
PPDS I Bedah  
Universitas Diponegoro Semarang

Ketua Program Studi  
Magister Ilmu Biomedik  
Universitas Diponegoro Semarang

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

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

## **PERNYATAAN**

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

Semarang, November 2007

Penulis

## **RIWAYAT HIDUP SINGKAT**

### **A. IDENTITAS**

Nama : dr. Muryanto  
NIM PPDS I Bedah : G3A002008 / G4A002013  
Tempat / Tgl lahir : Kendal, 27 September 1970  
Agama : Islam  
Jenis kelamin : Laki-laki  
Istri : dr. Utariyah Budiastuti  
Anak : 1. Javas Gala Budiassa  
2. Lalita Veda Budirahma

### **B. Riwayat Pendidikan**

1. SD : Lulus tahun 1982  
2. SMP : Lulus tahun 1985  
3. SMA : Lulus tahun 1988  
4. FK UNDIP Semarang Jawa Tengah : Lulus tahun 1996  
5. PPDS I Bedah FK UNDIP Semarang Jawa Tengah  
6. Magister Biomedik

## KATA PENGANTAR

Puji syukur dipanjatkan kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat dan anugerahNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul Pengaruh Kombinasi *Transfer Factor-Cyclophosphamide* terhadap Indeks Apoptosis dan Jumlah Makrofag Pada *Adenocarcinoma Mammae* Mencit C3H.

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

Penulis menyadari tugas ini tidak dapat terselesaikan dengan baik tanpa dukungan dari berbagai pihak. Kepada dr. Djoko Handojo, SpB,SpBONK dan Prof.dr. Edi Dharmana, MSc, PhD, Sp ParK sebagai dosen pembimbing, penulis mengucapkan terima kasih atas bimbingan, sumbangan pikiran, serta kesabarannya dalam proses penyelesaian tesis ini.

Dalam kesempatan ini penulis juga menghaturkan terima kasih kepada :

1. dr. Soejoto, SpKK(K), Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
2. Direktur Utama RSUP Dr Kariadi Semarang beserta staf yang telah memberi kesempatan untuk melakukan penelitian.
3. Prof.dr.H. Soebowo, Sp PA(K) selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca sarjana Universitas Diponegoro.
4. dr. Djoko Handojo, SpB, SpBOnk, Ketua Bagian Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RSUP dr. Kariadi Semarang.

5. dr. Sidharta Darsojono, SpB, SpU, Ketua Program Studi PPDS I Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
6. dr. Pudjadi, SU, Ketua Bagian Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas diponegoro semarang.
7. dr. Harijadi , SpPA(K), Kepala Instalasi Patologi Anatomi RSUD Sardjito FK UGM Yogyakarta.
8. Seluruh staf pengajar Bagian Bedah dan Ilmu Biomedik FK UNDIP dan nara sumber yang telah dengan sabar berkenan memberi masukan, arahan dalam penelitian dan penulisan tesis ini.
9. Semua rekan sejawat Residen Ilmu Bedah FK UNDIP Semarang.
10. Ucapan terima kasih khusus kepada orang tua dan mertua saya yang telah memberikan dukungan moril dan materiil untuk keberhasilan studi saya.
11. Tesis ini kupersembahkan untuk istriku tercinta Uut dan anak-anakku tercinta Javas dan Lita.

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

Semarang, November 2007

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
LEMBAR PENGESAHAN .....	ii
PERNYATAAN .....	iii
RIWAYAT HIDUP SINGKAT .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
ABSTRAK .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar belakang .....	1
1.2. Rumusan masalah .....	4
1.3. Tujuan penelitian .....	5
1.4. Manfaat penelitian .....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....	6
2.1. Kanker payudara .....	6
2.1.1. Etiologi dan patogenesis.....	7
2.1.2. Klasifikasi.....	9
2.2. Immunosurveillance kanker.....	14

2.3. Respon imunologi terhadap sel kanker.....	14
2.3.1. Peranan sistem imun selular terhadap sel kanker.....	15
a. Sitotoksitas melalui sel T.....	15
b. Sel Natural Killer ( NK ) .....	16
c. Sitotoksitas melalui makrofag... ..	17
2.3.2. Peranan sistem imun humoral terhadap sel kanker.....	18
2.4. Immunological escape.....	19
2.5. Apoptosis.....	22
2.6. Transfer factor.....	23
2.7. Cyclophosphamide.....	26
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS .....</b>	<b>28</b>
3.1. Kerangka teori .....	28
3.2. Kerangka konsep .....	28
3.3. Hipotesis penelitian .....	29
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN .....</b>	<b>30</b>
4.1. Rancangan penelitian .....	30
4.2. Populasi dan sampel.....	31
4.3. Waktu dan lokasi penelitian .....	33
4.4. Variabel penelitian .....	33
4.5. Bahan dan alat.....	34
4.6. Tempat penelitian .....	35
4.7. Prosedur pengumpulan data.....	35
4.8. Alur kerja .....	36

4.9. Prosedur-prosedur laboratorium.....	37
4.10. Cara pengumpulan data.....	39
4.11. Analisa data.....	39
BAB 5. HASIL .....	41
BAB 6. PEMBAHASAN .....	47
BAB 7. SIMPULAN DAN SARAN.....	49
DAFTAR PUSTAKA .....	50

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar-1. Peran makrofag, sel NK, CTL terhadap sel target.....	18
Gambar-2. Respon imun terhadap sel kanker.....	21
Gambar-3. Apoptosis.....	23
Gambar-4. Peran <i>transfer factor</i> tingkat seluler.....	24
Gambar-5. Cara kerja cyclophosphamide dalam memutus rantai DNA.....	26
Gambar-6. Grafik Boxplot nilai rata-rata hasil perhitungan indeks apoptosis pada tiap kelompok percobaan .....	44
Gambar-7. Grafik Boxplot nilai rata-rata hasil perhitungan jumlah makrofag Pada tiap kelompok percobaan .....	45

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Jumlah sel apoptosis pada adenokarsinoma Mamma.....	42
Tabel 2. Jumlah sel apoptosis pada adenokarsinoma .....	42
Tabel 3. Jumlah sel makrofag pada Adenokarsinoma Mamma.....	43
Tabel 4. Jumlah Makrofag pada sel adenokarsinoma mammae.....	43

## DAFTAR LAMPIRAN

1. Lampiran Hasil pemeriksaan mikroskopis massa tumor .
2. Lampiran Ethical Clearance.

## ABSTRAK

### PENGARUH KOMBINASI TRANSFER FACTOR - CYCLOPHOSPHAMIDE TERHADAP INDEKS APOPTOSIS DAN JUMLAH MAKROFAG PADA ADENOCARSINOMA MAMMAE MENCIT C3 H (Studi eksperimental laboratorik)

**Latar belakang :** *Transfer Factor* merupakan ekstrak dari colostrum sapi dan banyak dipakai untuk imunostimulan dan pengobatan alternatif kanker karena dapat memacu aktifitas sel NK. *Cyclophosphamide* merupakan suatu obat anti neoplastik yang banyak digunakan sebagai pengobatan kemoterapi kanker payudara. Aktifitas keduanya dapat dilihat dari indeks apoptosis adenokarsinoma mamma. Pengaruh dari apoptosis tumor akan memacu proses fagositosis dari makrofag.

**Tujuan :** Membuktikan terdapatnya peningkatan indeks apoptosis dan jumlah makrofag adenokarsinoma mamma antara kelompok yang diberikan kombinasi *transfer factor* dan *cyclophosphamide* dengan kelompok yang hanya diberikan *transfer factor* atau *cyclophosphamide* serta menganalisis hubungan antara indeks apoptosis dan jumlah makrofag.

**Metoda :** Dilakukan penelitian eksperimental hewan coba, desain *randomized post test only control group design*, sampel 20 ekor mencit C3H yang diinokulasi sel tumor, dibagi 4 kelompok: tanpa perlakuan, P1 diberikan kombinasi *transfer factor* dan *cyclophosphamide*, P2 diberikan *transfer factor*, P3 diberikan *cyclophosphamide*. Perlakuan selama 3 minggu, kemudian dilakukan pemeriksaan indeks apoptosis dan jumlah makrofag. Analisis statistik menggunakan *Shapiro-Wilk*, *Kruskal Wallis* diteruskan uji *Mann-Whitney* test dan uji korelasi menggunakan *Spearman's rho*.

**Hasil :** Terdapat peningkatan indeks apoptosis dan jumlah makrofag yang bermakna antara P1 dengan kontrol, P1-P2 dan P1-P3 ( $p = 0,009$ ). Ada hubungan antara kelompok kontrol dan P3 dan tidak ada hubungan antara kelompok P1 dan P2. Signifikansi bila  $p < 0,05$ .

**Simpulan :** Terdapat peningkatan indeks apoptosis dan jumlah makrofag adenokarsinoma mamma pada pemberian kombinasi *transfer factor* dan *cyclophosphamide*.

**Kata kunci :** *Transfer Factor*, *Cyclophosphamide*, Indeks Apoptosis, Jumlah makrofag, Adenokarsinoma mamma.

## ABSTRACT

### *The Effect of Transfer Factor-Cyclophosphamide Combination on Apoptotic Index and Macrophage Count in Breast Adenocarcinoma C3H Mice (Experimental study of laboratoric)*

**Background :** Transfer factor (TF) is an extract from bovin colostrum and which is generally used on immunostimulation and as alternative treatment of malignancy. It has been proven ability to promote Natural Killer cell (NK-Cell) activity. Cyclophosphamide is an antineoplastic agent which is generally used for chemotherapy treatment in breast malignancy. Activity TF-cyclophosphamide can be measured by cancer cells apoptotic index, the effect of adenocarcinoma mammae apoptotic will promote the phagocytosis process of macrophages.

**Objective :** This study was aimed to see the increase of apoptotic index and macrophages count of adenocarcinoma between treated group TF — cyclophosphamide combination compared only transfer factor or cyclophosphamide and analyse correlation between the increase of apoptotic index and macrophage count.

**Materials and Methods :** Animal experiment with randomized post test only control group design, twenty C3H mice inoculated with tumour, were divided into 4 treatment groups : group 1 is control , P1 = treated transfer factor and cyclophosphamide combination, P2 = only transfer factor, P3 = only cyclophosphamide. All of groups treated for 3 weeks, then apoptotic index and count of macrophage were evaluated. A Saphiro-Wilk test continued by Mann-Whitney U- test and Spearman's rho correlation test are used to analyse the data.

**Results :** There is the increase of apoptotic index and count of macrophages significantly between P1 compared control group, P2 and P3 ( $p = 0,009$ ). There is a correlation between control and P3, and there was no correlation between P1 and P2. Significancy  $p < 0,05$

**Conclusion :** There is the increase apoptotic index and macrophage count adenocarcinoma mammae after treated transfer factor and cyclophosphamide combination.

**Keyword :** Transfer Factor, Cyclophosphamide, Apoptotic Index, Macrophage count, Adenocarcinoma mammae.

## **BAB 1**

### **PENDAHULUAN**

#### ***1.1. Latar Belakang***

Di seluruh dunia kanker payudara menempati urutan kelima penyebab kematian oleh karena kanker (kanker paru, kanker lambung, kanker hati, kanker usus besar). Pada tahun 2005, 502.000 penderita meninggal oleh karena kanker payudara (7 % penyebab kematian oleh karena kanker, 1% dari semua penyebab kematian) dan ini merupakan penyebab kematian terbanyak yang terjadi pada wanita diseluruh dunia.<sup>1</sup>

**Di Amerika Serikat kanker payudara menempati prevalensi tertinggi penyebab kanker pada wanita. Tahun 2007 diperkirakan 40.910 penderita meninggal oleh karena kanker payudara. 1 dari 8 wanita di Amerika menderita kanker payudara dan 1 dari 33 wanita meninggal oleh karena kanker payudara.<sup>2</sup>**

**Kanker payudara adalah jenis keganasan yang paling sering dijumpai pada wanita. Di Indonesia ternyata 96 % kelainan dipayudara yang berbentuk tumor justru dikenali oleh penderita itu sendiri sehingga memudahkan dokter untuk mendeteksi kanker payudara. Berbeda dengan di negara barat dimana setiap wanita usia subur diharuskan oleh asuransi kesehatan untuk memeriksakan payudaranya secara berkala sehingga angka stadium dini kanker payudara ditemukan jauh lebih tinggi daripada**

**dinegara berkembang dimana tidak ada keharusan untuk wanita usia subur memeriksakan payudaranya.<sup>3,4</sup>**

Selama beberapa dekade terakhir perkembangan imunologi berjalan sangat pesat sesuai dengan kemajuan teknologi. Segala sesuatu yang tidak dapat diterangkan dalam dunia kedokteran sekarang dicoba untuk dihubungkan dengan gangguan sistem imun manusia. Dugaan ini menyebabkan dilakukannya berbagai penelitian di bidang imunologi yang menghasilkan banyak temuan yang menyokong adanya keterlibatan sistem imun, etiologi dan patogenesis berbagai kelainan yang terjadi. Peranan sel-sel fagosit dan sitolitik dalam imunologi tumor banyak menarik perhatian para peneliti. Sel imun yang berada disekitar sel kanker dan berperan dalam perondaan terhadap kanker adalah limfosit T sitotoksik (CTL), Sel *Natural Killer* ( NK ) dan makrofag . Setelah mengenal sel kanker sebagai sel asing, ketiga sel imun tersebut akan menghancurkan sel kanker. Aktivitas sel-sel tersebut melibatkan sitokin-sitokin yang akan memacu aktivitasnya terhadap sel-sel tumor untuk memacu proses apoptosis dan fagositosis oleh makrofag. Salah satu sitokin yang penting adalah Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). IFN- $\gamma$  adalah aktivator yang kuat untuk sel-sel fagosit mononuklear, dapat meningkatkan ekspresi baik kompleks histokompatibilitas mayor (MHC-I maupun MHC-II ) meningkatkan sel T untuk berdiferensiasi dan memacu aktivitas sitolitik dari sel-sel NK yang sangat berperan pada imunologi tumor.<sup>5,6</sup>

Dalam situasi Negara yang saat ini sedang melakukan perbaikan birokrasi disemua bidang dan datangnya era pasar bebas yang tak dapat dihindarkan diperlukan persepsi yang sama terutama mengenai nilai baru pada

pelayanan medik yaitu memberi pelayanan dengan kualitas setinggi-tingginya dengan biaya seringan-ringannya pada penanganan terapi kanker payudara. Pemahaman tentang perilaku sel kanker payudara serta faktor risiko telah banyak mengubah konsep dasar pengobatan. Dengan berkembangnya teknologi kedokteran, menyebabkan modalitas terapi menjadi lebih beragam mulai dari pembedahan, radiasi, kemoterapi, hormonal terapi, imunoterapi dan biologi terapi.<sup>7</sup> Kemoterapi pada kanker payudara tidak cukup diberikan hanya dengan satu regimen, karena mahalnya harga dari masing-masing regimen maka dibutuhkan terapi alternatif obat-obat yang murah akan tetapi bisa bekerja selain sebagai stimulasi sistem imun dan membunuh sel kanker dengan efek samping yang minimal. *Cyclophosphamide* merupakan obat kemoterapi yang banyak dipakai dalam pengobatan kanker payudara, karena disamping harganya murah kemampuannya dalam membunuh sel kanker pada semua siklus sel dengan cara memotong rantai DNA.<sup>7</sup>

*Transfer factor* adalah sebuah molekul kecil dengan berat 3500-6000 kda yang terdiri dari oligoribonukleotida yang berpasangan dengan sebuah molekul peptida. *Transfer factor* diproduksi oleh limfosit T yang dapat mentransfer ke sel. Kemampuannya dalam meningkatkan sel NK yang merupakan sel efektor terhadap sitotoksitas spontan berbagai jenis sasaran termasuk sel kanker. Sel NK mengeluarkan *perforin* dan *granzym* dengan perantara FAS Ligan sehingga sel kanker diprogram apoptosis.<sup>8</sup>

Darryl See dkk telah melakukan penelitian penggunaan *transfer factor* terhadap 20 pasien kanker payudara stadium 3-4 dan telah divonis mati oleh ahli onkologi dengan harapan hidup 3,7 bln. Pada penelitian tersebut masing-

masing pasien diberi 9 kapsul transfer factor plus per hari ditambah dengan general nutrien lain (antioksidan, enzim digestif, prebiotik dan multivitamin). Setelah 8 bln, 16 pasien masih hidup, diantaranya mengalami remisi dan stabil. Nilai standard fungsi sel NK adalah 6,4 pada penelitian tersebut dalam waktu 4 mg fungsi sel NK meningkat menjadi 25,7 dan dalam waktu 6 bln naik menjadi 27,6 ini merupakan suatu kenaikan luar biasa yaitu sekitar 400%.<sup>8</sup>

Andrei I melakukan penelitian pada tikus yang mengidap kanker metastase ke paru dengan kombinasi terapi antara kemoterapi *cyclophosphamide* dengan imunoterapi interleukin (IL-15). Kombinasi terapi *cyclophosphamide* dan IL-15 dapat memperpanjang lama hidup hingga 32% dan mampu meningkatkan level dari NK1.1+/LGL-1 dan CD8+/CD4+ T sel.<sup>9</sup>

Berdasarkan latar belakang tersebut maka dalam penelitian ini ingin melihat pengaruh pemberian terapi kombinasi *transfer factor* dan *cyclophosphamide* terhadap indeks apoptosis dan jumlah makrofag pada adenokarsinoma mamma mencit C3H. Walaupun manfaat pemberian kemoterapi *transfer factor* dan *cyclophosphamide* belum pernah dilaporkan sebelumnya maka perlu dilakukan penelitian awal dengan menggunakan binatang percobaan.

## **1.2. Rumusan Masalah**

Apakah kombinasi *transfer factor* — *cyclophosphamide* dapat meningkatkan indeks apoptosis dan jumlah makrofag lebih tinggi dibandingkan dengan hanya diberikan *transfer factor* atau *cyclophosphamide* pada adenokarsinoma mamma mencit C3H.

### ***1.3. Tujuan Penelitian***

#### **1.3.1. Tujuan umum**

Membuktikan *transfer factor – cyclophosphamide* dapat meningkatkan indeks apoptosis dan jumlah makrofag pada adenokarsinoma mamma mencit C3H.

#### **1.3.2. Tujuan khusus**

1. Menganalisis indeks apoptosis pada mencit yang diberikan kombinasi *transfer factor* dan *cyclophosphamide* dibanding hanya diberikan *transfer factor*.
2. Menganalisis indeks apoptosis pada mencit yang diberikan kombinasi *transfer factor* dan *cyclophosphamide* dibanding hanya diberikan *cyclophosphamide*.
3. Menganalisis peningkatan jumlah makrofag pada mencit yang diberikan kombinasi *transfer factor* dan *cyclophosphamide* dibanding hanya diberikan *transfer factor*.
4. Menganalisis peningkatan jumlah makrofag pada mencit yang diberikan kombinasi *transfer factor* dan *cyclophosphamide* dibanding hanya diberikan *cyclophosphamide*.
5. Menganalisis hubungan antara indeks apoptosis dengan peningkatan jumlah makrofag antara mencit yang diberikan kombinasi dengan hanya diberikan *transfer factor* atau *cyclophosphamide*.

#### **1.4. Manfaat Penelitian**

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan informasi mengenai pentingnya penggunaan imunostimulator dalam terapi kanker payudara.
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi landasan untuk penelitian lebih lanjut mengenai pengelolaan kanker payudara pada manusia.
3. Dapat menambah wacana dibidang bedah onkologi.

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

## **2.1. Kanker Payudara**

Kanker payudara merupakan salah satu penyakit kanker yang tertua pada manusia. Penyakit kanker payudara telah dikenali sejak jaman mesir kuno ± 1600 SM , walaupun pada saat itu belum ada definisi mengenai kanker. Edwin Smith Papyrus melaporkan ada 8 kasus tumor yang disertai ulkus pada daerah payudara yang diterapi dengan cara dibakar dengan api. Selang beberapa abad lamanya penderita dengan tumor payudara tidak mendapatkan terapi , baru kemudian muncul pada abad 17 seorang ahli bedah Perancis Jean Louis Petit ( 1674 – 1750 ) menemukan kasus kanker payudara yang disertai pembesaran limfonodi didaerah aksila. Kemudian ahli bedah dari scotlandia Benjamin Bell ( 1749 – 1806 ) melakukan operasi pengangkatan kelenjar payudara beserta otot – otot dada dan limfonodi aksila, baru kemudian dipopulerkan oleh William Stewart Halsted ( 1882 ) melakukan Halsted Radikal Mastectomy dan prosedur ini tetap populer sampai tahun 1970.<sup>10</sup>

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

payudara tumbuh berasal dari daerah ini dan berakhir pada puncak lobular yang mana proliferasi seiring dengan maturitas seksual. Kelenjar payudara dewasa terletak diantara lapisan luar dan dalam fascia pektoralis superfisialis dinding dada depan, berada pada celah iga depan ke dua sampai ke tujuh. Dimensi kepala-ekor antar 10-12 cm, dan ketebalan kelenjar maksimum 3-5 cm. Payudara non laktasi mempunyai berat 150-200 gram dan kelenjar yang mengalami laktasi mempunyai berat 400-500 gram. Kelenjar payudara merupakan kelenjar tubuloalveolar terdiri atas 15-25 lobus yang berfungsi mengeluarkan air susu. Setiap lobus terpisah oleh jaringan ikat padat dan banyak jaringan lemak yang sesungguhnya merupakan kelenjar itu sendiri dengan saluran laktiferus ekskretorius. Saluran ini mempunyai panjang 2-4,5 cm yang bermuara pada papila payudara, terdapat 15-25 muara dan setiap muara berdiameter 0,5 mm. Susunan histologik kelenjar payudara beragam sesuai jenis kelamin, umur dan keadaan fisiologiknya.<sup>11</sup>

### **2.1.1. Etiologi dan patogenesis**

Ada 3 pengaruh penting pada kanker payudara :

#### **1. Faktor genetik**

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

diketahui terletak dilokus kecil di kromosom 17q21 pada kanker payudara yang timbul saat usia muda.<sup>11,12</sup>

## 2. Hormon

Kelebihan hormon estrogen endogen atau lebih tepatnya terjadi ketidak seimbangan

hormon terlihat sangat jelas pada kanker payudara. Banyak faktor resiko yang dapat disebutkan seperti masa reproduksi yang lama, nulipara, dan usia tua saat mempunyai anak pertama akan meningkatkan estrogen pada siklus menstruasi. Wanita pasca menopause dengan tumor ovarium fungsional dapat terkena kanker payudara karena adanya hormon estrogen berlebihan. Suatu penelitian menyebutkan bahwa kelebihan jumlah estrogen di air seni, frekuensi ovulasi, dan umur saat menstruasi dihubungkan dengan meningkatnya resiko terkena kanker payudara. Epitel payudara normal memiliki reseptor estrogen dan progesteron. Kedua reseptor ditemukan pada sebagian besar kanker payudara. Berbagai bentuk growth promoters (transforming growth factor-alpha / epithelial growth factor, platelet-derived growth factor), fibroblast growth factor dan growth inhibitor disekresi oleh sel kanker payudara manusia. Banyak penelitian menyatakan bahwa growth promoters terlibat dalam mekanisme autokrin dari tumor. Produksi GF tergantung pada hormon estrogen, sehingga Interaksi antara hormon di sirkulasi , reseptor hormon pada sel kanker dan GF autokrin merangsang sel tumor menjadi lebih progresif.<sup>11,13</sup>

### 3. Faktor lingkungan dan gaya hidup

Pengaruh lingkungan diduga karena berbagai faktor antara lain : alkohol, diet tinggi lemak, kecanduan minum kopi, dan infeksi virus. Hal tersebut mungkin mempengaruhi onkogen dan gen supresi tumor dari kanker payudara.<sup>11,12</sup>

#### 2.1.2. Klasifikasi

Berdasarkan gambaran histologis, WHO membuat klasifikasi kanker payudara sebagai berikut.<sup>14,15,16</sup>

##### a. Kanker Payudara Non Invasif

###### 1. Karsinoma intraduktus non invasif

Karsinoma intraduktus adalah karsinoma yang mengenai duktus disertai infiltrasi jaringan stroma sekitar. Terdapat 5 sub tipe dari karsinoma intraduktus, yaitu komedokarsinoma, solid, kribriiformis, papiler, dan mikrokapiler. Komedokarsinoma ditandai dengan sel-sel yang berproliferasi cepat dan memiliki derajat keganasan tinggi. Karsinoma jenis ini dapat meluas ke duktus ekskretorius utama, kemudian menginfiltrasi *papilla* dan *areola*, sehingga dapat menyebabkan penyakit Paget pada payudara.

###### 2. Karsinoma lobular insitu

Karsinoma ini ditandai dengan pelebaran satu atau lebih duktus terminal dan atau tubulus, tanpa disertai infiltrasi ke dalam

stroma. Sel-sel berukuran lebih besar dari normal, inti bulat kecil dan jarang disertai mitosis.

b. Kanker Payudara Invasif

1. Karsinoma duktus invasif

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

2. Karsinoma lobular invasif

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

### 3. Karsinoma musinosum

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

### 4. Karsinoma meduler

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

### 5. Karsinoma papiler invasif

Komponen invasif dari jenis karsinoma ini berbentuk papiler.

### 6. Karsinoma tubuler

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

#### 7. Karsinoma adenokistik

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

#### 8. Karsinoma apokrin

Karsinoma ini didominasi dengan sel yang memiliki sitoplasma *eosinofilik*, sehingga menyerupai sel apokrin yang mengalami metaplasia. Bentuk karsinoma apokrin dapat ditemukan juga pada jenis karsinoma payudara yang lain.<sup>11</sup>

Berdasarkan gambaran gejala klinik, *Klasifikasi TNM* menurut *International Union Against Cancer (UICC)* adalah :<sup>14</sup>

#### **T = Tumor Primer**

Tx = Tumor primer tak dapat diperiksa

T0 = Tidak terdapat tumor primer

Tis = Karsinoma in situ

Tis (DCIS) Ductal carcinoma in situ

Tis (LCIS) Lobular carcinoma in situ

Tis (Paget) Paget disease

T1 = Ukuran tumor 2 cm atau kurang

T1a = Ukuran tumor lebih dari 0,1 cm dan tidak lebih dari 0,5 cm

T1b = Ukuran tumor lebih dari 0,5 cm dan tidak lebih dari 1 cm

T1c = Ukuran tumor lebih dari 1 cm dan tidak lebih dari 2 cm

T2 = Ukuran tumor lebih dari 2 cm dan tidak lebih dari 5 cm

T3 = Ukuran tumor lebih dari 5 cm

T4 = Semua ukuran tumor dengan ekstensi ke dinding dada atau kulit.

T4a = Ekstensi ke dinding dada.

T4b = Edem (termasuk peau d'orange), atau ulserasi kulit payudara, atau satelit nodul pada payudara ipsilateral.

T4c = T4a dan T4b

T4d = Inflammatory carcinoma

#### **N = Limfonodi Regional**

Nx = Limfonodi Regional tak dapat diperiksa

N0 = Tak ada metastasis di Limfonodi Regional

N1 = Metastasis di Limfonodi aksila ipsilateral mobile

N2 = Metastasis di Limfonodi aksila ipsilateral fixed

N2a = Metastasis di Limfonodi aksila ipsilateral fixed antar limfonodi atau fixed ke struktur jaringan sekitarnya

N2b = Metastasis di Limfonodi mamaria interna

N3a = Metastasis di Limfonodi infrakavikuler ipsilateral

N3b = Metastasis di Limfonodi mamaria interna dan aksila ipsilateral

N3c = Metastasis di Limfonodi supraklavikuler

**M = Metastasis jauh**

Mx = Metastasis jauh tak dapat diperiksa

M0 = Tak ada Metastasis jauh

M1 = Metastasis Jauh

**Stadium Kanker Payudara :**

Stadium 0	=	Tis	N0	M0
Stadium I	=	T1	N0	M0
Stadium IIA	=	T0	N1	M0
		T1	N1	M0
		T2	N0	M0
Stadium IIB	=	T2	N1	M0
		T3	N0	M0
Stadium IIIA	=	T0	N2	M0
		T1	N2	M0
		T2	N2	M0
		T3	N1,N2	M0
Stadium IIIB	=	T4	N0,N1,N2	M0
Stadium IIIC	=	Setiap T	N3	M0
Stadium IV	=	Setiap T	Setiap N	M1

**2.2. *Immunosurveillance* kanker**

*Immunosurveillance* adalah suatu mekanisme yang digunakan oleh tubuh untuk bereaksi melawan setiap antigen yang diekspresikan oleh neoplasma. Fungsi primer dari sistem imun adalah untuk mengenal dan mendegradasi antigen asing (nonself) yang timbul dalam tubuh. Dalam *immunosurveillance*, sel mutan dianggap akan mengekspresikan satu atau lebih antigen yang dapat dikenal sebagai *nonself*. Sel mutan dianggap sering timbul dalam tubuh manusia dan secara cepat dihancurkan oleh mekanisme imunologis. Pada tikus yang kehilangan imunitas seluler dan terpapar agen onkogenik akan lebih cepat timbul tumor. Ini dianggap merupakan bukti mekanisme *immunosurveillance*. Sel NK, limfosit T sitotoksik dan makrofag ternyata paling berperan dalam *immunosurveillance* tumor, setelah mengenal sel kanker sebagai sel asing, ketiga sel imun tersebut akan menghancurkan sel kanker. Sel CTL dan sel NK melakukan cara sitotoksitas yang sama yaitu dengan mengeluarkan perforin, sedangkan makrofag menggunakan cara fagositosis.<sup>17-20</sup>

### **2.3. Respon Imunologik Terhadap Sel Kanker**

Sel kanker dikenal oleh tubuh sebagai bahan asing, sehingga mekanisme imunologi tubuh akan bereaksi secara humoral maupun seluler. Tubuh mempunyai kemampuan *immunosurveillance* terhadap semua sel kanker maupun sel yang bermutasi untuk mencegah perkembangan sel kanker tersebut, namun terkadang terjadi *immunological escape* yaitu sel kanker luput dari pengawasan sistem imun, sehingga terjadilah kanker. Penderita kanker sendiri juga mengalami supresi imun dan modalitas terapi kanker juga mempengaruhi sistem imun itu

sendiri. Respon sistem imun terhadap sel kanker dapat dibagi dua yaitu humoral dan seluler.<sup>17-21</sup>

### **2.3.1. Peranan sistem imun seluler terhadap sel kanker**

Pada pemeriksaan patologi-anatomi tumor, sering ditemukan infiltrat sel-sel yang terdiri atas sel fagosit mononuklear, limfosit, sedikit sel plasma dan sel mastosit. Meskipun pada beberapa neoplasma, infiltrasi sel mononuclear merupakan indikator untuk prognosis yang baik, pada umumnya tidak ada hubungan antara infiltrasi sel dengan prognosis. Sistem imun yang nonspesifik dapat langsung menghancurkan sel tumor tanpa sensitisasi polimorfonuklear, sel NK. Aktivasi sel T melibatkan sel Th dan CTL. Sel Th penting pada pengerahan dan aktivasi makrofag dan sel NK.<sup>18,20,21</sup>

#### **a) Sitotoksitas melalui sel T**

Subpopulasi limfosit T, limfosit T-helper dan T-sitotoksik sama-sama berperan dalam mengeliminasi antigen tumor. Sel yang mengandung antigen tumor akan mengekspresikan antigennya bersama molekul MHC kelas I yang kemudian membentuk kompleks melalui T-cell Receptor (TCR) dari sel T-sitotoksik (CD8), mengaktifasi sel T –sitotoksik untuk menghancurkan sel tumor tersebut. Sebagian kecil sel tumor juga mengekspresikan antigen tumor bersama molekul MHC kelas II, sehingga dapat dikenali dan membentuk kompleks dengan limfosit T-helper (CD4) dan mengaktifasi sel T-helper terutama subset TH1 untuk mensekresi limfokin IFN- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$  dimana keduanya akan merangsang sel tumor untuk lebih banyak lagi mengekspresikan molekul MHC kelas I, sehingga akan lebih mengoptimalkan sitotoksitas dari sel T-sitotoksik (CD8).

Konsep ini diaplikasikan dalam pengobatan tumor menggunakan *Tumor Infiltrating Lymphocytes* (TIL), yaitu sel-sel mononuklear yang berinfiltrasi menuju ke sekitar jaringan tumor padat karena adanya reaksi inflamasi, sel tersebut diperbanyak secara kultur in vitro dengan penambahan IL-2.<sup>21--24</sup>

#### **b) Sel *Natural Killer***

Sel NK berukuran sedikit lebih besar dari pada sel limfosit kecil, berjumlah 10-15% limfosit darah perifer. Secara morfologi sel NK termasuk dalam populasi *Large Granular Lymphocyte* (LGL). Granular ini terdiri atas granula sitotoksik dari sitoplasma yang dikeluarkan saat aktivitas sitotoksik. 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 lisis yang digunakan sama dengan yang dilakukan oleh CTL yaitu dengan mengeluarkan perforin dan granzym yang menyebabkan sel kanker lisis, mengeluarkan IFN  $\gamma$  sehingga meningkatkan kerja fagositosis makrofag, melakukan *recognition* dengan sel kanker dengan perantara FAS Ligan terhadap sel kanker yang telah diopsonisasi sehingga sel kanker diprogram apoptosis.<sup>23,24</sup>

Sel NK tidak mengeluarkan TCR dan merupakan CD3 negatif. Sebagai gantinya sel NK mengeluarkan 2 tipe reseptor yang memperkuat kemampuannya membunuh sel kanker dan sel yang terinfeksi virus, yaitu reseptor pengaktivasi yang masih mengenali molekul yang dilindungi oleh penyakit pada sel target dan *Killer Inhibitor Receptor* (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. Disisi lain sel NK juga mengekspresikan CD56 yaitu suatu molekul yang mampu mempromosikan adesi intraseluler.<sup>24</sup>

Sel NK mempunyai reseptor untuk bagian tetap ( Fc $\gamma$  RIII atau CD 16) dari Ig G yang menjadikannya sitotoksisitas tergantung *Antibody dependent Sellular Cytotoxicity* (ADCC). Antigen yang diopsonisasi oleh Ig G akan dikenali oleh se 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.<sup>24</sup>

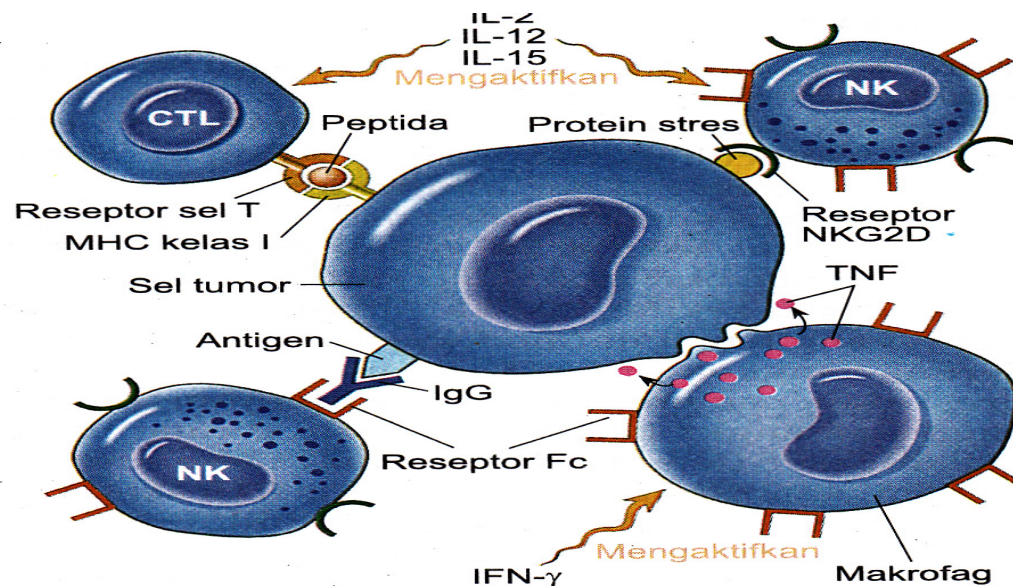
Kemampuan sel ditingkatkan oleh IFN, Tumor Nekrosis Faktor (TNF), IL-2, IL-12, sehingga peran anti tumor sel NK bergantung pada rangsangan yang terjadi secara bersamaan pada sel T dan makrofag yang memproduksi sitokin tersebut . IFN mengubah sel pre-NK menjadi sel NK. Aktivitas sel NK sering dihubungkan 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 dimasukkkan intravena akan hilang dalam 24 jam.<sup>23,24</sup>

### **c) Sitotoksisitas melalui makrofag**

Makrofag dapat berperan dalam melawan sel tumor dengan berperan sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC) menghasilkan sitokin yang mengaktifkan sel imunitas lain dan bertindak langsung sebagai efektor dengan melisis sel tumor apabila sudah diaktivasi oleh *Macrophage Activating Factor* (MAF).<sup>24,25</sup>

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 NO. Makrofag juga aktif mensekresi TNF, IL-12 yang berperan memacu proliferasi dan aktivasi sel T CD4+, sel T CD8+ serta sel NK. TNF sesuai dengan namanya mampu melisis sel tumor dengan berikatan pada reseptor permukaan sel tumor dan menyebabkan nekrosis dari sel tumor dengan cara memobilisasi berbagai respon imun tubuh.<sup>25</sup>

Diakhir peristiwa imunitas dihasilkan debris-debris sisa penghancuran sel, peran makrofag sebagai petugas kebersihan yang membersihkan debris tersebut. Oponisasi komplemen dan antibodi terhadap debris-debris tersebut membantu proses fungsi pembersihan makrofag. Akumulasi makrofag dalam tumor mungkin menggambarkan interaksi makrofag kompleks dari beberapa faktor dan juga kinetik produksi monosit oleh sumsum tulang. Jadi status fungsional makrofag dalam tumor juga berperan selain jumlahnya.<sup>24,26</sup>



Gambar 1. Peran makrofag, sel NK, CTL terhadap sel target, diambil dari Kumar v, et all.

Buku Ajar Patologi.7<sup>th</sup> ed.vol I:EGC.Jakarta,2007.<sup>27</sup>

### 2.3.2. Peranan sistem imun humoral terhadap sel kanker

Imunitas humoral lebih sedikit berperan daripada imunitas seluler dalam proses penghancuran sel kanker, tetapi tubuh tetap membentuk antibodi terhadap antigen tumor.

Dua mekanisme antibodi diketahui dapat menghancurkan target kanker yaitu :

a) *Antibody dependent cell mediated cytotoxicity* (ADCC)

Pada ADCC antibodi IgG spesifik berikatan terhadap Tumor Associated Antigen (TAA) dan sel efektor yang membawa reseptor untuk bagian Fc dari molekul Ig. Antibodi bertindak sebagai jembatan antara efektor dan target. Antibodi yang terikat dapat merangsang pelepasan superoksida atau peroksida

dari sel efektor. Sel yang dapat bertindak sebagai efektor di sini adalah limfosit null (sel K), monosit, makrofag, lekosit polimorfonuklear dan fragmen trombosit. Ini akan mengalami lisis optimal dalam 4 sampai 6 jam.<sup>17,18,24</sup>

b) *Complement Dependent Cytotoxicity*

Di sini pengikatan antibodi ke permukaan sel tumor menyebabkan rangkaian peristiwa komplemen klasik dari C'1,4,2,3,5,6,7,8,9. Komponen C' akhir menciptakan saluran atau kebocoran pada permukaan sel tumor. IgM lebih efisien dibanding IgG dalam merangsang proses *complement dependent cytotoxicity*.<sup>18</sup>

#### **2.4. Immunological escape**

Walaupun ada sistim *immunosurveillance*, kanker dapat luput dari pengawasan sistem imun tubuh bila faktor-faktor yang menunjang pertumbuhan tumor lebih berpengaruh dibanding dengan faktor-faktor yang menekan tumor, sehingga terjadi apa yang dinamakan *immunological escape* kanker.<sup>18</sup> Faktor-faktor yang mempengaruhi luputnya tumor dari pengawasan sistem imun tubuh sebagai berikut:<sup>17,19,23,24</sup>

##### **1) Tidak adanya antigen yang sesuai**

Antigen baru mungkin tidak disintesis oleh semua tumor, mungkin tidak diekspresikan pada semua permukaan sel atau tidak dipresentasikan dalam bentuk yang sesuai sehingga respon imun gagal mengenal antigen tersebut.<sup>17</sup>

##### **2) Kinetik tumor (*sneaking through*)**

Pada binatang yang diimunisasi, pemberian sel tumor dalam dosis kecil akan menyebabkan tumor tersebut dapat menyelinap (*sneak through*) yang tidak

diketahui tubuh dan baru diketahui bila tumor sudah berkembang lanjut dan di luar kemampuan sistem imun untuk menghancurkannya. Mekanisme terjadinya tidak diketahui tapi diduga berhubungan dengan vaskularisasi neoplasme tersebut.<sup>19</sup>

### **3) Modulasi antigenik**

Antibodi dapat mengubah atau memodulasi permukaan sel tanpa menghilangkan determinan permukaan.

### **4) *Masking antigen***

Molekul tertentu, seperti sialomucin, yang sering diikat permukaan sel tumor dapat menutupi antigen dan mencegah ikatan dengan limfosit.

### **5) *Shedding antigen/pelepasan antigen***

Antigen tumor yang dilepas dan larut dalam sirkulasi, dapat mengganggu fungsi sel T dengan mengambil tempat pada reseptor antigen. Hal itu dapat pula terjadi dengan kompleks imun antigen antibodi.

### **6) Toleransi**

Virus kanker mammae pada tikus disekresi dalam air susunya, tetapi bayi tikus yang disusunya toleran terhadap tumor tersebut. Infeksi kongenital oleh virus yang terjadi pada tikus-tikus tersebut akan menimbulkan toleransi terhadap virus tersebut dan virus sejenis.

### **7) Limfosit yang terperangkap**

Limfosit spesifik terhadap tumor dapat terperangkap didalam kelenjar limfe. Antigen tumor yang terkumpul dalam kelenjar limfe yang letaknya berdekatan dengan lokasi tumor, dapat menjadi toleran terhadap limfosit setempat, tetapi tidak terhadap limfosit kelenjar limfe yang letaknya jauh dari tumor.

#### **8) Produk tumor**

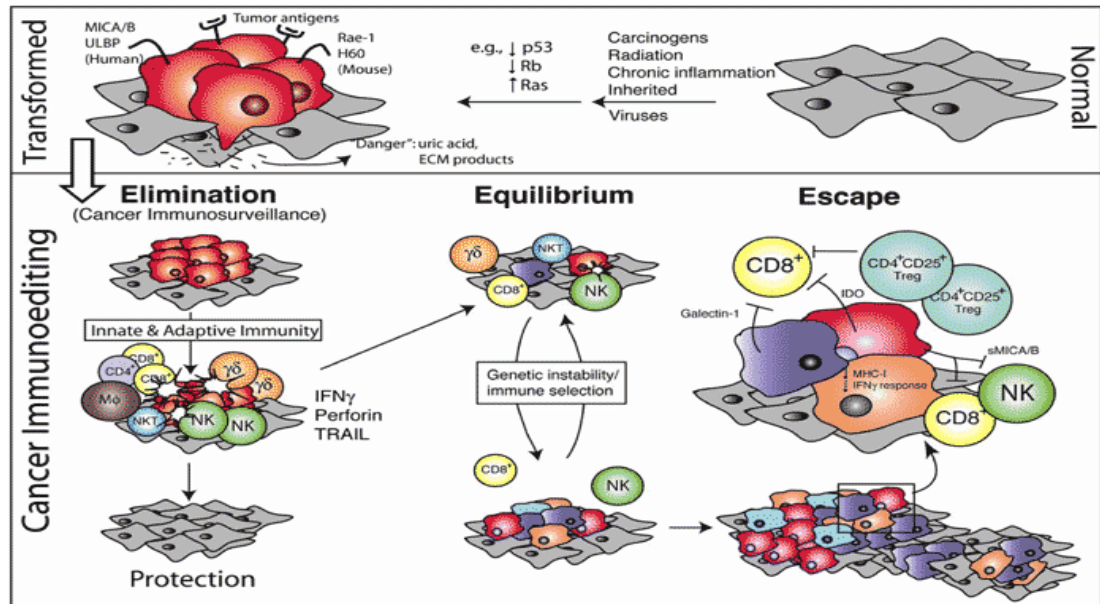
PG yang dihasilkan tumor sendiri dapat mengganggu fungsi sel NK dan sel K. Faktor humoral lain dapat mengganggu respons inflamasi, kemotaksis, aktivasi komplemen secara nonspesifik dan menambah kebutuhan darah yang diperlukan tumor padat.

#### **9) Faktor pertumbuhan**

Respons sel T bergantung pada interleukin. Gangguan makrofag untuk memproduksi IL-1, kurangnya kerjasama di antara subset-subset sel T dan produksi IL-2 yang menurun akan mengurangi respons imun terhadap tumor.

#### **10) Vaskularisasi**

Tumor mungkin mencapai diameter 1-2 mm 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.<sup>23</sup>



Gambar 2. Respon imun terhadap sel kanker.<sup>23,24</sup>

## 2.5. Apoptosis

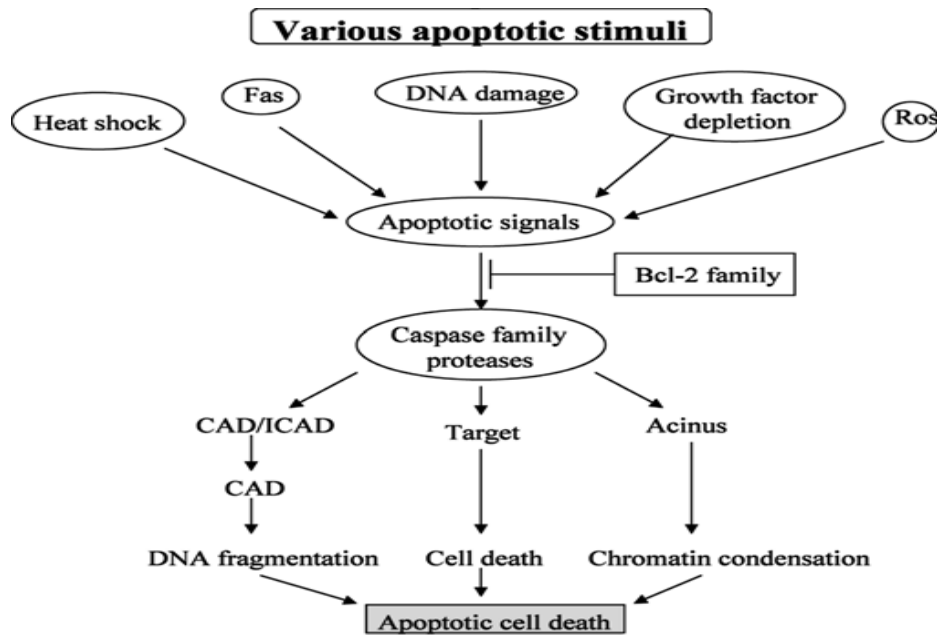
Apoptosis adalah suatu kematian sel yang terprogram atau *programmed cell death*. Sekali terjadi aktivasi akan menyebabkan reaksi enzymatic intraseluler. Enzyme, protein, dan DNA akan terurai, dan tidak ada komponen intraseluler yang terdispersi ke ekstraseluler. Sel mengalami apoptosis akan mengeluarkan signal ke ekstraseluler berupa phospolipid pada membran selnya yang dapat dikenali oleh sel-sel imun, terutama makrofag.<sup>24,25,28</sup>

Ada banyak stimulasi yang dapat menginduksi apoptosis. Stimulasi utama adalah agen kemoterapi, ultraviolet/radiasi, panas, ketidakseimbangan osmotik,

dan *Nitric Oxide*. Menurut jenis trigger dan tipe selnya, ada banyak jalur signal untuk mengaktifasi apoptosis, tapi yang akan kami sebutkan disini adalah apoptosis yang diinduksi oleh kemoterapi, CTL dan sel-NK yang diinduksi baik oleh *nonsecretory induced*, *ligand-induced* dan *secretory induced* dengan granzyme melalui perantaraan sekresi perforin.<sup>28,29</sup>

Kerusakan DNA dipicu oleh *enzyme caspase* yang mengaktifkan DNase sehingga terjadi kerusakan DNA selama apoptosis. *Caspase* merupakan suatu molekul protein dengan berat 10 dan 20 kd, berupa protease cystein, ada 12 jenis *caspase*. Protein target dari *caspase* adalah *DNA repair system*. *Caspase* 8 dan 10 dapat diaktifkan oleh granzyme maupun oleh suatu katalisator protease yaitu FLICE ( FADD-LIKE IL-1 Converting Enzyme) yang berikatan oleh *Fas Associated Death Domain* (FADD), pada reseptor CD95/Fas setelah kontak dengan Fas ligand. Fas ligand ini bisa berasal dari ekspresi protein antigen dari CTL, sitokin TNF, ataupun metabolit ligand pada Fas.<sup>26,28,29</sup>

Secara mikroskopik apoptosis dapat diketahui dengan pengecatan HE, dengan melihat *apoptotic bodies* yang ada. *Apoptotic bodies* secara mikroskopik akan tampak sebagai sel tunggal bulat dengan gambaran kromatin yang terkondensasi berwarna basofilik, kadang gambaran kromatin yang terlihat pecah-pecah, dengan sitoplasma yang eosinofilik. Sering terlihat *apoptotic bodies* terpisah dari sel-sel di sekitarnya yang intak dengan gambaran halo yang jelas.<sup>28,29</sup>



Gambar 3. Proses apoptosis, diambil dari Ryungsa Kim, Kazuaki Tanabe, The Molecular Mechanism of Anticancer Drug Induced Apoptosis , 3 Oktober 2002.<sup>30</sup>

## 2.6. Transfer Factor

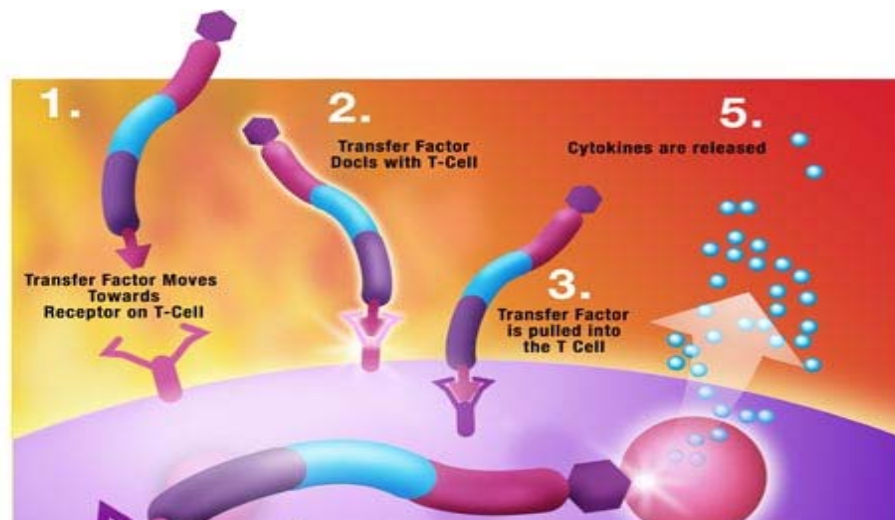
### 2.6.1. Latar belakang

Istilah *Transfer factor* pertama kali dipopulerkan oleh seorang perintis imunologi Dr .H . Sherwood Lawrence 1949 dengan menyuntikan ekstrak leukosit dari seseorang yang pernah terkena tuberkulosis kepada seseorang yang belum pernah terjangkiti ternyata memberikan kekebalan resipien terhadap serangan tuberkulosis. Dari fenomena ini beliau menyimpulkan adanya suatu faktor yang mampu memindahkan kemampuan imunitas dari pendonor ke resipien, faktor ini diberi nama *transfer factor*.<sup>31</sup>

*Transfer factor* adalah suatu peptida yang terdiri dari 44 asam amino, dan RNA tetapi tidak mempunyai DNA, dengan berat molekul < 10.000 dalton ( 3.500 – 6.000 ) yang dihasilkan dari ekstrak kolustrum sapi. Hampir setiap kolustrum pada mamalia mengandung *transfer factor*. Ukurannya yang kecil membantu menjadikan tidak alergenik, tidak diabsorpsi oleh asam lambung ataupun enzim digestif lain sehingga aman dikonsumsi secara oral dan efektif sebagai imunostimulator.<sup>31</sup>

Manusia menghasilkan susu berkolustrum dalam masa 24 jam pertama kelahiran ( 2 % Ig G ). Sedangkan sapi dapat menghasilkan kolustrum untuk waktu yang lebih lama yaitu antara 36 hingga 48 jam ( 86 % Ig G ) hampir setara dengan 9 galon kolustrum.<sup>32</sup>

Kolustrum adalah cairan pra susu berwarna kekuning – kuning yang dihasilkan oleh ibu atau mamalia yang baru saja melahirkan. Kolustrum memiliki berbagai keistimewaan yang tidak dijumpai pada sumber makanan lain, diantaranya mengandung zat pertumbuhan dan pertahanan tubuh. Perbedaan utama diantara kolustrum dengan susu biasa adalah kolustrum mengandung komponen bioaktif yang tinggi, terdapat lebih dari 90 jenis komponen didalamnya, dimana komponen utamanya terbagi 2 yaitu faktor imun dan faktor pertumbuhan.<sup>31,32</sup>



Gambar 4. Peran *transfer factor* tingkat seluler.<sup>32</sup>

Darryl See dkk telah melakukan penelitian penggunaan *transfer factor* terhadap 20 pasien kanker payudara dengan umur rata-rata 49,3 dan masing-masing pasien mengidap kanker stadium 3-4 dan telah divonis mati oleh ahli onkologi dengan harapan hidup 3,7 bln. Pada penelitian tersebut masing-masing pasien diberi 9 kapsul *transfer factor plus* per hari ditambah dengan general nutrien lain (antioksidan,enzym digestif, prebiotik dan multivitamin). Setelah 8 bln,16 pasien masih hidup, diantaranya mengalami remisi dan stabil. Nilai standard fungsi NK sel adalah 6,4 pada penelitian tersebut dalam waktu 4 mg fungsi NK sel meningkat menjadi 25,7 dan dalam waktu 6 bln naik menjadi 27,6 ini merupakan suatu kenaikan luar biasa yaitu sekitar 400%. Studi berikutnya menilai efek sinergisme *transfer factor*, masing - masing komponen diuji secara terpisah kemudian diuji secara keseluruhan. Komponen campuran lebih meningkatkan fungsi NK sel daripada komponen terpisah. Studi ini menunjukkan kemampuan tersebut ada pada *transfer factor* yang mampu mempengaruhi nutrien lain.<sup>8</sup>

Andrei I melakukan penelitian pada tikus yang mengidap kanker metastase ke paru dengan kombinasi terapi antara kemoterapi *cyclophosphamide* dengan imunoterapi (IL-15). Kombinasi terapi *cyclophosphamide* dan IL-15 dapat memperpanjang lama hidup hingga 32% dan mampu meningkatkan level dari NK1.1+/LGL-1 dan CD8+/CD4+ T sel.<sup>9</sup>

### 2.6.2. Dosis *Transfer Factor*

Dosis *transfer factor* kemasan kapsul @ 385 mg .

### 2.5. *Cyclophosphamide*

*Cyclophosphamide* merupakan suatu obat *antineoplastic* golongan Nitrogen mustard *Alkylating agent* yang mempunyai berat molekul 261.085 g/mol, farmakokinetik bioavailabilitas > 75 % oral dengan protein binding > 60 % dimetabolisme dihepar dan diekskresikan melalui ginjal, waktu paruh 3 – 12 jam . Bekerja pada semua siklus sel dengan cara memotong rantai DNA . Dosis 25, 50 mg tablet oral, injeksi 100-2000 mg.<sup>33,34,35</sup>

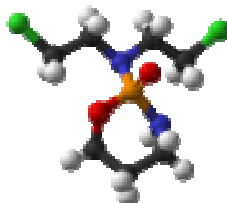
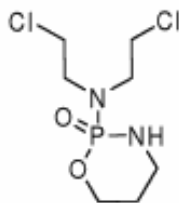
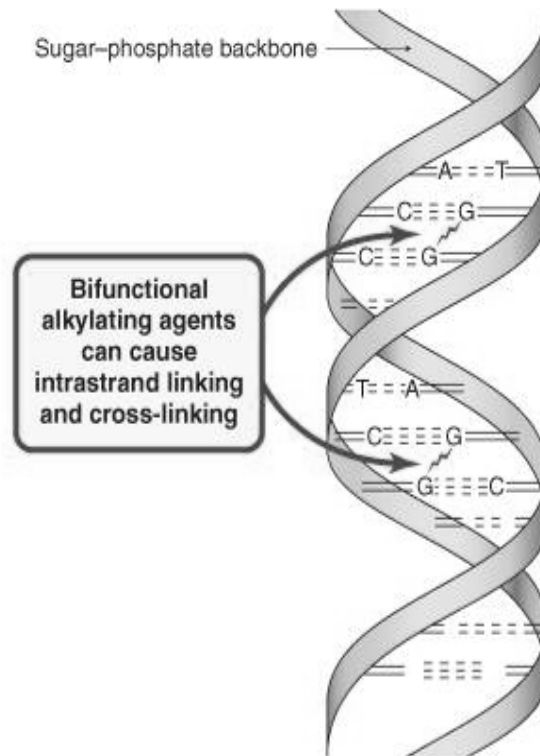


Figure 2.5. (2-chloroethyl)-2-oxo-1-oxa-3-aza-zu(5) –phosphocyclohexan-2-amin



Gambar 5. Cara kerja cyclophosphamide dalam memutus rantai DNA.<sup>34</sup>

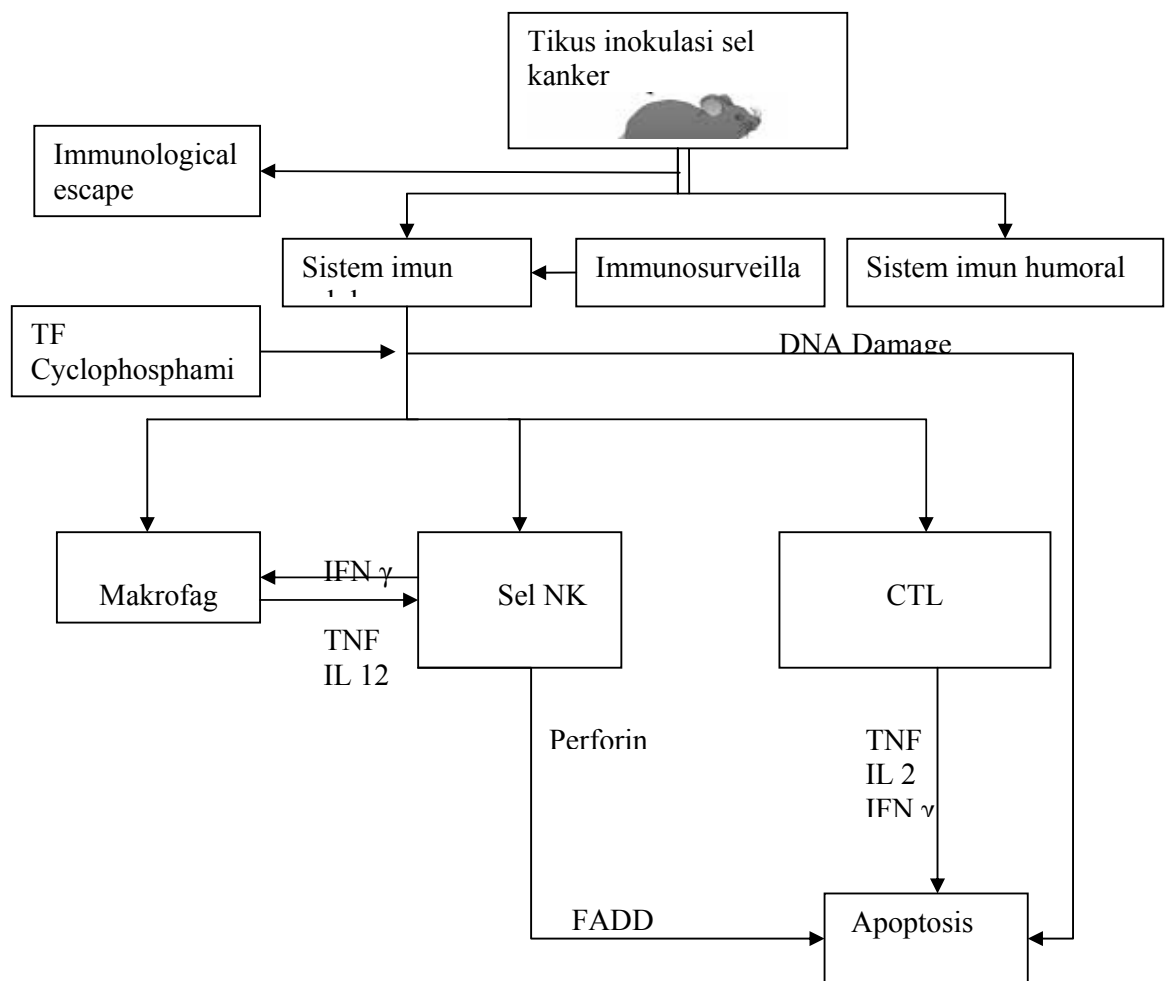
*Cyclophosphamide* menimbulkan kerusakan DNA permanen dan menimbulkan efek yang lebih luas terhadap jaringan yang sedang membelah. Sel-sel labil, seperti sel hematopoiesis dalam sumsum tulang, epitel rambut, epitel permukaan rongga organ dalam (epitel columnar traktus digestivus dan tuba falopi dan epitel transisional pada kandung kemih, yang mempunyai kemampuan membelah terus menerus dan berproliferasi tak terbatas, merupakan sasaran efek dari kemoterapi pada umumnya dan *cyclophosphamide* pada khususnya. Hal ini tampak jelas terlihat seperti rambut rontok, diare dan immunosupresi. Derivat aktif *cyclophosphamide*, *hidroxy-peroxy-cyclophosphamide*, menekan aktivitas sel NK hal ini memperberat efek immunosupresan *cyclophosphamide*.<sup>34,35</sup>

Efek samping *cyclophosphamide* yang sering terjadi adalah lekopeni yang dapat meningkatkan insiden infeksi dan hilangnya periode menstruasi. Efek samping yang timbul pada dosis tinggi adalah cardiotoxic, nefrotoxic, hiperuresemia dan SIADH (*Sindrome Inappropriate Anti Diuretic Hormon*). *Cyclophosphamide* sebagai kemoterapi banyak digunakan sebagai pengobatan penyakit kanker seperti kanker payudara, leukemia, limfoma maligna, multipel myeloma, kanker ovarium, sarkoma jaringan lunak, sindrom nefrotik, neuroblastoma, wilm's tumor, retino blastoma, dan mykosis fungoides.<sup>33,34</sup>

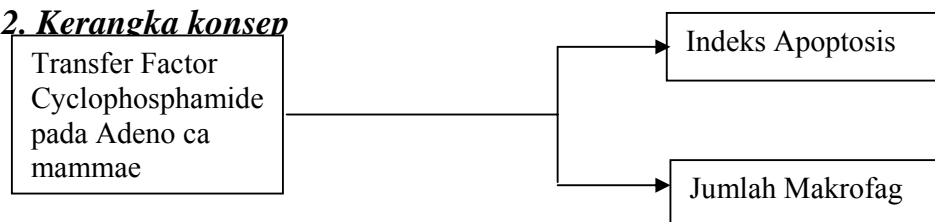
### BAB 3

## KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

### 3.1. Kerangka teori



### 3.2. Kerangka konsep



### **3. 3. HIPOTESIS**





1. Peningkatan indeks apoptosis lebih tinggi pada mencit yang diberikan kombinasi *transfer factor* dan *cyclophosphamide* dibanding hanya diberikan *transfer factor*.
2. Peningkatan indeks apoptosis lebih tinggi pada mencit yang diberikan kombinasi *transfer factor* dan *cyclophosphamide* dibanding hanya diberikan *cyclophosphamide*.
3. Peningkatan jumlah makrofag lebih tinggi pada mencit yang diberikan kombinasi *transfer factor* dan *cyclophosphamide* dibanding hanya diberikan *transfer factor*.
4. Peningkatan jumlah makrofag lebih tinggi pada mencit yang diberikan kombinasi *transfer factor* dan *cyclophosphamide* dibanding hanya diberikan *cyclophosphamide*.
5. Ada hubungan antara indeks apoptosis dengan peningkatan jumlah makrofag antara mencit yang diberikan kombinasi dengan hanya diberikan *transfer factor* atau *cyclophosphamide*.

## B A B 4

### METODE PENELITIAN

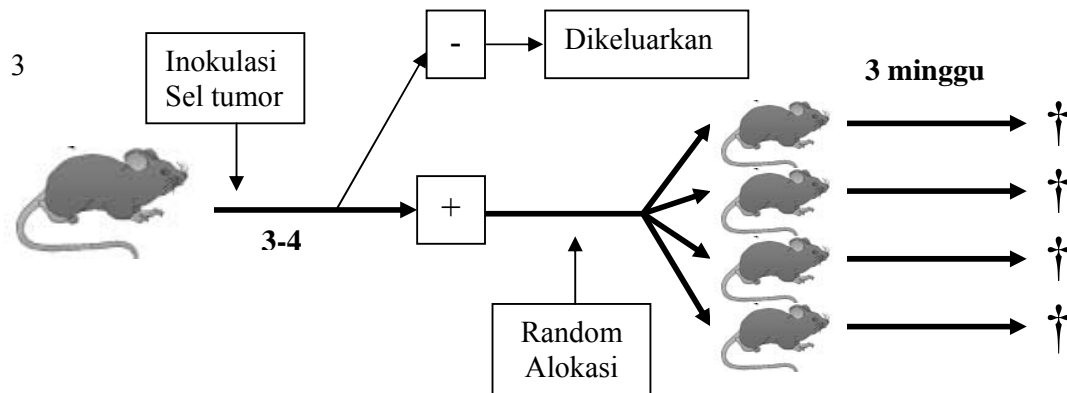
#### ***4.1. Rancangan Penelitian***

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan pendekatan *The Post Test – Only Control Group Design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian.<sup>33,34</sup> Percobaan dilakukan dengan rancangan acak lengkap (*Completely Randomized Design*), randomisasi sederhana dilakukan dengan cara mencit diberi nomor tempelkan pada ekornya, kemudian masing-masing kode nomor dimasukkan dalam tabung untuk dilakukan lotre dan hasilnya untuk membedakan keempat kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol (K), Perlakuan 1 (P1), Perlakuan 2 (P2) , Perlakuan 3 (P3) Adapun pembagian kelompok perlakuan adalah sebagai berikut:

K		Kelompok kontrol, mencit yang hanya di inokulasi sel kanker.
P1		Kelompok perlakuan 1, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan mendapat <i>transfer factor</i> 1 mg(0,5 ml) dan <i>cyclophosphamide</i> 0,2 mg(0,2 ml)
P2		Kelompok perlakuan 2, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan, mendapat <i>transfer factor</i> 1 mg(0,5 ml).
P3		Kelompok perlakuan 3, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan mendapat <i>cyclophosphamide</i> 0,2 mg(0,2 ml).



Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut: Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut:



## 4.2. *Populasi dan Sampel*

### 4.2.1. **Populasi**

Populasi penelitian ini adalah mencit betina strain C3H Strain ini dipilih karena selain sudah sering digunakan untuk penelitian kanker juga dapat diamati respon imunologiknya. Sedang penentuan jenis kelamin mencit yang dipakai pada penelitian ini dilakukan untuk memudahkan pemeliharaan karena jenis kelamin betina tidak begitu agresif dibandingkan jenis jantan sehingga dapat mengurangi resiko terjadinya cedera karena perkeltahan. Adanya cedera ini akan menimbulkan kerancuan dalam menilai respon imunitasnya.

#### 4.2.2. Sampel

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

Kriteria Inklusi:

- a. Mencit betina.
- b. Strain C3H.
- c. Berat badan 20-30 gram setelah aklimatisasi.
- d. Tidak ada abnormalitas anatomis yang tampak.

Kriteria Eksklusi:

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

Besar sampel untuk tiap kelompok minimal 5 ekor dengan cadangan 10 %, pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok 6 ekor mencit.

Sebelum digunakan dalam penelitian, 24 ekor mencit diadaptasikan terlebih dahulu selama 1 minggu. Selama dalam pemeliharaan mencit diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Untuk menghindari bias terhadap berat badan maka dilakukan penimbangan mencit sebelum mendapat perlakuan. Selanjutnya mencit dibagi menjadi 4 kelompok secara acak, masing-masing terdiri dari 6 ekor yaitu:

### **4.3. Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 6 bulan. Perlakuan pada mencit dilakukan dilaboratorium Biokimia FK UNDIP, Proses pembuatan blok parafin sampai pewarnaan HE dilakukan dilaboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

### **4.4. Variabel Penelitian**

#### **Variabel bebas:**

Sebagai variabel bebas dalam penelitian ini adalah

1. Pemberian kombinasi *transfer factor* dan *cyclophosphamide*.
2. Pemberian *transfer factor*.
3. Pemberian *cyclophosphamide*.

#### **Variabel tergantung:**

Sebagai variabel tergantung adalah Indeks Apoptosis dan jumlah makrofag.

#### **Definisi operasional :**

- Jumlah makrofag diukur secara visual dari preparat potongan massa tumor dengan pengecatan HE, dengan menghitung jumlah makrofag dalam 100 sel tumor dari area tepi tumor yang berbatasan dengan daerah vaskularisasi pembesaran 400x, pada 10 lapangan pandang, hasil skala variabel : rasio.

- Indeks apoptosis diukur secara visual dari preparat potongan massa tumor dengan pengecatan HE, dihitung sesuai dengan metoda yang digunakan oleh Aihara M et all, dimana badan apoptotik dihitung per 100 sel tumor dari area yang signifikan dengan pembesaran 400x, pada 10 lapangan pandang dari tiap preparat, dalam satu blok parafin. Kemudian diambil skala variabel : rasio.

#### ***4.5. Bahan dan Alat***

- Mencit betina strain C3H dengan umur 3 bulan, berat 20 - 30 gram.
- Adenokarsinoma diperoleh dari mencit donor. Tumor yang mengandung sel adenokarsinoma dari mencit donor akan ditransplantasikan ke mencit resipien. Sebelum ditransplantasikan, tumor dari mencit donor akan diinsisi biopsi dan dilakukan pemeriksaan histopatologi untuk mengkonfirmasi jenis tumornya.
- Cyclophosphamide tablet @.50 mg dari Kalbe farma.
- Transfer Factor kapsul @.385 mg dari 4life *Transfer Factor* .
- Bahan transplantasi jaringan tumor pada mencit.
  - Alkohol 70 %
  - Larutan Garam fisiologik
  - Es batu
  - Mencit donor bertumor
  - Mencit resipien

- Bahan untuk pemeriksaan histopatologi rutin.
  - Formalin buffer 10%
  - Alkohol 50%, 70%, 80%, 96%, absolute
  - Xylol
  - Parafin cair (Histoplast)
  - Albumin dan Poly-L-Lysine
  - Bahan pengecatan Hematoksin-Eosin (HE)
  - Canada balsam dan Entelan

#### ***4.6. Tempat Penelitian***

Penelitian dilakukan di:

- Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Undip.
- Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UGM Yogyakarta.

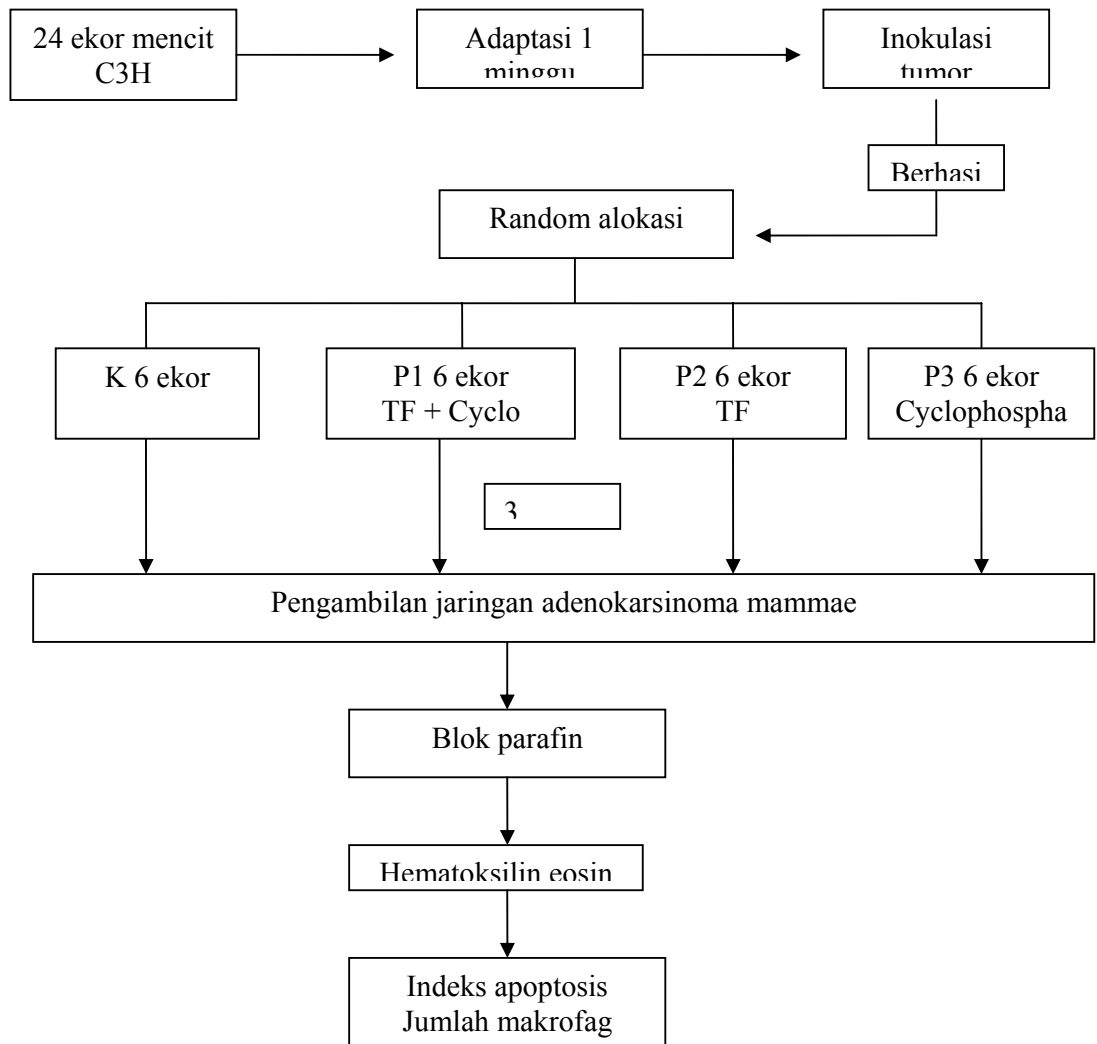
#### ***4.7. Prosedur Pengumpulan Data***

- ◆ 24 ekor mencit betina strain C3H dengan umur 3 bulan, dan berat 20 - 30 gram diaklimatisasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi pakan standar selama satu minggu secara ad libitum.
- ◆ Dilakukan inokulasi sel-sel kanker pada masing-masing mencit kemudian ditunggu selama 3-4 hari.
- ◆ 24 ekor mencit yang telah terpapar kanker tersebut kemudian dibagi menjadi 4 kelompok masing-masing 6 ekor yang ditentukan secara acak dengan

komputer, masing-masing kelompok dikandangan secara individual. Perlakuan yang diberikan seperti pada halaman 28, selama 3 minggu dan pemberian Cyclophosphamide secara oral dengan dosis 0,2 mg (0,2 ml) diberikan 1 kali dan Transfer Factor secara oral dengan dosis 1 mg (0,5 ml) diberikan 3 kali menggunakan pipet mikro.

- ◆ Mencit dianestesi dengan ether selanjutnya diambil jaringan tumornya . Jaringan tumor diproses menjadi preparat histopatologik setelah dibuat blok paraffin.

#### ***4.8. Alur kerja***



K : Kontrol

P1 : Diberikan Transfer Factor 1 mg(0,5ml) 3x sehari selama 3 minggu dan diberikan Cyclophosphamide 0,2 mg(0,2ml) 1x dievaluasi 3 minggu.

P2 : Diberikan Transfer Factor 1 mg(0,5ml) 3x sehari selama 3 minggu.

P3 : Diberikan Cyclophosphamide 0,2 mg(0,2ml)1x dievaluasi 3 minggu.

## **4.9. *Prosedur – prosedur Laboratorium***

### **4.9.1. *Prosedur transplantasi tumor***

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

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

#### **4.9.2. Prosedur pembuatan preparat histopatologi**

- a. Fiksasi

Potongan adenokarsinoma dimasukkan dalam larutan formalin buffer (larutan formalin 10% dalam buffer Natrium asetat sampai mencapai pH 7,0). Waktu fiksasi jaringan 18-24 jam. Setelah fiksasi selesai, jaringan dimasukkan dalam larutan aquadest selama 1 jam untuk proses penghilangan larutan fiksasi.

- b. Dehidrasi

Potongan adenokarsinoma dimasukkan dalam alkohol konsentrasi bertingkat. Jaringan menjadi lebih jernih dan transparan. Jaringan kemudian dimasukkan dalam larutan alkohol-xylol selama 1 jam dan kemudian larutan xylol murni selama 2x2 jam.

- c. Impregnasi

Jaringan dimasukkan dalam paraffin cair selama 2x2 jam.

- d. Embedding

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

polilisin sebagai perekat. Jaringan pada kaca obyek dipanaskan dalam inkubator suhu 56-58°C sampai paraffin mencair.

e. Pewarnaan jaringan dengan H&E

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

#### ***4.10. Cara mengumpulkan data***

Dari masing-masing kelompok perlakuan diambil massa tumornya dan selanjutnya dibuat preparat setebal 6 mikron, diwarnai dengan pengecatan Hematoxylin-Eosin kemudian diamati Indeks Apoptosisnya dan Jumlah makrofag.

#### ***4.11. Analisis data***

Data yang terkumpul diedit, dicoding dan di-*entry* kedalam file komputer. Analisa data meliputi analisis deskriptif dan uji hipotesis. Pada analisa deskriptif indeks apoptosis dan jumlah makrofag adenokarsinoma payudara disajikan dalam bentuk tabel rerata, SD, median dan grafik garis.

Pada penelitian ini karena distribusi data tidak normal maka menggunakan uji *Shapiro-Wilk*, dilanjutkan uji *Kruskal-Wallis*. Untuk mengetahui perbedaan antar kelompok dilakukan uji *Mann Whitney-U*. Untuk uji korelasi antara variabel indeks apoptosis dan jumlah makrofag menggunakan *Spearman's rho*.

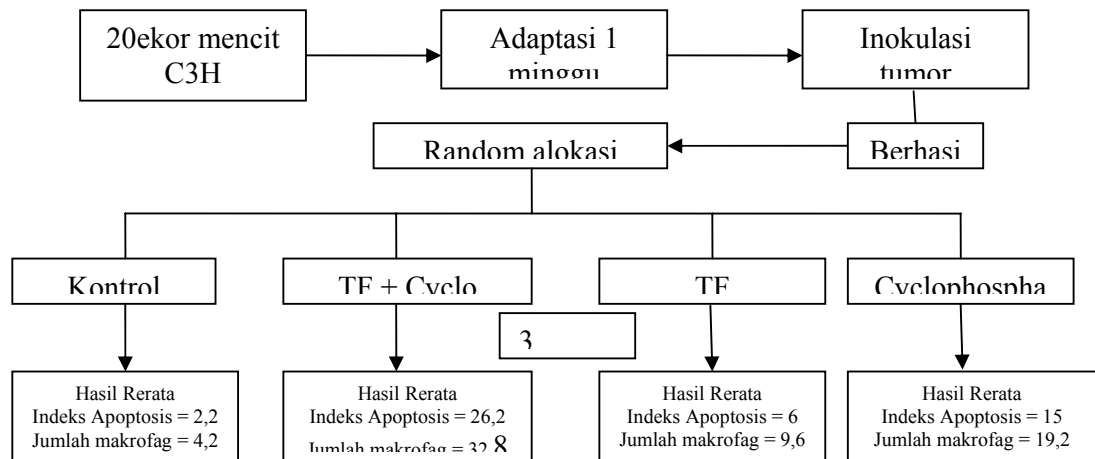
Batas derajat kemaknaan adalah apabila  $p < 0,05$  dengan 95% interval kepercayaan. Analisis data dilakukan dengan *software* SPSS Ver. 11,5 for *Windows*.<sup>36--39</sup>

## **BAB 5**

### **HASIL**

Dari 24 ekor tikus resipien dan 2 ekor tikus donor bertumor strain C3H yang diadaptasi selama 7 hari tidak didapatkan tikus sakit maupun mati, kemudian dilakukan inokulasi sel adenokarsinoma payudara terhadap tikus resipien, setelah 5-7 hari semua tikus berhasil diinokulasi sel kanker, kemudian dilakukan randomisasi kedalam 4 kelompok (kontrol, P1= diberikan kombinasi *transfer*

*factor* dan *cyclophosphamide*, P2= diberikan *transfer factor*, P3= diberikan *cyclophosphamide*). Dari keseluruhan tikus yang dilakukan percobaan terdapat tikus yang mati 1 pada hari kesepuluh pada kelompok P2. 21 hari setelah dilakukan percobaan didapatkan : rata-rata indeks apoptosis pada kelompok kontrol 2,2 ( $\pm$  1,30), median 2(1,0;3,5), P1 26,2 ( $\pm$  2,28),median 26(24;28), P2 6 ( $\pm$  1,58),median 6(4,5;7,5), P3 15 ( $\pm$  1,58),median 15(13,4;16,5) Rata-rata jumlah makrofag pada kelompok kontrol adalah 4,2 ( $\pm$  1,6), median 5(2,5;5,5),P1 adalah 32,8 ( $\pm$  1,92), median 33(31;34), P2 adalah 9,6 ( $\pm$  1,51), median 9(8,5;11), P3 adalah 19,2 ( $\pm$  1,92), median 19(17,5;21).



Tabel 1. Jumlah sel apoptosis pada adenokarsinoma Mamma.

Kelompok	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Indeks Apoptosis
Kontrol	K1	1	-	2	2	-	1	3	-	1	-	1
	K2	-	1	2	4	3	-	2	4	2	2	2
	K3	-	-	2	1	1	1	2	-	1	2	1
	K4	3	3	5	4	6	5	3	3	4	4	4
	K5	2	4	5	4	5	2	1	2	3	2	3
Transfer factor Cyclophosphamide	KB1	26	28	25	27	26	28	27	26	29	24	26
	KB2	28	24	27	29	28	30	29	29	29	30	28

	KB3	29	28	28	30	29	28	30	27	30	31	29
	KB4	22	23	23	27	24	26	25	23	21	26	24
	KB5	25	23	24	25	26	25	22	25	23	24	24
Transfer factor	TF1	4	6	7	8	10	5	7	8	9	6	7
	TF2	6	4	7	9	6	3	7	5	7	6	6
	TF3	7	4	3	6	2	8	4	7	5	4	5
	TF4	-	2	4	6	8	6	5	7	1	1	4
	TF5	4	8	9	7	2	9	8	6	9	8	8
Cyclophosphamide	CY1	13	13	12	13	15	14	17	10	12	11	13
	CY2	12	14	15	17	16	15	19	18	12	14	15
	CY3	17	16	15	17	17	15	13	18	15	17	16
	CY4	18	19	16	19	12	18	17	19	18	14	17
	CY5	15	12	14	11	15	17	12	15	16	12	14

Tabel 2. Jumlah sel apoptosis pada adenokarsinoma .

Kelompok	N	Jumlah sel yang apoptosis				
		Minimum	Maksimum	Median	Mean	SD
Kontrol	5	1	4	2	2,2	1,30
TF-Cyclo (P1)	5	24	29	26	26,2	2,28
TF (P2)	5	4	8	6	6	1,58
Cyclophosphamide (P3)	5	13	17	15	15	1,58

Tabel 3. Jumlah sel makrofag pada Adenokarsinoma Mamma.

Kelompok	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Jumlah Makrofag
Kontrol	K1	1	3	2	-	4	2	-	4	2	2	2
	K2	4	3	2	8	6	7	5	4	7	4	5
	K3	2	5	5	4	2	4	3	1	2	2	3
	K4	3	7	6	9	5	7	6	6	7	4	6

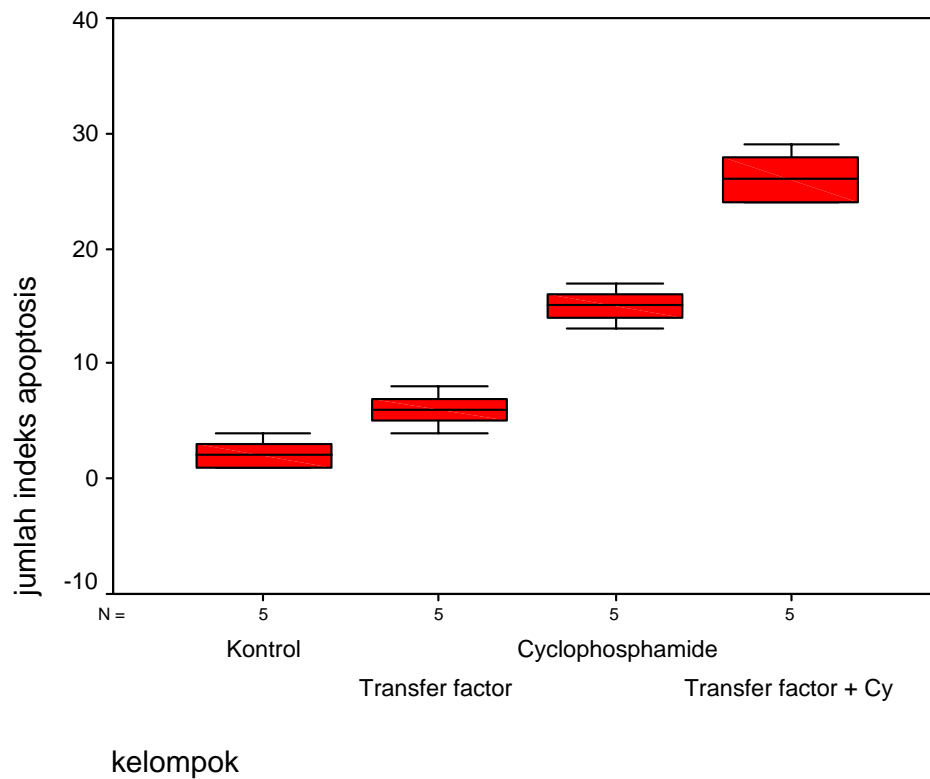
	K5	2	3	6	4	7	4	7	5	8	4	5
Transfer factor Cyclophosphamide	KB1	31	32	29	28	30	33	28	33	32	30	30
	KB2	35	35	36	37	35	35	34	33	36	34	35
	KB3	24	32	36	37	37	34	32	30	27	31	32
	KB4	32	34	33	35	34	37	36	38	30	31	34
	KB5	35	33	33	29	35	34	32	35	32	33	33
Transfer factor	TF1	5	9	10	11	9	10	6	9	11	10	9
	TF2	8	9	7	8	11	14	13	9	9	12	10
	TF3	2	7	9	4	8	6	9	8	8	9	8
	TF4	7	8	11	9	6	8	10	11	11	9	9
	TF5	12	9	15	12	13	12	11	10	14	12	12
Cyclophosphamide	CY1	4	19	16	18	12	17	19	18	18	19	17
	CY2	14	17	19	17	16	20	23	21	15	18	18
	CY3	18	19	21	20	24	23	21	19	18	18	20
	CY4	23	24	23	25	21	19	21	24	21	19	22
	CY5	13	15	14	21	23	24	22	25	18	15	19

Tabel 4. Jumlah Makrofag pada sel adenokarsinoma mammae.

Kelompok	N	Jumlah makrofag				
		Minimum	Maksimum	Median	Mean	SD
Kontrol	5	2	6	5	4,2	1,6
TF-Cyclo (P1)	5	32	35	33	32,8	1,92
TF (P2)	5	8	12	9	9,6	1,51
Cyclophosphamide (P3)	5	17	22	19	19,2	1,92

### Indeks Apoptosis

Hasil perhitungan indeks apoptosis disajikan dalam bentuk grafik Boxplot

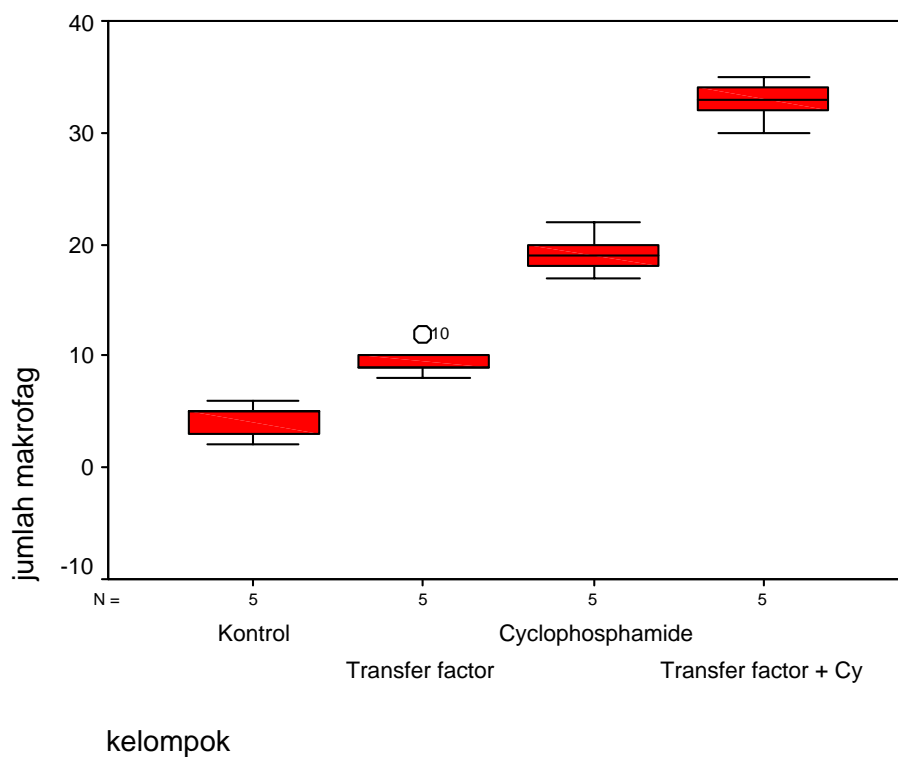


Gambar 6. Grafik Boxplot nilai rata-rata hasil perhitungan indeks apoptosis pada tiap kelompok percobaan.

Analisis statistik *Kruskal-Wallis* menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna (nilai  $p < 0,0001$ ) pada jumlah sel yang mengalami apoptosis antar kelompok percobaan yang terdiri 4 kelompok. Uji antar kelompok selanjutnya dilakukan dengan *Mann-Whitney* dengan nilai signifikansi ( $p < 0,001$ ). Didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok P1 dengan kontrol ( $p = 0,009$ ), kelompok P1 dengan P2 ( $p = 0,009$ ), kelompok P1 dengan P2 ( $p = 0,009$ ).

## Jumlah Makrofag

Hasil perhitungan jumlah makrofag disajikan dalam bentuk grafik Boxplot



Gambar 7. Grafik Boxplot nilai rata-rata hasil perhitungan jumlah makrofag

pada tiap kelompok percobaan.

Analisis statistik *Kruskal-Wallis* menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna (nilai  $p < 0,0001$ ) pada jumlah makrofag antar kelompok percobaan yang terdiri 4 kelompok. Uji antar kelompok selanjutnya dilakukan dengan *Mann-*

*Whitney* dengan nilai signifikansi ( $p < 0,001$ ). Didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok P1 dengan kontrol ( $p = 0,009$ ), kelompok P1 dengan P2 ( $p = 0,009$ ), kelompok P1 dengan P2 ( $p = 0,009$ ).

### **5.3. Uji Korelasi**

Uji korelasi dengan *Spearman's rho* dilakukan pada variabel indeks apoptosis terhadap jumlah makrofag ( $p < 0,05$ ) dari uji korelasi didapatkan adanya hubungan korelasi yang bermakna pada kelompok kontrol ( $p = 0,014$ ), kelompok P3 ( $p = 0,037$ ) dan pada kelompok P1 ( $p = 0,805$ ), P2 ( $p = 0,219$ ) tidak didapatkan hubungan yang bermakna.

## **BAB 6**

### **PEMBAHASAN**

Apoptosis adalah kematian terprogram dari suatu sel. Apoptosis berbeda dengan nekrosis, apoptosis tidak menimbulkan reaksi inflamasi. Apoptosis bertujuan untuk mengeliminasi sel-sel yang tidak diinginkan sehingga dapat melindungi organisme dari kerusakan lebih lanjut. Apoptosis dipicu oleh beberapa keadaan misalnya sel yang mengalami kerusakan DNA yang tidak dapat diperbaiki oleh sistem repair, efek hormon glukokortikoid, hipertermi, infeksi dan beberapa faktor pertumbuhan misalnya pada proses remodeling dan tumbuh kembang secara fisiologis. Pada apoptosis sel diinduksi untuk bunuh diri. Induksi terjadi karena terdapat sinyal yang menunjukkan adanya kegagalan mempertahankan sel normal. Pada apoptosis sel mengkerut, terdapat kondensasi kromatin sepanjang membran dalam inti dan mitokondria pecah melepaskan sitokrom-c, timbul gelembung pada permukaan sel dan terjadi degradasi kromatin yang terdiri dari DNA dan protein inti sel. Sel menjadi pecahan-pecahan kecil yang terbungkus membran. Phospholipid fosfatidil serin yang berada dalam membran plasma terekspos keluar ke permukaan dan diikat reseptor sel fagosit

seperti makrofag. Perubahan morfologi pada sel yang mengalami apoptosis adalah adanya lekukan pada untaian ganda DNA inti pada daerah sekitar antara nukleosom. Setelah proses apoptosis berjalan maka terbentuk *apoptotic bodies* yang mengandung beberapa organela dan komponen sitosolik. Badan apoptosis ini mengekspresikan reseptor ligan baru yang akan berikatan dengan makrofag untuk memulai proses fagositosis. Badan apoptosis akan difagosit oleh makrofag tanpa adanya reaksi inflamasi atau kalau terjadi sangat minimal.

Analisis statistik pada variabel indeks apoptosis menunjukkan bahwa pada kelompok perlakuan pemberian kombinasi *transfer factor* dan *cyclophosphamide* terdapat peningkatan indeks apoptosis lebih tinggi dibandingkan kelompok yang lain ( $p = 0,009$ ) terdapat perbedaan yang bermakna. Peningkatan tersebut oleh karena peran *transfer factor* dalam meningkatkan sel NK untuk mengeluarkan 2 tipe reseptor yang memperkuat kemampuannya membunuh sel kanker sedangkan *cyclophosphamide* bekerja dengan memotong rantai DNA, sehingga keduanya memacu apoptosis tumor dari berbagai *pathway* baik dengan jalur intrinsik maupun ekstrinsik.

Analisis statistik pada variabel jumlah makrofag menunjukkan bahwa pada kelompok perlakuan pemberian kombinasi *transfer factor* dan *cyclophosphamide* terdapat peningkatan jumlah makrofag lebih tinggi dibandingkan kelompok yang lain ( $p = 0,009$ ) terdapat perbedaan yang bermakna. Peningkatan jumlah makrofag tersebut oleh karena sel NK dapat menstimulasi interferon- $\gamma$  dimana interferon- $\gamma$  dapat memacu makrofag lebih aktif dalam proses fagositosis sel tumor. Sel-sel tumor yang mengalami apoptosis akan mengekspresikan protein

asing dipermukaan sel tumor, sehingga sel-sel tumor tersebut akan dikenali oleh *Antigen Presenting Cell*, salah satunya makrofag.

Uji korelasi dilakukan pada variabel indeks apoptosis terhadap jumlah makrofag. Dari uji korelasi tersebut didapatkan adanya hubungan korelasi yang bermakna pada kelompok kontrol ( $p = 0,014$ ), kelompok P3 ( $p = 0,037$ ) dan pada kelompok P1 ( $p = 0,805$ ), P2 ( $p = 0,219$ ) tidak didapatkan hubungan yang bermakna. Proses ini terjadi oleh karena peran *transfer factor* sebagai imunostimulator, sehingga membutuhkan waktu yang lebih lama untuk dapat bekerja lebih aktif dalam meningkatkan sel NK dalam membunuh sel tumor.

## BAB 7

### SIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1. Simpulan

— *Transfer factor* mempunyai potensi sebagai imunostimulator dan sitostatika

karena secara histopatologis dapat meningkatkan indeks apoptosis dan jumlah makrofag.

— Pemberian kombinasi transfer factor — cyclophosphamide mempunyai efek

sinergisme dalam membunuh sel kanker.

— Tidak didapatkan hubungan antara peningkatan indeks apoptosis dengan jumlah

makrofag.

## **7.2. Saran**

Untuk menyempurnakan konsep pemikiran pada penelitian masih perlu dilakukan penelitian lanjutan terhadap perkembangan massa tumor, indeks mitosis, indeks nekrosis, neovaskularisasi tumor, TNF, interferon  $\gamma$ , sel NK, perforin.

Penelitian tersebut akan menjadi landasan untuk kemungkinannya dilakukan pengujian klinis pada manusia.

## **DAFTAR PUSTAKA**

1. American cancer society. Cancer facts and figures, 2007.
2. American cancer society. what are the key statistics for breast cancer, 2007.
3. Blamey RW, Wilson ARM, Patrick J . screening for breast cancer in Dixon JM 2<sup>nd</sup> ed A.B.C of breast disease . BMJ books London, 2000 : 33-37
4. Khanna S . Implementation of cancer management in Indonesia, WHO representative to Indonesia, Presented at the national seminar on the implementation of cancer management in Indonesia, Ciawi, August 2-6-2002.

5. Harris JR, Lippman ME, Morrow M . Disease of the Breast, 2<sup>nd</sup> ed .  
Lippincott William and wilkins, Philadelphia, 2000.
6. Abbas A, Lichtman Ah, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. 3<sup>rd</sup>  
ed. Philadelphia : WB Saunders, 1997 : 90-2,161,165-8,220-1,258-9,266-  
7,269,279-80,290-5,383-405.
7. Beretta G . Cancer Treatment Medical Guide . 10<sup>th</sup> ed Milan : Farmitalia  
Carlo Erba Erbamont , 1991 : 174-176.
8. See D. Transfer Factor Study With 20 Cancer Patients. The Journal of  
Immunology, 2002 : 64-70.
9. Andrei I, Chapoval AI, Fuller JA, Kremlev SG, Kamda SJ and Evan R .  
Combination Chemoteraphy and IL 15 Adsmistration Induce Permanen  
Tumor Regression in a mouse lung tumor model : NK and T cell Mediated  
Effects Antagonized By B cell: The American Assotiation of Immunologist,  
1998 August : 6978-6983.
10. The History of Cancer. American Cancer Society, (9-10-2006).
11. Virginia KL, Colin AP, Raman Q, Edwin DS. Breast cancer. In: Philip R,  
Sandra M, Raman Q, editors. Clinical oncology. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB  
Saunders Company, 1993: 187-94.
12. Wunderlich JR, Restifo NP. Essentials Of Immunology . Cancer: Principles &  
Practice of Oncology, Fifth Edition Vincent T. DeVita, Jr, Samuel  
Hellman, Steven A. Rosenberg. Philadelphia, 1997; 3 : 47-75.

13. Stites DP, Terr Abba I, Parslow TP, .Medical Immunology, 9<sup>th</sup> ed, Stamford Connecticut, USA: Appleton & Lange, 1997.
14. Sobin LH, Wittekind CH ed. Classification of Malignant Tumours TNM. International Union Against Cancer UICC ; 6<sup>th</sup> ed. A John Wiley & Sons Inc.2002 : 131-41.
15. Junqueira LC, Arneiro j, Kelley RO. Basic Histology. 8<sup>th</sup> ed. Prentice Hall International inc London,1995 : 423-46.
16. Rosai J. Ackerman's surgical pathology. 8<sup>th</sup> ed. Missouri: Mosby-Year Book Inc, 1996: 1624-1625.
17. Bast CR. Principles of Cancer Biology : Tumor Immunology. Dalam: Devita VT, Rosenberg SA, Hellman W. eds. Cancer Principles and Practice of Oncology, Ed V, Philadelphia : Lippincott-Reven, 1997: 267-83.
18. Disaia PJ, Creasman WT, Tumor Immunology, Host Defense Mechanism and Biologic Therapy. In : Disaia JP. Creasman WT. Eds. Clinical Gynecology Oncology, Ed IV, Philadelphia L: Mosby, 1997: 534-75.
19. Herberman RB, Santoni A. Regulation of Natural Killer Cell Activity. In : Mihich E, eds. Biological Respond in Cancer Progress Toward Potential Application Vol 2, New York : Plenum Press, 1984: 121-37.
20. Sinkovics JG. A Reappraisal of Cytotoxic Lymphocytes in Human Tumor

Immunology. In : Cory JG, Andor S, eds. Cancer Biology and Therapeutics,  
New

York : Plenum Press, 1987: 225-45

21. Stites DP, Terr AI, Parslow TG. Medical Immunology 9<sup>th</sup> ed . International  
Edition

London : Apleton and Lange A Simon Co ; 1997 : 65-9,147,631-37.

22. Robbin SL, Cotran RS, Kumar V. Dasar Patologik Penyakit. Jilid 1. Alih  
Bahasa

Yunti MR, Jakarta : Bina Rupa Aksara ,1994 : 135-66.

23. Montenarh M. Humoral Imun Response Against The Growth Suppresor P  
53 In Shoenfeld Y. Editors. Human Malignancies In Cancer and  
Autoimmunity 1 st ed . Amsterdam : Elsevier Science B.V , 2000 : 193-94.

24. The Wikipedia free encyclopedia. Immune system. Adelaide: Wikipedia  
Foundation Inc; 2007. p 1-14. Available from: URL:  
[http://en.wikipedia.org/wiki/  
Immune system.](http://en.wikipedia.org/wiki/Immune_system)

25. Whiteside TL, Haberman RB. Characteristics of Natural Killer Cell and  
Lymphokine- activated killer cell. In : Oettgen HF editor . Human Cancer  
Immunology. Philadelphia : W B Saunders Company, 1990 : 718-44.

26. Thornthwaite JT . My Discovery of The Natural Killer Cell. Availaable from  
URL ;

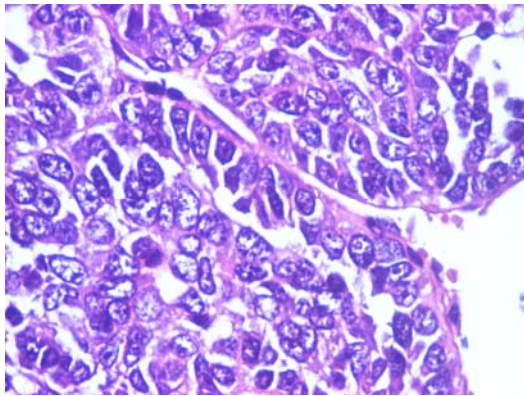
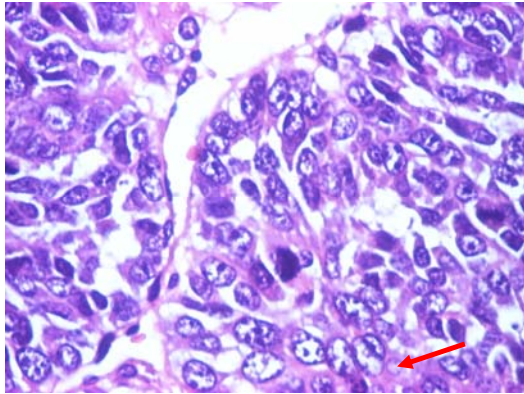
[//www. Cancer foundation .com/ NK Cell html.](http://www.Cancerfoundation.com/NK_Cell.html)

27. Kumar V, et all. Buku Ajar Patologi. 7<sup>th</sup>. Ed. Vol I : EGC. Jakarta, 2007.

28. The Wikipedia free encyclopedia. Apoptosis. Adelaide: Wikipedia Foundation Inc; 2007. p 1-10. Available from: URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Apoptosis>.
29. Abbas A, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology . 3 rd ed. Philadelphia : WB Saunders , 1997.
30. Ryungsa Kim, Kazuaki Tanabe. The Molecular Mechanism Of Anticancer Drug Induced Apoptotic,3 oktober 2002.
31. Lawrence HS, Borkowsky W. Transfer factor Current Status and Future Prospects 1996 : 1-5.
32. A. Study Summary Report : 4Life . Transfer factor advanced formula increase immune system effectiveness, 2007: [WWW.4Life.com](http://WWW.4Life.com).
33. Brock N . The History of the Oxazaphosphorine Cytostatics cancer, 1996 : 542-47.
34. The Wikipedia free encyclopedia. Cyclophosphamide. Adelaide: Wikipedia Foundation Inc; 2007. p 1-4. Available from: URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Cyclophosphamide>.

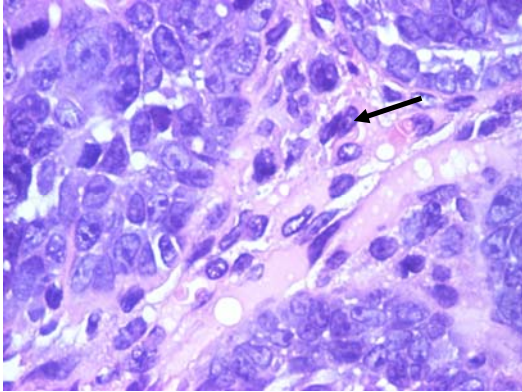
35. Michael C. Perry, Clay M , Anderson ed all : Companion Hand Book to The  
Chemotherapy Source Book , 2<sup>ed</sup>,2004: 430.
36. Pratiknya AW : Dasar-dasar Metologi Penelitian Kedokteran dan Kesehatan ,  
Cetakan I, Jakarta : CV Rajawali, 1986 : 147-65.
37. Chandra Budiman. Pengantar Statistik Kesehatan. Jakarta: EGC, 1995: 1-96.
38. Munro BH. Selected Non Parametric Techniques. In: Munro BH ed.  
Statistical  
Methods for health Care Research. Philadelphia: Lippincott-Raven Publisher,  
1997:  
99-121.
39. Santoso Singgih. SPSS (Statistical Product and Service Solution). Jakarta: PT.  
Elex  
Media Komputindo, 1999: 30-80.

Lampiran hasil pemeriksaan mikroskopis massa tumor

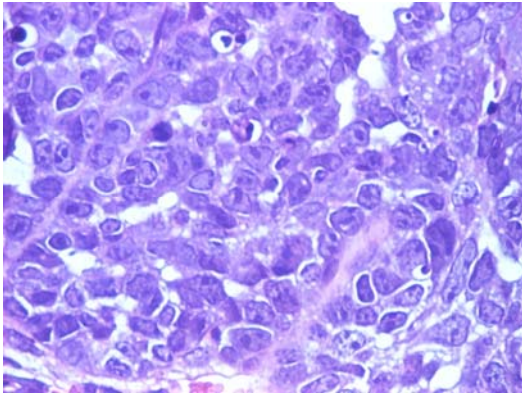


KTR2, Apoptosis 3

KTR2, Makrofag 6



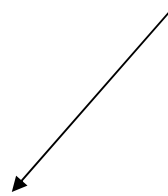
KOM1, Makrofag 30

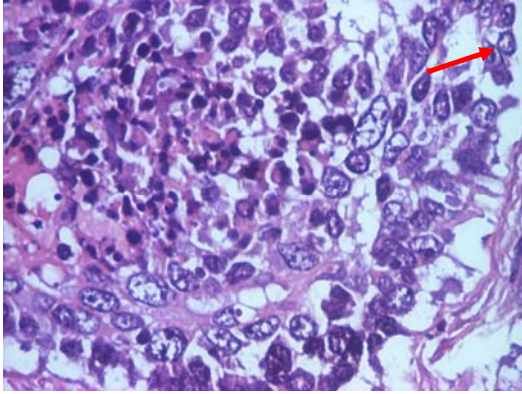


KOM1, Apoptosis 24

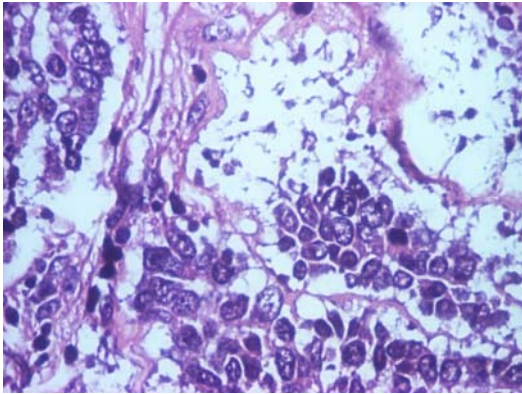
 Apoptosis

 Makrofag

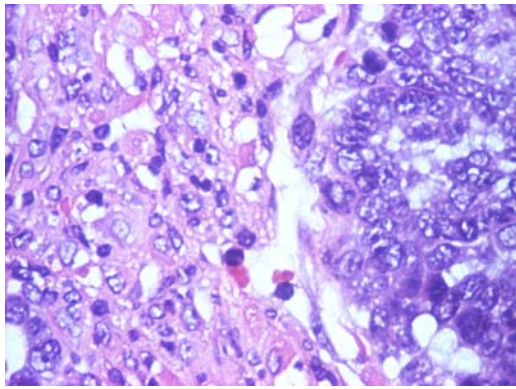
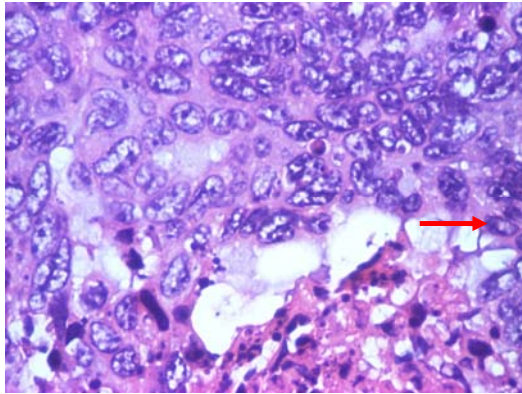




TF3, Apoptosis 4

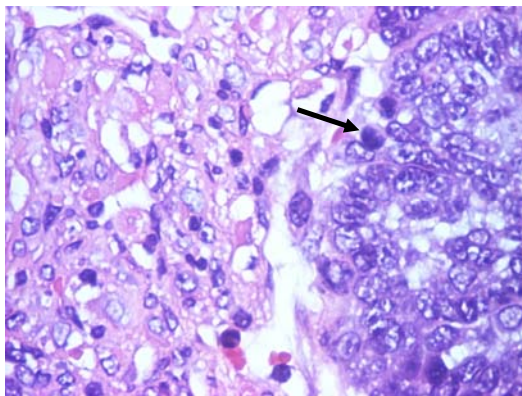


TF3, Makrofag 9



CY2, Apoptosis 12

CY2, Makrofag 14



CY2

—→ Apoptosis

—→ Makrofag

