

**Artikel Karya Tulis Ilmiah**

**PENGARUH PEMBERIAN POLIFENOL TEH HIJAU TERHADAP  
GAMBARAN JUMLAH AgNOR JARINGAN ADENOKARSINOMA  
MAMMA MENCIT C3H**



Diajukan Untuk Memenuhi Tugas dan Melengkapi Persyaratan dalam  
Menempuh Program Pendidikan Sarjana Fakultas Kedokteran

Disusun oleh :

**Muhammad Mu'amar Habibie  
G2A004106**

**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG  
2008**

## HALAMAN PENGESAHAN

Telah diuji pada tanggal 25 Agustus 2008 dan telah diperbaiki sesuai dengan saran-saran yang diberikan, Artikel Karya Tulis Ilmiah dari :

Nama : M. M. Habibie  
NIM : G2A004106  
Tingkat : Program Pendidikan Sarjana  
Fakultas : Kedokteran Umum  
Universitas : Diponegoro  
Bagian : Histologi  
Judul : PENGARUH PEMBERIAN POLIFENOL TEH HIJAU TERHADAP GAMBARAN JUMLAH AgNOR DALAM JARINGAN ADENOKARSINOMA MAMMA MENCIT C3H  
Dosen Pembimbing : dr. Ratna Damma Purnawati, M.Kes  
Semarang, 26 Agustus 2008  
Ketua Penguji Penguji,

dr. Ahmad Zulfa J., M.Si, Med, Sp.And

Sp.PA

NIP : 132 163 896

dr. Siti Amarwati Y.,

NIP. 130 704 308

Mengetahui,  
Dosen pembimbing

dr. Ratna Damma Purnawati, M.Kes

NIP. 131 916 037

## **Pengaruh Pemberian Polifenol Teh Hijau Terhadap Gambaran Jumlah *AgNOR* dalam jaringan Adenokarsinoma Mamma Mencit C3H**

**M M Habibie<sup>1</sup>, Ratna Damma P<sup>2</sup>**

### **ABSTRAK**

**Latar Belakang :** Kanker Payudara merupakan penyakit neoplasia yang memiliki tingkat morbiditas paling tinggi pada wanita. Tingkat keganasan kanker ini dapat tercermin dari jumlah *AgNOR* yang terlihat dengan pengecatan perak (*Ag*). Polifenol teh hijau memiliki sifat sitoprotektif dan antikarsinogenik yang dapat menghambat progresifitas kanker. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa pemberian teh hijau dapat menurunkan jumlah *AgNOR* dalam jaringan Adenokarsinoma mamma mencit C3H.

**Metode Penelitian :** Jenis Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan rancangan *post test only group design*. Sampel mencit strain C3H sebanyak 15 ekor. Mencit dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu kelompok K (kontrol, diinokulasi sel kanker), kelompok P1 (diberi polifenol teh hijau dengan dosis 0,5 cc/hari selama 3 minggu lalu diinokulasi sel kanker), kelompok P2 (diinokulasi sel kanker lalu diberi polifenol teh hijau dengan dosis 0,8 cc/hari selama 3 minggu).

**Hasil :** Rerata jumlah *AgNOR* dalam jaringan Adenokarsinoma mamma mencit C3H tertinggi 266,6 (56,4) pada kelompok K; 205 (14,9) pada kelompok P2 ; terendah 179,2 (22,6). Uji statistik menunjukkan perbedaan yang bermakna ( $p=0,007$ ). Rerata jumlah *AgNOR* berbeda bermakna antara kontrol dibanding P1 ( $p=0,006$ ) dan kontrol dengan P2 ( $p=0,048$ ). Antara P1 dan P2 tidak terdapat perbedaan bermakna ( $p=0,517$ ).

**Kesimpulan :** pemberian polifenol teh hijau dapat menurunkan jumlah *AgNOR* dalam jaringan Adenokarsinoma mamma mencit C3H.

**Kata Kunci :** jumlah *AgNOR*, polifenol teh hijau, kanker payudara

<sup>1</sup>Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

<sup>2</sup>Staf Pengajar Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

## **The Influence of Green Tea Polyphenol to AgNOR Count of Adenocarcinoma mammae in C3H Mice**

M. M. Habibie <sup>1</sup>, Ratna Damma Purnawati <sup>2</sup>

### **ABSTRACT**

**Background** : Breast Cancer is neoplasm disorders with highest morbidity and second highest mortality in the world. The AgNOR have been shown to reflect DNA transcriptional activity and also has been identified as a reliable factor of cell proliferation and in turn, of the malignant potential of a lesion. Green Tea Polyphenol known for its ability to inhibit the malignancy of a tumor due to its anticarcinogenic and sitoprotective effect. This experiment aimed to prove that administration of Green Tea Polyphenol can lower the AgNOR count of Adenocarcinoma mammae in C3H mice.

**Methods** : Experimental study with post test only control group design. The sampels were 15 C3H mice. 15 C3H mice were divided into 3 groups, group K (control group, were only been inoculated with cancer cell), group P1 (administered with 0,5 cc Green Tea Polyphenol every day for 3 weeks and then were innoculated with cancer cell) group P2 (were innoculated with cancer cell and then after tumors appeared, the group were administered with 0,5 cc Green Tea Polyphenol every day for 3 weeks)

**Results** : the highest AgNOR count was 266,6 (56,4) in group K ; 205 (14,9) in group P1, and the lowest 179,2 (22,6) in group P2, There was a significant difference in Histological grading between all groups ( $p=0,007$ ). The AgNOR count was significant between Group K and P1 ( $p=0,006$ ) and between group K and P2 ( $p=0,048$ ). There was no significant difference between group P1 and P2 ( $p=0,517$ )

**Conclusion** : The Administration of Green Tea Polyphenol can lower the AgNOR count of Adenocarcinoma mammae in C3H mice

**keywords** : AgNOR count, Green Tea Polyphenol, breast cancer.

<sup>1</sup> Student in Diponegoro University Faculty of Medicine

<sup>2</sup> Lecturer staff in Histologic Division of Diponegoro University Faculty of Medicine

## **PENDAHULUAN**

Menurut *World Health Organization*, sekitar 8-9% wanita akan mengalami kanker payudara. Hal ini menjadikan kanker payudara menjadi keganasan yang paling banyak ditemui pada wanita. Pada tahun 2000, diperkirakan 1,2 juta wanita terdiagnosa kanker payudara, sebanyak 700,000 orang diantaranya meninggal. Sekitar 40.000 orang meninggal dari keseluruhan 175.000 kasus baru yang terdiagnosa tiap tahun di Amerika Serikat.<sup>1</sup>

Di Indonesia, setiap tahun ada 100 wanita dari 100.000 penduduk yang terkena kanker payudara.<sup>2</sup> Laporan Profil Kesehatan Jawa Tengah pada tahun 2003 menyebutkan bahwa kanker payudara adalah neoplasia yang paling banyak ditemukan di Jawa Tengah sebesar 3.593 kasus (43,91%). Kasus terbanyak adalah di Kota Semarang yaitu 1.205 kasus (33,53%).<sup>3</sup>

Penatalaksanaan kanker payudara dilakukan dengan serangkaian pengobatan meliputi pembedahan, kemoterapi, terapi hormon, terapi radiasi dan yang terbaru adalah terapi imunologi (antibodi). Biaya pengobatan yang tinggi dan efek samping menjadi hambatan terapi. Berdasarkan hal tersebut, diperlukan terobosan terapi kanker yang lebih efektif dan efisien secara terapeutik maupun biaya dan memiliki efek samping yang lebih sedikit.<sup>1,4</sup>

Upaya pencegahan kanker terfokus pada kelompok faktor resiko yang dapat dimodifikasi. Salah satunya dengan asupan nutrisi yang sehat, baik dengan menghindari bahan makanan karsinogenik atau mengonsumsi makanan yang bersifat anti-karsinogenik seperti teh hijau.<sup>5,6</sup> Studi

epidemiologis telah menunjukkan penurunan insidensi kanker esofagus dan kanker payudara pada masyarakat yang mengonsumsi teh hijau secara teratur.<sup>7,8,9</sup>

Polifenol teh hijau mengandung senyawa (-) *epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG)* yang memiliki efek anti-karsinogenik. EGCG mampu menghambat metabolisme zat karsinogen, menginduksi enzim yang berperan untuk detoksifikasi zat karsinogen, berikatan langsung dengan bentuk aktif dari zat karsinogen, dan sebagai immunomodulator yang meningkatkan respon imun tubuh terhadap kanker.<sup>10,11</sup>

*EGCG* meningkatkan sekresi IL-12 pada tikus *UVB-induced carcinogenesis*.<sup>9,11</sup> *EGCG* juga meng-inhibisi *immunosuppressive cytokine* IL – 10 yang merupakan kontrol *feedback* negatif aktivasi makrofag.<sup>12,13,14</sup>

*Nucleolar Organizer Region (NOR)* merupakan lengkung *rDNA* ribosom yang terletak di lengan akrosentrik kromosom 13,14,15,21,22. *NOR* merupakan protein yang mampu mengikat perak (*Ag*) sehingga dinamakan *AgNOR (Agyrophilic Nucleolar Organizer Region)*. Pemeriksaan menggunakan mikroskop cahaya, *AgNOR* terlihat sebagai titik hitam/coklat yang terletak di dalam nukleus.<sup>15</sup> Menurut penelitian oleh Guskey et al, dikatakan bahwa terdapat hubungan antara jumlah *AgNOR* dengan tingkat proliferasi dan prognosis *Ca Mamma*.<sup>16,17,18</sup>

Berdasarkan hal tersebut di atas, didapatkan perumusan masalah yaitu apakah pemberian polifenol teh hijau dapat menurunkan jumlah *AgNOR* dalam jaringan Adenokarsinoma mamma?

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa pemberian polifenol teh hijau dapat menurunkan jumlah *AgNOR* dalam jaringan Adenokarsinoma mamma.

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi tentang pengaruh pemberian polifenol teh hijau terhadap jumlah *AgNOR* dalam jaringan Adenokarsinoma mamma.

## **METODE PENELITIAN**

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro selama empat bulan. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *post test only control group design* yang menggunakan binatang coba sebagai objek penelitian

Mencit strain C3H diperoleh dari Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, umur 8-10 minggu, berat badan 20-25 gram, sehat, tidak ada kelainan anatomi, diadaptasi selama 1 minggu, dan diberikan pakan standar serta minum secara *ad libitum*.

Mencit C3H berjumlah 15 ekor, dibagi dalam 3 kelompok perlakuan dengan besar sampel 5 ekor mencit tiap kelompok.

- a. Kelompok kontrol (K) diinokulasi sel kanker dan diberikan diet standar selama 3 minggu.
- b. Kelompok perlakuan 1 (P1) diinokulasi dengan sel kanker dan diberikan diet standard selama 3 minggu. Mencit kemudian diberikan Polifenol teh hijau sebanyak 0,5 cc per hari selama 3 minggu.
- c. Kelompok perlakuan 2 (P2) diberikan diet standar dan polifenol teh hijau sebanyak 0,5 cc per hari selama 3 minggu. Mencit kemudian diinokulasi sel kanker dan diterminasi setelah 3 minggu

Setelah perlakuan berakhir, semua mencit diterminasi dengan menggunakan ether. Jaringan tumor diambil kemudian difiksasi dengan buffer formalin 10%. Selanjutnya jaringan tumor dibuat blok parafin dan dilakukan pengecatan perak (*AgNOR*) dengan prosedur terlampir.

*AgNOR* dihitung menggunakan mikroskop cahaya, perbesaran 100 x 10 lensa objektif dalam minyak emersi, dihitung 100 sel pada setiap preparat. *AgNOR* tunggal dan *AgNOR* yang bergerombol dihitung secara hati-hati dengan merubah fokus naik turun. Bilamana terdapat struktur polisiklik besar (*NOR* yang saling bertumpang tindih), maka dianggap sebagai *AgNOR* tunggal jika bintik individual tidak dapat diidentifikasi. Penghitungan dilakukan dengan double *blinding* kemudian hasil dirata-rata<sup>19</sup>

Normalitas distribusi data diperiksa dengan Uji *Shapiro-wilk*. Hasil analisis menunjukkan bahwa distribusi data tersebut normal sehingga uji

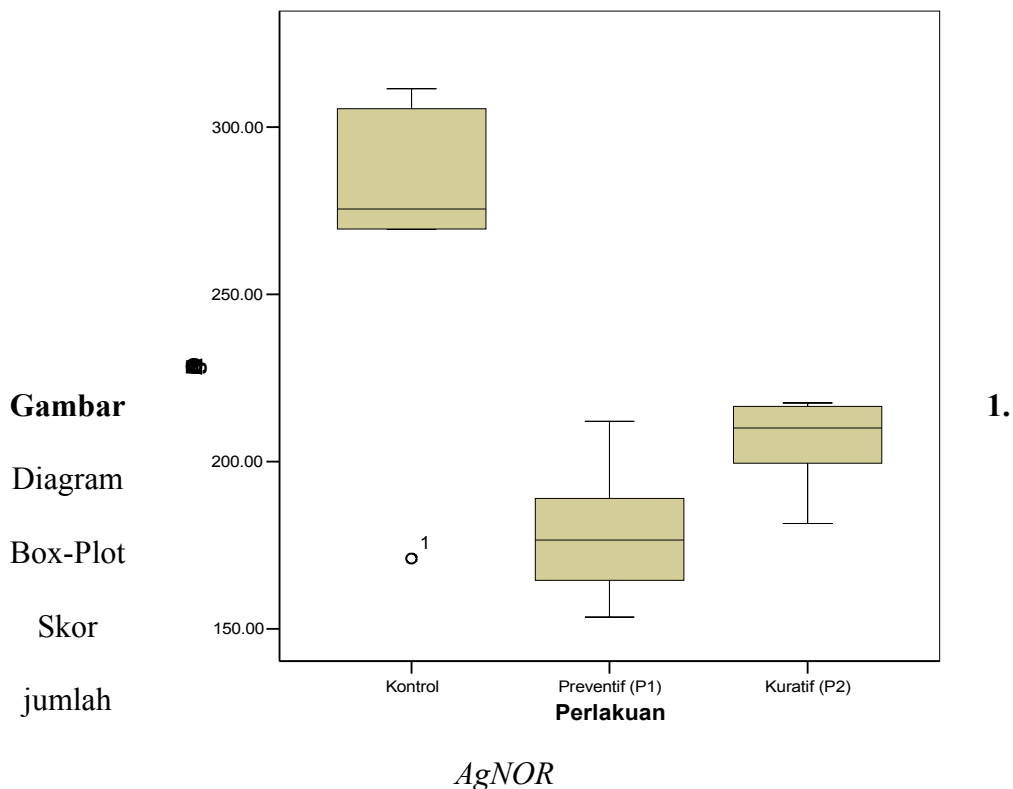
hipotesis dilakukan menggunakan statistik parametrik *one way analysis of variance (ANOVA)*. Karena terdapat perbedaan bermakna ( $P \leq 0,05$ ), maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey HSD* untuk perbandingan antar kelompok. Data yang diperoleh dari tiga kelompok sampel diolah dengan program komputer SPSS 12.0.

## HASIL PENELITIAN

Hasil penghitungan jumlah *AgNOR* sediaan jaringan Adenokarsinoma mamma untuk kelompok kontrol dan perlakuan ditampilkan dalam tabel 1 dan gambar 1.

**Tabel 1.** Perbandingan jumlah *AgNOR* antar kelompok mencit

No	Kontrol (K)	Perlakuan 1 (P1)	Perlakuan 2 (P2)
1	171	176,5	181,5
2	269,5	212	210
3	275,5	153,5	216,5
4	305,5	189	217,5
5	311,5	164,5	199,5
<b>Rerata ± SD</b>	<b>266,6 ± 56,4</b>	<b>179,2 ± 22,8</b>	<b>205 ± 14,9</b>



Analisis data dengan uji ANOVA menunjukkan perbedaan bermakna dengan nilai  $p = 0,007$  ( $p < 0,05$ ). Uji Post Hoc Tukey HSD dilakukan untuk

mengetahui perbandingan antar 3 kelompok. Hasil ditampilkan dalam tabel sebagai berikut :

**Tabel 2.** Nilai p uji Post Hoc jumlah *AgNOR*

Nilai P	K	P1	P2
K	-	0,006*	0,048*
P1	0,006*	-	0,517
P2	0,048*	0,517	-

\*. berbeda bermakna

## PEMBAHASAN

Rerata jumlah *AgNOR* pada kelompok P1 lebih rendah diantara semua kelompok. Kelompok K memiliki rerata jumlah *AgNOR* lebih tinggi dibandingkan dengan P1 maupun P2. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian polifenol teh hijau dengan dosis 0,5 cc / hari selama 3 minggu dapat menurunkan jumlah *AgNOR* dalam jaringan Adenokarsinoma mencit C3H baik dalam fungsi preventif maupun kuratif.

Peningkatan jumlah *AgNOR* berbanding lurus dengan tingkat proliferasi sel sehingga secara tidak langsung menunjukkan progresifitas kanker. Penurunan jumlah *AgNOR* pada kelompok P1 dan P2 menunjukkan bahwa polifenol teh hijau dapat menghambat progresifitas dari Adenokarsinoma mamma.<sup>20</sup> Hal tersebut dimungkinkan karena polifenol dapat mencegah kerusakan sel dan memiliki sifat antikarsinogenik.

Polifenol merupakan antioksidan yang mampu menginaktivasi ion metal dan mengeliminasi *Reactive Oxygen Species (ROS)* yang bersifat toksik terhadap sel. *EGCG* menginhibisi secara kompetitif fosforilasi reseptor tirosin

sehingga mencegah aktivasi dari *tumor growth factor VEGF* dan *EGF*. *EGCG* juga mencegah proses mutasi sel yang disebabkan oleh deaminasi *DNA*.<sup>21,23</sup>

*EGCG* meningkatkan ekspresi tumor supressor protein p53. *EGCG* juga meningkatkan ekspresi *Bax* dan menurunkan ekspresi *Bcl-2*. Peningkatan rasio *Bcl-2/Bax* setelah pemberian *EGCG* menyebabkan penurunan sekresi cytochrom c ke dalam sitosol, meningkatkan ekspresi *Apaf-1*, mengaktifasi *caspase-3* dan *poly(ADP-ribose) polymerase*. Semua hal diatas akan menginduksi proses apoptosis pada kanker payudara.<sup>23</sup>

*EGCG* meningkatkan sekresi IL-12 pada tikus *UVB-induced*

*carcinogenesis*. IL-12 memiliki beberapa fungsi penting yakni :

menstimulasi produksi IFN  $\gamma$  oleh sel NK dan limfosit T, bersama dengan

IFN  $\gamma$  memicu differensiasi  $CD4^+$  *T lymphocytes* menjadi TH 1 yang

mampu mensekresi IFN  $\gamma$ , meningkatkan aktifitas *cytotoxic* dari sel NK dan

$CD8^+$  *cytotocyc T lymphocyte 's*.<sup>9,20</sup> *EGCG* juga meninhibisi

*immunosupressive cytokine* IL -10 yang merupakan kontrol *feedback*

*negative* aktifasi makrofag.<sup>12,21</sup>

Selain itu *EGCG* meng-inhibisi proses ekspresi dari *Tumor Necrotizing Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ). Hal ini sangat berpengaruh terhadap proses karsinogenesis yang terkait dengan peran TNF- $\alpha$  sebagai salah satu faktor essensial dalam proses promosi tumor.<sup>11,13</sup>

## **KESIMPULAN**

Rerata jumlah *AgNOR* dalam jaringan Adenokarsinoma mamma pada kelompok yang diberi polifenol (P1 dan P2) lebih rendah daripada kelompok yang tidak diberi polifenol (K) dengan perbedaan yang bermakna.

## **SARAN**

Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan sampel yang homogen yaitu mencit strain C3H betina.

## **UCAPAN TERIMA KASIH**

Penulis ingin mengucapkan terima kasih yang setulus-tulusnya kepada dr. Neni Susilaningsih yang telah berbagi banyak hal untuk kelangsungan penelitian kami. Kepada Ketua Penguji dr.Ahmad Zulfa Juniarto, M.Si, Med, Sp.And, anggota penguji dr. Siti Amarwati Y, Sp.PA dan seluruh staf Patologi Anatomi yang telah membantu dalam penyediaan dan pembacaan preparat..

## DAFTAR PUSTAKA

1. Roche Pharmaceutical. Kanker Payudara. [online]. 2005 [cited : 2007 Oct 18];[4 screen]. Available from : <http://www.homepidin.org>
2. Kompas Cyber Media. Wanita Indonesia Paling Sering Terkena Kanker Payudara. [online]. 2005 [cited 2007 Oct 18];[1 screens]. Available from : <http://www.kompas.com>
3. Dinas Kesehatan Propinsi Jawa Tengah. Profil Kesehatan Jawa Tengah Tahun 2003. [online]. 2005 [cited 2007 Oct 28];[1 screen]. Available from : <http://www.health-lrc.or.id/profil2004>
4. American Cancer Society. Global Cancer Fact & Figures 2007. Atlanta: American Cancer Society; 2007 [cited 2008 Jan 17]. Available from: <http://www.cancer.org/>.
5. American Cancer Society. Cancer Prevention & Early Detection Fact & Figures 2007. Atlanta: American Cancer Society; 2007 [cited 2008 Jan 17]. Available from: <http://www.cancer.org/>.
6. Bone CW. Current Strategies of Cancer Chemopreventive; 13<sup>th</sup> Sapporo Cancer Seminar. [online]. 1994 Jan 15;54:3315-8. Available from: EBSCO Publishing. [cited 2008 Jan 17].
7. Sartippour MR, Shao ZM, Heber D, Zhang L, Liu C, Ellis L, et al. Green Tea Inhibits Endothelial Growth Factor (VEGF) Induction in Human Breast Cancer Cell. [online]. 2007 Jul 23; 2307-11. Available from: EBSCO Publishing. [cited 2007 Jul 05].
8. Kim J, Zhang X, Rieger-Christ KM, Summerhayes IC, Wazer DE, Paulson KE, et al. Suppression of Wnt Signalling by Green Tea Compound (-)-Epigallocatechin 3-Gallate (EGCG) in Invasive Breast Cancer Cells. [online]. 2007 Jul 23;281(16):10865-75. Available from: EBSCO Publishing. [cited 2007 Jul 05].
9. Tosetti F, Ferrarri N, Flora SD, Albini A. 'Angioprevention': angiogenesis is a common and key target for cancer chemopreventive agents. [online]. Available from: EBSCO Publishing. [cited 2007 Jul 05].
10. Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The Effect of Plant Flavanoids on Mammalian Cells: Implication for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. [online]. 2000;52(4):673-751. Available from: EBSCO Publishing. [cited 2007 Jul 05].
11. Yang F, Oz HS, Barve S, De Villiers WJS, Craig J, McClain, et al. The Green Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Blocks Nuclear Factor- $\kappa$ B by Inhibiting I $\kappa$ B Kinase Activity in the Intestinal Epithelial Cell Line IEC-6. [online]. 2001;60(3):528-533. Available from: EBSCO Publishing. [cited 2007 Jul 05].
12. Katiyar SK. Skin Photoprotection by Green Tea: Antioxidant and Immunomodulatory Effects. [online]. 2003;3(3):234-242. Available from: EBSCO Publishing. [cited 2007 Jul 05].

13. Suganuma M, Sueoka E, Sueoka N, Okabe S, Fujiki H. Mechanism of Cancer Prevention Based on Inhibition of TNF- $\alpha$  Expression. [online]. 2006;13:67-72. Available from: EBSCO Publishing. [cited 2007 Jul 05].
14. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 6<sup>th</sup>ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. p. 391-410
15. Khanna AK, Yadav SK, Dixit VK, Kumar M. *AgNOR* Count and Subjective *AgNOR* Pattern Assessment (SAPA) Score in Carcinoma of the Pancreatic Head Including Periampullary Tumors. [online]. 2005;6(6):575-80. Available from: EBSCO Publishing. [cited 2007 Jul 05].
16. [Guski H](#), [Hufnagl P](#), [Kaufmann O](#), [Krause M](#), [Winzer KJ](#). *AgNOR* Analysis of Atypical Ductal [Hyperplasia](#) and [Intraductal Carcinoma](#) of The Breast. [online]. 2000 Jun;22(3):206-12. Available from: Pubmed. [cited 2008 Feb 03].
17. Ceccarelli C, Trerè D, Santini D, Taffurelli M, Chieco P, Derenzini M. *AgNOR* in Breast Tumors. [online]. [cited 2007 Oct 28];[1 screen]. Available from : <http://www.sciencedirect.com>
18. Derenzini M, Ceccarelli C, Trerè D, Santini D, Taffurelli M, Trerè D. The Prognostic Value of the *AgNOR* Parameter in Human Breast Cancer Depends on the pRb and p53 Status. [online]. [cited 2007 Oct 28];[1 screen]. Available from : <http://www.sciencedirect.com>
19. Herminto W. Analisis Kecepatan Proliferasi Sel Yang Diukur Dengan Menggunakan Perwarnaan Perak Spesifik Terhadap Protein-Protein Agryophilic Nucleolar Organizer Region Pada Leukimia Limfoblastik Akut Anak. Yogyakarta : Pendidikan Dokter Spesialis I. 2000
20. tesis
21. Demeule M, Michaud-Lavesque J, Annabi B, Gingras D, Boivin D, Jodoin J, et al. Green Tea Catechins as Novel Antitumor and Antiangiogenic Compound. [online]. 2002;2:441-63. Available from: EBSCO Publishing. [cited 2007 Jul 05].
22. Yang CS, Prabhu S, Landau J. Prevention of Carcinogenesis by Tea Polyphenols. [online]. 2001;33(3&4):237-53. Available from: EBSCO Publishing. [cited 2007 Jul 05].
23. Issemura M, Saeki K, Kumura T, Hayakawa S, Minami T, Suzuka M. Tea Catechins and Related Polyphenol as Anti-Cancer Agents. [online]. 2000;13:81-5. Available from: EBSCO Publishing. [cited 2007 Jul 05].

## LAMPIRAN 1

### METODE INOKULASI SEL ADENOKARSINOMA MAMMAE PADA MENCIT *C3H*

#### Alat dan Bahan

- mencit *C3H* (donor dan resipien)
- spuit insulin + jarum ukuran 18
- gunting bedah 10 cm
- gunting bengkok 10 cm
- pinset anatomis dan *chirurgis*
- botol jaringan
- sterofoam atau papan lilin
- cawan arloji
- cawan petri
- buffer formalin 10%
- es batu
- baskom
- alkohol 70%
- kapas
- hand scun
- ringer laktat / NaCl 0,9%

#### Cara Inokulasi

- a. Siapkan mencit donor, diterminasi lalu diambil jaringan tumornya.
- b. Bersihkan jaringan tumor tersebut dalam cawan petri yang sudah diisi dengan NaCl 0,9% dari jaringan ikat, pembuluh darah dan jaringan lain yang melekat.
- c. Buat bubur tumor di cawan arloji yang diletakkan di atas baskom es dengan menggunakan gunting bengkok sampai lembut (bubur tumor bisa masuk ke dalam jarum spuit).

- d. Encerkan bubuk tumor dengan NaCl 0,9% (bubur tumor : NaCl 0,9% = 1:1), lalu campur rata kemudian masukkan ke dalam spuit insulin sampai batas 0,2 ml dan suntikkan subcutan ke mencit *C3H* resipien.

## **LAMPIRAN 2**

### **METODE BAKU PEMBUATAN SEDIAAN PENELITIAN UNTUK PEMERIKSAAN HISTOPATOLOGI RUTIN**

#### **A. Fiksasi**

1. Potongan jaringan dimasukkan dalam larutan formalin buffer (larutan formalin 10% dalam buffer Natrium asetat sampai mencapai pH 7,0) selama 18-24 jam.
2. Kemudian dilakukan pemotongan jaringan menjadi 2 potongan sama besar.
3. Semua potongan dimasukkan dalam larutan aquades selama 1 jam untuk proses penghilangan larutan fiksasi.

#### **B. Dehidrasi**

1. Potongan jaringan dimasukkan dalam alkohol konsentrasi bertingkat hingga jaringan menjadi lebih jernih dan transparan.
2. Kemudian jaringan dimasukkan dalam larutan alkohol-xylol selama 1 jam.
3. Kemudian jaringan dimasukkan dalam larutan xylol murni selama 2x2 jam.

#### **C. Impregnasi**

Jaringan dimasukkan dalam parafin cair selama 2x2 jam.

#### **D. *Embedding* (pengeraman)**

1. Jaringan ditanam dalam parafin padat yang mempunyai titik lebur 56-58 °C, ditunggu sampai parafin padat.
2. Jaringan di dalam parafin dipotong setebal 4 mikron dengan mikrotom.
3. Potongan jaringan ditempelkan pada kaca objek yang sebelumnya telah diolesi polilisin sebagai perekat.

4. Jaringan pada kaca objek dipanaskan dalam inkubator suhu 56-58 °C sampai parafin mencair.

**E. Pengecatan AgNOR**

1. Preparat dibilas dengan larutan xylene selama 5-10 menit sebanyak 3 kali, kemudian dalam ethanol (100%) selama 2-5 menit.
2. Prepara dicuci dengan air mengalir selama 5 menit kemudian dibilas dengan deionized water selama 2-3 menit sebanyak 2-3 kali.
3. Preparat direndam dalam satu bagian larutan A dan 2 bagian larutan B kemudian dibiarkan ditempat yang gelap selama 30-60 menit.
4. Larutan A (Coloid Developer Solution) dibuat dengan melarutkan 100 ml air murni dengan 2 gr gelatin dan 1 mL asam format 1% kemudian diaduk selama 20-30 menit dalam suhu 40-60 ° C.
5. Larutan B dibuat dengan melarutkan 100 mL aquades dengan 50 gr silver nitrat. Larutan ini harus disimpan dalam tempat yang gelap dan dibungkus dengan kertas alumunium foil.
6. Preparat dicuci dengan deionized water 3 kali, dengan sodium tiosulfat 5% selama 5 menit, kemudian dibilas dengan ethanol (100%) dan larutan xylene

## Lampiran 4

## Explore

## Perlakuan

### Case Processing Summary

	Perlakuan	Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
AgNOR	Kontrol	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	Preventif (P1)	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	Kuratif (P2)	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%

### Descriptives

	Perlakuan		Statistic	Std. Error
AgNOR	Kontrol	Mean	266.6000	25.25490
		95% Confidence Interval for Mean	196.4812	
		Lower Bound	336.7188	
		Upper Bound		
		5% Trimmed Mean	269.4167	
		Median	275.5000	
		Variance	3189.050	
		Std. Deviation	56.47167	
		Minimum	171.00	
		Maximum	311.50	
	Range	140.50		
	Interquartile Range	88.25		
	Skewness	-1.674	.913	
	Kurtosis	3.048	2.000	
	Preventif (P1)	Mean	179.1000	10.13829
		95% Confidence Interval for Mean	150.9516	
		Lower Bound	207.2484	
Upper Bound				
5% Trimmed Mean		178.6944		
Median		176.5000		
Variance		513.925		
Std. Deviation		22.66991		
Minimum	153.50			
Maximum	212.00			
Range	58.50			
Interquartile Range	41.50			

Kuratif (P2)	Skewness		.596	.913	
	Kurtosis		-.162	2.000	
	Mean		205.0000	6.69328	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound		186.4165	
		Upper Bound		223.5835	
	5% Trimmed Mean		205.6111		
	Median		210.0000		
	Variance		224.000		
	Std. Deviation		14.96663		
	Minimum		181.50		
	Maximum		217.50		
	Range		36.00		
	Interquartile Range		26.50		
	Skewness		-1.186	.913	
	Kurtosis		.680	2.000	

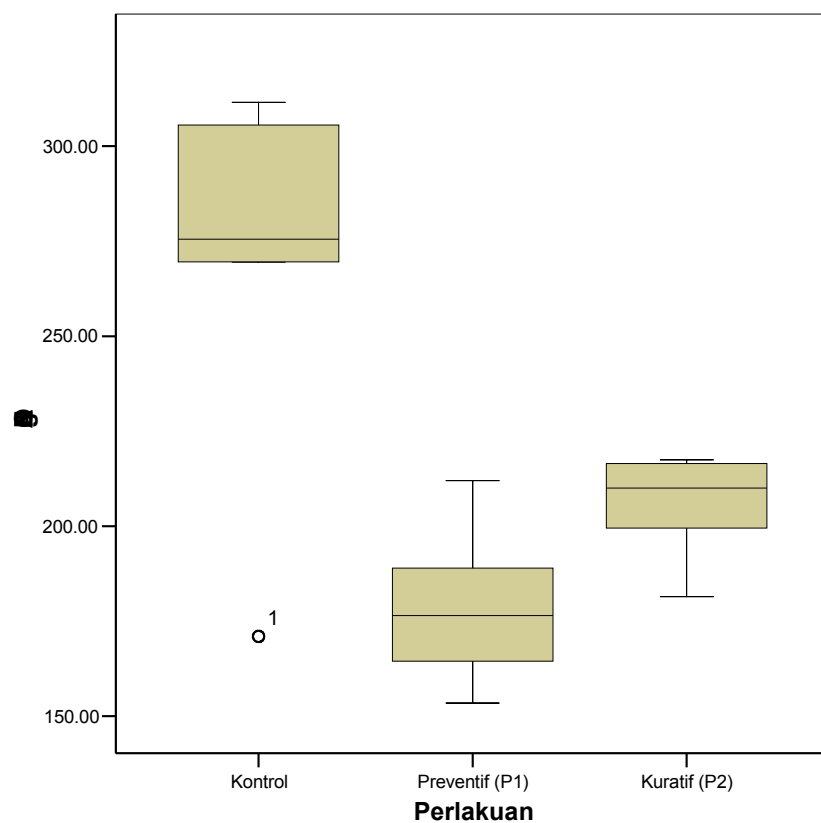
#### Tests of Normality

	Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
AgNOR	Kontrol	.320	5	.103	.817	5	.110
	Preventif (P1)	.146	5	.200(*)	.976	5	.913
	Kuratif (P2)	.231	5	.200(*)	.877	5	.295

\* This is a lower bound of the true significance.

a Lilliefors Significance Correction

## AgNOR



## Oneway

### Test of Homogeneity of Variances

AgNOR

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.895	2	12	.193

### ANOVA

AgNOR

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	20202.700	2	10101.350	7.717	.007
Within Groups	15707.900	12	1308.992		
Total	35910.600	14			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: AgNOR

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Preventif (P1)	87.50000(*)	22.88223	.006	26.4533	148.5467
	Kuratif (P2)	61.60000(*)	22.88223	.048	.5533	122.6467
Preventif (P1)	Kontrol	-87.50000(*)	22.88223	.006	-148.5467	-26.4533
	Kuratif (P2)	-25.90000	22.88223	.514	-86.9467	35.1467
Kuratif (P2)	Kontrol	-61.60000(*)	22.88223	.048	-122.6467	-.5533
	Preventif (P1)	25.90000	22.88223	.514	-35.1467	86.9467

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